

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6673829号  
(P6673829)

(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月9日(2020.3.9)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
A 6 1 K 31/716 (2006.01)	A 6 1 K 31/716
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 K 36/062 (2006.01)	A 6 1 K 36/062

請求項の数 11 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-536615 (P2016-536615)	(73) 特許権者	508367740
(86) (22) 出願日	平成26年12月1日 (2014.12.1)		バイオセラ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-501399 (P2017-501399A)		アメリカ合衆国 ミネソタ州 5 5 1 2 1
(43) 公表日	平成29年1月12日 (2017.1.12)		イーガン マイク コリンズ ドライヴ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/067944		3 3 8 8
(87) 国際公開番号	W02015/084732	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成29年12月1日 (2017.12.1)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/912, 275		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成25年12月5日 (2013.12.5)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	62/005, 335	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成26年5月30日 (2014.5.30)		弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(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-グルカンアッセイ方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

対象から取得された試料を分析し、参照標準と比較してバイオマーカーである抗 - グルカン抗体の濃度を計算し；そして

バイオマーカーである抗 - グルカン抗体についての所定のカットオフ値と比較した当該試料中のバイオマーカーである抗 - グルカン抗体の濃度に基づいて、当該試料をバイオマーカー陽性と同定すること、を含み、

ここで、当該所定のカットオフ値が、バイオマーカー陽性試料とバイオマーカー陰性試料とを層別化する1つ又は複数のエンドポイントと相関した特異度及び感度の組み合わせに

10

応じて選択され、そして、  
ここで、当該1つ又は複数のエンドポイントが、全生存中央値 (Median Overall Survival)；全奏効率 (overall response rate)；単球又は好中球への - グルカン結合；補体成分 C 4 a、C 5 a 又は S C 5 b - 9 の活性化；好中球 C R 1、C R 3、C D 8 8 又は C D 6 2 L 表面マーカー発現の調節；あるいは I L - 8 の誘導である、方法。

【請求項 2】

以下：

参照標準と比較してバイオマーカーである抗 - グルカン抗体の量について対象から取得された試料を分析し；そして

該試料が、バイオマーカー陽性試料とバイオマーカー陰性試料とを分けるバイオマーカー

20

ーである抗 - グルカン抗体についての所定のカットオフ値よりも大きい抗 - グルカン抗体の量を含む場合に、当該試料をバイオマーカー陽性と同定すること、を含み、ここで、当該所定のカットオフ値が、1つ又は複数のエンドポイントと関連した特異度及び感度の組み合わせに応じて選択され、そして、ここで、当該1つ又は複数のエンドポイントが、全生存中央値 (Median Overall Survival) ; 全奏効率 (overall response rate) ; 単球又は好中球への - グルカン結合 ; 補体成分 C 4 a、C 5 a 又は S C 5 b - 9 の活性化 ; 好中球 C R 1、C R 3、C D 8 8 又は C D 6 2 L 表面マーカー発現の調節 ; あるいは I L - 8 の誘導である、方法。

【請求項 3】

前記バイオマーカーである抗 - グルカン抗体が I g G を含む、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記バイオマーカーである抗 - グルカン抗体が I g G を含み、かつ、前記所定のカットオフ値が、 $14 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 80 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲内である、請求項 1 又は請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を用いて、バイオマーカーである抗 - グルカン抗体について分析される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法においてバイオマーカー陽性と同定された試料を有する対象に投与するための、 - グルカンを含む組成物。

20

【請求項 7】

前記 - グルカンが酵母に由来する、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 - グルカンが - 1, 3 / 1, 6 グルカンを含む、請求項 6 又は 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記 - 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む、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 10】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法においてバイオマーカー陽性と同定されなかった試料を有する対象に投与するための、抗 - グルカン I g G<sub>2</sub> を含む組成物。

【請求項 11】

前記特異度及び感度の組み合わせが、R O C 曲線解析を用いる 1 つ又は複数のエンドポイントに相関している、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2013年12月5日に出願された米国仮出願第61/912,275号、及び2014年5月30日に出願された米国仮出願第62/005,335号の優先権を主張し、そのそれぞれが参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

概要

本開示は、対象の - グルカンに対する免疫応答を示すバイオマーカーについて対象からの試料を分析するための方法を提供する。

【発明の概要】

【0003】

50

いくつかの実施形態では、本方法は、対象から生体試料を取得すること、参照標準と比較してバイオマーカーである抗 - グルカン抗体について該試料を分析すること、該試料中の抗 - グルカン抗体について抗 - グルカン抗体濃度又は相対抗体単位 ( R e l a t i v e A n t i b o d y U n i t ) ( R A U ) 値を計算すること、そして、該抗 - グルカン抗体濃度又は R A U 値がバイオマーカーである抗 - グルカン抗体についての所定の抗 - グルカン抗体濃度又は R A U 値よりも大きい場合に、当該対象をバイオマーカー陽性と同定することを一般に含む。

【 0 0 0 4 】

他の実施形態では、本方法は、対象から生体試料を取得すること、参照標準と比較してバイオマーカーである抗 - グルカン抗体について該試料を分析すること、そして、該試料が、バイオマーカー陽性対象とバイオマーカー陰性対象とを分けるバイオマーカーである抗 - グルカン抗体についての所定のカットオフ値よりも大きい抗 - グルカン抗体の量を含む場合に、当該対象をバイオマーカー陽性と同定することを一般に含む。

10

【 0 0 0 5 】

いくつかの実施形態では、該バイオマーカーである抗 - グルカン抗体は I g G とすることができる。これら実施形態のいくつかでは、該所定の R A U 値は 2 0 0 とすることができる。

【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態では、該バイオマーカーである抗 - グルカン抗体は I g M とすることができる。これら実施形態のいくつかでは、該所定の R A U 値は 3 0 0 とすることができる。

20

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態では、本方法は、バイオマーカー陽性として同定された対象に - グルカン含有する組成物を投与することをさらに含むことができる。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、本方法は、バイオマーカー陽性として同定された対象に抗 - グルカン I g G<sub>2</sub> を含有する組成物を投与することをさらに含むことができる。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、該 - グルカンは、酵母、例えば - 1 , 3 / 1 , 6 グルカンに由来する。ある実施形態では、該 - グルカンは、 ( 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。

30

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーである抗 - グルカン抗体について試料を分析することは、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) を用いることを含むことができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の上記概要は、開示された各実施形態又は本発明の全ての実施を記載することを意図するものではない。以下の説明はより具体的に例示的な実施形態を示す。本願全体にわたっていくつかの箇所では、様々な組み合わせで使用できる例のリストを介してガイドランスが提供される。それぞれの事例において、列挙されたリストは代表群としてのみの役割を果たし、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 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 A 】 任意の値の 1 6 0 を参照血清に割り当てた ( すなわち 1 6 0 相対抗体単位 [ R A U ] / m L ) 。 従って、検量線上の最高点、 1 : 4 0 0 希釈は、 4 0 0 m R A U / m L の値をもたらす。検量線上の最低点で、 1 : 5 1 2 0 0 希釈は、 3 . 1 2 5 m R A U / m L の値をもたらす。平均 R A U / m L = 3 6 5 。

【 図 1 B 】 I g G 抗 - グルカン抗体濃度の実用標準曲線 ( w o r k i n g s t a n d a r d c u r v e ) 。

50

【図1C】IgM抗 - グルカン抗体濃度の实用標準曲線。

【図2】低レベルのIgG (RAU < 200) 及びIgM (RAU < 100) 抗ベータグルカン抗体を有する8人の健常なボランティアからの全血を、上昇する濃度のIVIIG (0、2.5、5及び10mg/ml) に添加した。血漿を除去し、RAU値を各試料について決定した。

【図3】低レベルのIgG (RAU < 200) 及びIgM (RAU < 100) 抗ベータグルカン抗体を有する4人の健常なボランティアからの血液試料を、上昇する濃度のIVIIG (0、2.5、5及び10mg/ml) に添加した。全血細胞を10µg/mlでIMPRIME PGGにより処理し、30分間37 でインキュベートし、好中球結合について分析した。

10

【図4】低レベルのIgG (RAU < 200) 及びIgM (RAU < 100) 抗ベータグルカン抗体を有する8人の健常なボランティアからの全血細胞を、IMPRIME PGG (10mg/ml) 及びIVIIG (0、2.5、5及び10mg/ml) と培養し、IMPRIME PGGの結合及び機能を評価した(補体解析のために30分のインキュベーション; 結合及び受容体調節のために2時間; サイトカインのために一晚培養)。

【図5】低レベルのIgG (RAU < 200) 及びIgM (RAU < 100) 抗ベータグルカン抗体を有する8人の健常なボランティアからの全血細胞を、IMPRIME PGG (10mg/ml) 及びIVIIG (0、2.5、5及び10mg/ml) と培養し、IMPRIME PGG誘導性SC5b-9放出を評価した。

【図6】低レベルのIgG (RAU < 200) 及びIgM (RAU < 100) 抗ベータグルカン抗体を有する8人の健常なボランティアからの全血細胞を、IMPRIME PGG (10mg/ml) 及びIVIIG (0、2.5、5、及び10mg/ml) とインキュベートし、IMPRIME PGG誘導性の好中球におけるCD62L切断(shedding) (フローサイトメトリー) 及びIL-8産生(ELISA)を評価した。

20

【図7】結合及び機能に必要なRAUは個体により異なる。したがって、バイオマーカーのカットオフの目的は、IMPRIME PGGに反応しないであろう個体を除外することになるRAUレベルを同定し、そして反応するより高い確率を有するバイオマーカー陽性の対象を富ませることである。結合及び機能データはIVIIG-5グループ(RAU 233~610)で生じる最大活性を示し、それゆえ、IgGのカットオフについてのさらなる分析は200を超えるRAU範囲に焦点を置くべきである。

30

【図8】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。

【図9】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。丸で囲まれたボランティアは、低いIgG RAUを有する高い好中球バインダーであったが、高いIgM RAUを有した、したがって、IgG RAU解析から除くことができる。

【図10】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。235のIgG RAUのカットオフは、そのRAUが結合を促進するのに十分であったボランティア(バイオマーカー陽性)対、そのRAUが結合を促進するのに十分でなかったボランティア(バイオマーカー陰性)を分離した。

40

【図11】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。丸で囲まれた個体はIgGバイオマーカー陰性だが、高いIgM RAUである。

【図12】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。緑の丸で囲まれた青色でないボランティアは高いIgG RAUに基づいて既にバイオマーカー陽性であった、したがって、IgM RAU解析から除くことができる。

【図13】IgG RAUレベルによりプロットされた健常なボランティアのIMPRIME PGGの好中球結合。330のIgM RAUのカットオフは、そのRAUが結合を促進するのに十分であったボランティア(バイオマーカー陽性)対、そのRAUが結合

50

を促進するのに十分でなかったボランティア（バイオマーカー陰性）を分離した。

【図14】健常なドナーからの全血における抗ベータグルカン抗体レベルとC4a産生との相関関係。個々の健常なドナーからのIMP RIME PGG (10 μg/ml)で30分刺激されたWB培養におけるC4aの量を、Y軸におけるクエン酸塩の対照に対する倍率変化 (fold change) として示す。平均倍率変化 ± SEMを各群についてX軸に示す。IgG RAU 235を有する8/10個体 (80%) 及びIgG RAU < 235を有する0/7個体が、IMP RIME PGGによる1.5倍のC4a産生を示し、高いRAUとより大きな補体活性化との間の有意な相関関係を支持した (\*\* p = 0.0069)。

【図15】健常なドナーからの全血における抗ベータグルカン抗体レベルとC5a産生との相関関係。個々の健常なドナーからのIMP RIME PGG (10 μg/ml)で30分刺激されたWB培養におけるC5aの量を、Y軸におけるクエン酸塩の対照に対する倍率変化として示す。平均倍率変化 ± SEMを各群についてX軸に示す。IgG RAU 235を有する10/10個体及びIgG RAU < 235を有する1/7個体 (14%) は、IMP RIME PGGによる1.5倍のC5a産生を示し、高いRAUとより大きな補体活性化との間の有意な相関関係を支持した (\* p = 0.0381)。

【図16】健常なドナーからの全血における抗ベータグルカンRAUレベルとSC5b-9産生との相関関係。IMP RIME PGG (10 μg/ml)と30分インキュベートされた健常なドナーの全血培養におけるSC5b-9の量。SC5b-9レベル (Y軸) は、IgG RAUの状態 (X軸) によって層別化された (stratified) クエン酸塩の対照に対する倍率変化として示した。IgG RAU 235を有する11/11 (すなわち100%) の個体、対、IgG RAU < 235を有する0/9 (すなわち0%) の個体は、2倍のSC5b-9産生を示し、高いRAUとより大きな補体活性化との間の有意な相関関係を支持した (\*\* p = 0.0082)。

【図17】健常なドナーからの全血のPMNにおけるCR3の表面発現の増加と抗ベータグルカン抗体レベルとの相関関係。個々の健常なドナーからのIMP RIME PGG (10 μg/ml)で30分刺激されたWB培養におけるCD15+好中球でのCR3の表面発現を、Y軸におけるクエン酸塩の対照に対するMFI変化率として示す。平均MFI変化率 ± SEMを各群についてX軸に示す。IgG RAU < 235を有する個体 (N = 7) と比較すると、IgG RAU 235を有する個体 (N = 11) からの好中球は、表面CR3レベルの有意な増加を示した (\* p = 0.0211)。

【図18】健常なドナーからの全血のPMNにおけるCD88発現の減少と抗ベータグルカン抗体レベルとの相関関係。個々の健常なドナーからのIMP RIME PGG (10 μg/ml)で30分刺激されたWB培養におけるCD15+好中球でのCD88の表面発現を、Y軸におけるクエン酸塩の対照に対するMFI変化率として示す。平均MFI変化率 ± SEMを各群についてX軸に示す。IgG RAU < 235を有する個体 (N = 8) と比較すると、IgG RAU 235を有する個体 (N = 13) からの好中球は、表面CD88レベルの有意な減少を示した (\* p = 0.0197)。

【図19】健常なドナーの全血をIMP RIME PGG (10 μg/ml)とインキュベートし、CD15+好中球でのCD62Lの表面発現を分析した。パーセントのCD15+CD62L<sup>lo</sup>細胞 (個々及び平均 ± SEM) を、X軸上のRAUの状態によって層別化されたY軸上に示す。IgG RAU 235を有する個体からの好中球は、CD62L発現の有意な減少を示した (\*\* p = 0.005)。

【図20】健常なドナーの全血をIMP RIME PGG (10 μg/ml)と一晚インキュベートし、その後血漿IL-8レベルを測定した。IL-8レベル (Y軸) は、IgG RAUの状態 (X軸) によって層別化されたクエン酸塩の対照に対する倍率変化として示した。IgG RAU 235を有する12/13 (すなわち92%) の個体、対、IgG RAU < 235を有するわずか3/13 (すなわち23%) の個体は、IMP RIME PGGによる2倍のIL-8産生を示し、高いRAUとより大きなIL-8産生との間の有意な相関関係を支持した (\*\* p = 0.0028)。

10

20

30

40

50

【図21】健常なドナーからの全血における抗ベータグルカン抗体レベルとSC5b-9産生との相関関係。個々の健常なドナーからのIMPRIME PGG(10 µg/ml)で30分刺激されたWB培養におけるSC5b-9の量を、Y軸におけるクエン酸塩の対照に対する倍率変化として示す。平均倍率変化±SEMを各群についてX軸に示す。IgM RAU<235を有する個体(N=9)と比較すると、IgM RAU 330を有する個体(N=3)からの好中球は、SC5b-9産生の有意な増加を示した(\*\*\*p=0.0003)。

【図22】クマシーブルーで染色した精製された「至適参照(gold reference)」IgG及びIgM抗-グルカン抗体のSDS-PAGE(4~20%還元条件下)。キロダルトン(kDa)で表される分子量(MW)を有するタンパク質標準をレーン3に示す。

10

【図23】(A)健常な対象の全血におけるIMPRIME PGGの好中球結合と、IgG抗-グルカン抗体濃度との相関関係；(B)健常な対象の全血におけるIMPRIME PGGの好中球結合と、IgM抗-グルカン抗体濃度との相関関係。

【図24】(A)健常な対象の全血におけるIMPRIME PGGの単球結合と、IgG抗-グルカン抗体濃度との相関関係；(B)健常な対象の全血におけるIMPRIME PGGの単球結合と、IgM抗-グルカン抗体濃度との相関関係。

【図25】(A)高対低バインダー状態に基づくIMPRIME PGGの好中球結合と、IgG抗-グルカン抗体濃度との相関関係；(B)高対低バインダー状態に基づくIMPRIME PGGの好中球結合と、IgM抗-グルカン抗体濃度との相関関係。

20

【図26】(A)高対低バインダー状態に基づくIMPRIME PGGの単球結合と、IgG抗-グルカン抗体濃度との相関関係；(B)高対低バインダー状態に基づくIMPRIME PGGの単球結合と、IgM抗-グルカン抗体濃度との相関関係。

【図27】(A)好中球結合に基づくIgGのROC曲線解析；(B)好中球結合に基づくIgMのROC曲線解析。

【図28】(A)単球結合に基づくIgGのROC曲線解析；(B)単球結合に基づくIgMのROC曲線解析。

【図29】高対低バインダー状態に基づくIgG抗-グルカン抗体サブクラスの好中球結合。

【図30】IgG抗-グルカン抗体サブクラスの好中球結合。

30

【図31】低バインダー患者のIMPRIME PGG処置のための抗-グルカン抗体を増加させるための、静注用免疫グロブリン(intravenous免疫グロブリン)(IVIg)のイン・ピボ注入の結果。(A)IgG RAU；(B)PMN結合及び単球結合；(C)C5a倍率増加(fold increase)。

【発明を実施するための形態】

【0013】

例示的な実施形態の詳細な説明

-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-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-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-グルカンで存在し得る。構造的に、酵母-グルカンは、-(1,6)グリコシド結合を介して骨格に結合された過-(1,3)グルコピラノース分枝を有する、-(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-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-グルカンがその免疫調節効果を発揮するメカニズムは、-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-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、-グルカンの構造特性に依存し得る。

40

50

## 【 0 0 1 4 】

一般的に、 $\alpha$ -グルカン免疫療法は、対象へ任意の適した形態の $\alpha$ -グルカン又は $\beta$ -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 $\alpha$ -グルカン及び自然源の適した $\beta$ -グルカンの調製物は、例えば、米国特許出願公開第2008/0103112 A1号明細書に記載される。場合により、 $\alpha$ -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、 $\beta$ -グルカンは、本願明細書において、可溶性酵母由来の $\beta$ -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 (IMPRIME PGG、バイオセラ (Biothera)、イーガン、ミネソタ州)とも呼ぶ、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースである又はそれに由来してよい。さらに、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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、 $\alpha$ -グルカン免疫療法は、例えば、米国特許第7,981,447号明細書に記載の粒子性可溶性 $\alpha$ -グルカン又は粒子性可溶性 $\beta$ -グルカン調製物を投与することを含むことができる。

10

## 【 0 0 1 5 】

バイオマーカー研究は、IMPRIME PGGに結合するそれらの好中球及び単球の能力における対象間の差異を示した。それら細胞へのIMPRIME PGGの結合は、対象のIMPRIME PGGへの免疫調節反応と関連した。また、好中球及び単球へのIMPRIME PGGの結合は、特定のレベルの自然の抗 $\alpha$ -グルカン抗体の存在を含む。

20

## 【 0 0 1 6 】

本開示は、患者の血清試料中の抗 $\alpha$ -グルカンIgG及びIgM抗体を定量的に測定するための単純なELISA法を提供する。ELISA法はバイオマーカーアッセイとして用いられてもよい。バイオマーカーアッセイのためのカットオフレベルは、健常なボランティアのバイオマーカー陽性及びバイオマーカー陰性サブグループを同定し、そしてそれらのカットオフポイントは結合、機能、及び臨床転帰と関連する。

## 【 0 0 1 7 】

健常なボランティアからの好中球へのIMPRIME PGGの結合を評価する先の研究は、異なる結合能力を有する対象を明らかにした。IMPRIME PGGの高い好中球結合(例えば>20%の好中球に結合するIMPRIME PGG)が、健常なボランティアの~40%に見られた。IMPRIME PGGの単球結合は健常なボランティアにおける好中球の結合能に匹敵する。イン・ビトロで、高い好中球バインダー及び高い単球バインダーは、低バインダーよりも多くのIL-8を産生する。

30

## 【 0 0 1 8 】

より高い自然の抗 $\alpha$ -グルカン抗体レベルはIMPRIME PGGの好中球結合に対応する。高バインダー血清/血漿は、低バインダーから好中球へのIMPRIME PGG結合を増大させることができる。高バインダー血清中の抗 $\alpha$ -グルカン抗体は、非許容結合条件での低バインダーにおける好中球IMPRIME PGG結合を増大させることができる。例えば、高い自然の抗 $\alpha$ -グルカン抗体価を含む静注用免疫グロブリン(IVIg)は、低バインダーから好中球へのIMPRIME PGG結合を増大させることができる。自然の抗 $\alpha$ -グルカンIgG及び/又はIgM抗体は好中球及び単球への結合に参与する。特定の理論に縛られることを望むものではないが、自然の抗 $\alpha$ -グルカン抗体(例えばIgG及びIgM)はIMPRIME PGGに結合する。IMPRIME PGGは、補体活性化の古典経路を介してオブソニン化される。オブソニン化されたIMPRIME PGGは好中球及び単球上のCR3受容体のレクチン様ドメインに結合する。IMPRIME PGGのオブソニン化(すなわちiC3b沈着)が、抗体結合後に補体活性化の古典経路の結果として起こる。いくつかの機能的なマーカーは、例えばC4a、C5a及びSC5b-9などのIMPRIME PGGの好中球及び/又は単球結合の過程で調節される。

40

50

## 【 0 0 1 9 】

全血試料中の好中球及び/又は単球への I M P R I M E P G G 結合は、例えばフローサイトメトリーを使用するアッセイを用いて再現性よく測定することができる。しかしながら、そのようなアッセイのための全血の使用はある課題を提示する。例えば、血液試料は採取の 24 時間以内に受け取られ、処理されることを必要とするため、それは生きている健康な細胞を必要とする。したがって、輸送条件及び環境要因は血液細胞を損傷し得る。そのようなアッセイは、既知の高バインダー及び低バインダーの対象からの対照血液試料も必要とした。最終的に、概念上は単純なアッセイであっても、フローサイトメトリー技術は多くの臨床研究室では一般的ではない。したがって、フローサイトメトリーに基づくアッセイは臨床開発には実用的なアッセイではない。

10

## 【 0 0 2 0 】

本開示は、ヒト血清試料中の内因性抗 - グルカン抗体レベルを測定するための単純な定量的 E L I S A を含む方法を提供する。該方法は、実用的な臨床試験の開発のためのフローサイトメトリーに基づくアッセイにより提示された課題を克服する。血清ベースの E L I S A アッセイは一般的な臨床アッセイであり、ほとんどの臨床研究室で行うことができる。また、血清試料は凍結することができ、より容易な貯蔵、輸送及びアッセイ性能の一貫性をもたらす。

## 【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態では、 - グルカンは、酵母、例えば、出芽酵母 ( S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ) に由来してよい。いくつかの実施形態では、 - グルカンは、 - 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 2 2 】

いくつかの実施形態では、免疫細胞に結合された - グルカンは、 - 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 - 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。 - 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 号明細書に記載の、 B f D I、B f D I I、B f D I I I 及び/又は B f D I V ( バイオセラ、イーガン、ミネソタ州 ) として特定されるモノクローナル抗体を含む。

30

## 【 0 0 2 3 】

血清中の抗体の量を測定する従来の手法は、試料が連続的に希釈されるアッセイの文脈において E L I S A の使用を典型的に含む。段階希釈物は E L I S A アッセイに供され、血清試料中の抗体の量は、陽性アッセイ反応を生じる血清試料の最大希釈に基づいて推定される。得られる力価の値は、抗体の量の正確な測定値ではなく、希釈範囲内の推定値である。段階希釈法は、血清中の抗体の量 ( 力価レベル ) を決定するために血液学において頻繁に用いられる。力価レベルを決定することは、ワクチンに対する抗体反応を評価するために頻繁に用いられる。しかしながら、段階希釈法では、産生される抗体の正確な量を直接に測定することができない。その代わりに、希釈範囲内で産生される抗体の量を推定するしかない。それゆえ力価レベルは、データ及び/又は統計的な分析技術の変更をすることなく直接的な方法での標準的な統計分析に適していない。

40

## 【 0 0 2 4 】

対照的に、本開示はヒト血清中の I M P R I M E P G G に対する自然の抗 - グルカン抗体を測定する E L I S A に基づく方法を提供する。該方法は自然の抗 - グルカン抗体の量を、統計的要件内の相対抗体単位 ( R A U ) 又は抗 - グルカン抗体濃度のいずれかとして定量的に測定することを含む。これは、同じアッセイにおいて力価を得ること、及び R A U データ又は抗体濃度データ ( いずれも検量線から決定される ) のいずれかを相関させることによって達成される。したがって、本明細書に記載される方法は、自然の抗

50

- グルカン抗体の確立されたレベルを有する血清から内部標準曲線を作成することを含む。また該方法は、相対的又は実際の抗 - グルカン抗体を定量的に測定する、力価を測定するよりも優れた方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

該方法は、抗 - グルカン I g G 及び / 又は抗 - グルカン I g M を測定することに使用することができる。I g G 及び / 又は I g M についての R A U の計算結果を表 7 に示す。I g G 及び / 又は I g M についての抗体濃度の計算結果を表 8 及び表 9 にそれぞれ示す。該方法はアッセイ内精度 ( i n t r a - a s s a y p r e c i s i o n )、すなわちプレート間の再現性 ( r e p r o d u c i b i l i t y ) を与える。該方法はアッセイ間精度 ( i n t e r - a s s a y p r e c i s i o n )、すなわち、対照及び試験血清試料についてアッセイ及び / 又はアッセイ日間の再現性も与える。該方法は、一人のオペレーターによって異なる試験プレート上で分析された複数の試料を評価することを可能にする。したがって該方法は、1日に複数の試料を分析する一人のオペレーターの手によってであろうと、複数日にわたって複数のオペレーターの手によってであろうとも、信頼性、再現性のある結果を与える。

【 0 0 2 6 】

結合及び機能に必要な抗 - グルカン抗体レベルは個体により変動し得る。図 2 は、I V I G による抗 - グルカン I g G R A U レベルの用量依存的な増加を示す。該方法は、I M P R I M E P G G に反応しないであろう個体を除外することになる R A U レベルを同定し、そして反応するより高い確率を有するバイオマーカー陽性の対象を富ませる、バイオマーカーのカットオフを使用することを含む。結合及び機能的データは I V I G - 5 グループ ( R A U 2 3 3 ~ 6 1 0 ) で生じる最大活性を示し、それゆえ、I g G のカットオフについてのさらなる解析は 2 0 0 を超える R A U 範囲に焦点を置くべきである ( 図 7 )。

【 0 0 2 7 】

3 2 人の健常なボランティアにおける最初の研究は、好中球又は単球における I M P R I M E P G G の結合及び機能に必要な自然の抗 - グルカン抗体の特定の最小レベル ( I g G 及び / 又は I g M の R A U ) を確立するために行われた。I g G 及び / 又は I g M の抗 - グルカン抗体濃度として定量された最小レベルは、健常な対象のより大きなコホート ( n = 1 4 3 ) を用いてさらに最適化され、そして好中球及び単球への I M P R I M E P G G の結合、I M P R I M E P G G 誘導性の機能変化、並びに臨床転帰に関して、上昇した抗 - グルカン抗体レベルの重要性を確認した。好中球及び単球への I M P R I M E P G G 結合をもたらす抗 - グルカン抗体レベルを有する対象は「バイオマーカー陽性」とみなされる。対象が I M P R I M E P G G を含む治療により良く反応するために、対象が代替処置を受けるか、抗 - グルカン抗体処置を受けることができるように、バイオアッセイは、好中球及び単球への I M P R I M E P G G 結合にとって低すぎる抗 - グルカン抗体レベルを有する臨床設定において対象を同定することを可能にする ( 「バイオマーカー陰性」 )。また、バイオマーカー陽性個体はバイオマーカー陰性個体よりも免疫適格であってもよく、したがって免疫療法薬により良く反応し得る。

【 0 0 2 8 】

R A U 法を使用する場合、少なくとも最小 I g G R A U 所定値の I g G R A U を有すること、及び / 又は、少なくとも最小 I g M R A U 所定値の I g M R A U を有することによって、個体をバイオマーカー陽性とすることができる。いくつかの実施形態では、I g G R A U 所定値は、少なくとも 2 0 0、例えば、少なくとも 2 0 5、少なくとも 2 1 0、少なくとも 2 1 5、少なくとも 2 2 0、少なくとも 2 2 5、少なくとも 2 3 0、少なくとも 2 3 5、少なくとも 2 4 0、少なくとも 2 4 5、少なくとも 2 5 0、少なくとも 2 5 5、少なくとも 2 6 0、少なくとも 2 6 5、少なくとも 2 7 0、又は少なくとも 2 7 5、とすることができる。いくつかの実施形態では、I g M R A U 所定値は、少なくとも 3 0 0、例えば、少なくとも 3 0 5、少なくとも 3 1 0、少なくとも 3 1 5、少なくとも 3 2 0、少なくとも 3 2 5、少なくとも 3 3 0、少なくとも 3 3 5、少なくとも 3 4

10

20

30

40

50

0、少なくとも345、少なくとも350、少なくとも355、少なくとも360、少なくとも365、少なくとも370、又は少なくとも375、とすることができる。すなわち、例えば少なくとも200のIgG RAU、又は、例えば少なくとも300のIgM RAUは、少なくとも5%の好中球結合 - グルカン、ならびに - グルカン「高バインダー」状態に関連する好中球及び単球の機能的調節を示す個体と理論的に相関する。

【0029】

例えば、図8は、計算されたIgG RAUの機能として32人の健常なボランティアのそれぞれについてのパーセントの好中球結合のプロットを示す。5%の好中球結合における水平線は、「低バインダー」から「高バインダー」を線引きする。そのIgG RAUが低すぎて5%超の好中球と結合できないそれらボランティアと、そのIgG RAUが少なくとも5%のそれらの好中球結合 - グルカンを示すのに十分であったボランティアとを区別するために、本発明者らは235のIgG RAUにおけるカットオフラインを確立し(図10)、最低IgG RAU値の下で最も近い値は5%よりも高い好中球結合 - グルカン(239)を示した。本発明者らはその後、5%よりも多い好中球結合 - グルカンを有したが、IgGバイオマーカー陰性であった3人の個体のレベルを評価した(図9、丸で囲った)。それら3人の個体はIgGバイオマーカー陰性、すなわち235未満のIgG RAUであったが、それにもかかわらず少なくとも5%のそれらの好中球結合 - グルカンを示した。好中球結合をIgM RAUの機能としてプロットした場合、330のIgM RAUカットオフ値を確立した(図13)。

【0030】

さらに最適化される抗体濃度方法を使用する場合、少なくとも最小IgG抗 - グルカン抗体濃度所定値のIgG抗 - グルカン抗体濃度を有すること、及び/又は、少なくとも最小IgM抗 - グルカン抗体濃度所定値のIgM抗 - グルカン抗体濃度を有することによって、個体をバイオマーカー陽性とすることができる。全血の同一ドロー由来の血清からのIMP RIME PGG結合及び抗 - グルカン抗体濃度測定を健常なボランティア、N=143において評価した。N=143の個体について決定されるIgG及びIgM抗 - グルカン抗体濃度の範囲は、それぞれ1.13~209.8 µg/ml(7.8~1447.8 RAU/ml)及び5.3~2032.7 µg/ml(12.8~4878.4 RAU/ml)であった。好中球及び単球のいずれも、それぞれ約14 µg/ml(100 RAU/ml)及び42 µg/ml(100 RAU/ml)のIgG及びIgM抗 - グルカン抗体レベルで、より頻繁に5%よりも高い結合を示した。

【0031】

それゆえ、いくつかの実施形態では、IgG抗 - グルカン抗体濃度所定値は、少なくとも14 µg/ml(100 RAU)、例えば、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、又は少なくとも80 µg/ml(100 RAU)、とすることができる。いくつかの実施形態では、IgM抗 - グルカン抗体濃度所定値は、少なくとも42 µg/ml、例えば、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも160、少なくとも170、少なくとも180、少なくとも190、少なくとも200、少なくとも210、少なくとも220、少なくとも230、少なくとも240、少なくとも250、少なくとも260、少なくとも270、少なくとも280、少なくとも290、少なくとも300、少なくとも310、少なくとも320、少なくとも330、少なくとも340、少なくとも350、少なくとも360、少なくとも370、少なくとも380、少なくとも390、少なくとも400、少なくとも410、少なくとも420、少なくとも430、少なくとも440、少なくとも450、少なくとも460、少なくとも470、少なくとも480、少なくとも490、少なくとも500、少なくとも510、少なくとも520、少なくとも530、少なくとも540、又は少なくとも550 µg/ml(100 RAU)、とすこ

10

20

30

40

50

とができる。すなわち、例えば少なくとも14 μg/mlのIgG抗 - グルカン抗体濃度又は、例えば少なくとも42 μg/mlのIgM抗 - グルカン抗体濃度は、少なくとも5%の好中球又は単球結合 - グルカン、ならびに - グルカン「高バインダー」状態に関連する好中球及び単球の機能的調節を示す個体と理論的に相関する。

【0032】

図23及び図24は、計算された(A)IgG及び(B)IgM抗 - グルカン抗体濃度の機能として、健常な各ボランティアについてのパーセントの好中球及び単球結合のプロットを示す。示されるように、IgG及び/又はIgM抗 - グルカン抗体濃度が上昇するにつれて、好中球及び単球へのIMPRIME PGG結合が増加する。

【0033】

図25及び図26に示されるように、高及び低IMPRIME PGGバインダーを区別する5%の結合レベルで、IgG及びIgM抗 - グルカン抗体濃度と、好中球及び単球両方の結合との間には強い相関関係があった。抗 - グルカン抗体濃度と、年齢、性別又は総免疫グロブリンとの間には相関関係は無かった(データは示さず)。

【0034】

次に、143人の健常なボランティアにおいて抗 - グルカン抗体濃度の探索的なカットオフを調査した。IMPRIME PGGの好中球及び単球両方の結合について5%のレベルを使用して、抗 - グルカン濃度の感度と特異度との間の相関関係を、ROC曲線解析を用いて決定した(図27及び図28)。結合について95%の最初の探索的な特異度で、抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを決定し、健常な集団におけるバイオマーカーの保有率(prevalence)と、結合状態を決定するためのその感度の両方を計算するために使用した。結果を表1に示す。

【0035】

【表1】

表1

パラメータ	好中球結合に基づく		単球結合に基づく	
	IgG	IgM	IgG	IgM
カットオフ(μg/ml)	51	118	40	126
保有率 (バイオマーカー陽性)	36%	20%	41%	15%
	全体で46%		全体で48%	
感度 (バイオマーカー陽性)	64%	33%	62%	22%
	全体で75%		全体で66%	

【0036】

陽性のIgG抗 - グルカンバイオマーカー状態は、一連のカットオフのいずれかを使用するイン・ビトロのIMPRIME PGGの生物学的活性と高度に相関している。しかしながら、ROC曲線解析によって示されるように、異なるカットオフにおける同様の感度はIMPRIME PGGの生物学的活性と相関する抗 - グルカン抗体濃度の範囲を示す。

【0037】

それゆえ、種々の抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを調査し、そして該カットオフが高バインダー及び低バインダー(バイオマーカー陽性及びバイオマーカー陰性)状態へと個体を理論的に分離するかどうかを判断するために機能的エンドポイントを用いた。IL-8産生をIgG抗 - グルカン抗体濃度のカットオフの範囲を探索するために機能的エンドポイントとして使用した。結果を表2に示す。

【0038】

10

20

30

40

【表 2】

表2

カットオフ (RAU/ $\mu$ g/ml)	好中球への結合	単球への結合	IL-8 産生	およその 特異度/感度
100/14	<0.0001	<0.0001	0.0132	44.90/92.55
125/18	<0.0001	<0.0001	0.0019	59.18/88.30
150/22	<0.0001	<0.0001	0.0002	69.39/79.79
175/25	<0.0001	<0.0001	<0.0001	77.55/74.47
200/29	<0.0001	<0.0001	<0.0001	81.63/72.34
276/40	<0.0001	<0.0001	<0.0001	97.96/60.64
351/51	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/54.26
400/60	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/48.94
425/62	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/47.87
450/65	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/45.74
475/69	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/42.55
500/72	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/40.43
525/76	<0.0001	<0.0001	<0.0001	100/39.36
550/80	<0.0001	<0.0001	0.0009	100/35.11

10

20

【0039】

同様に、C4a / SC5b9産生をIgM抗 - グルカン抗体濃度のカットオフの範囲を探索するために機能的エンドポイントとして使用した。結果を表3に示す。

【0040】

【表 3】

表3

カットオフ (RAU/ $\mu$ g/ml)	好中球への結合	単球への結合	C4a 産生	およその 特異度/感度
100/42	0.0001	<0.0001	N/A	67.35/68.09
150/63	<0.0001	<0.0001	N/A	77.55/54.26
200/83	<0.0001	<0.0001	0.1331	85.71/42.55
250/104	<0.0001	<0.0001	0.0587	93.88/30.85
300/125	<0.0001	<0.0001	0.0363	95.92/21.28
350/146	<0.0001	<0.0001	0.0869	97.96/14.89
400/167	0.0022	0.0007	N/A	97.96/11.7
450/188	0.0034	0.0004	N/A	100/8.51
500/208	0.0034	0.0004	N/A	100/7.44
550/229	0.0016	0.0003	N/A	100/6.38

30

40

【0041】

データから明らかのように、特定のIgG抗 - グルカン抗体濃度又はRAUのカットオフは、ROC曲線解析を用いる臨床試験における患者の層別化又は選択に必要であると見なされる、特異度及び感度の組み合わせに応じて選択することができる。例えば、276RAU/ml又は40 $\mu$ g/mlのカットオフは、健常なボランティアにおけるIMP RIME PGGの好中球及び単球結合のROC曲線解析に基づく、約98%の特異度及び61%の感度を有するであろう。

50

## 【 0 0 4 2 】

ここで用いられる C 4 a 産生のような機能解析に基づく、I g M 抗 - グルカン抗体濃度又は R A U のカットオフの合理的な範囲は、2 0 0 ~ 3 5 0 R A U / m l 又は 8 3 ~ 1 4 6  $\mu$  g / m l であってもよい。上記のように、特定の I g M 抗 - グルカン抗体濃度又は R A U のカットオフは、特定の臨床試験における患者の層別化又は選択に必要であると見なされる、特異度及び感度の組み合わせに応じて選択することができる。例えば、2 5 0 R A U / m l 又は 1 0 4  $\mu$  g / m l のカットオフは、健常なボランティアの I M P R I M E P G G の好中球及び単球結合の R O C 曲線解析に基づく、約 9 4 % の特異度及び 3 1 % の感度を有するであろう。

## 【 0 0 4 3 】

さらなる支持として、表 1 に示されるカットオフを使用すると、バイオマーカーの状態は、補体成分 C 3 a、C 5 a、S C 5 b 9 の活性化、好中球 C R 1、C R 3、C D 8 8 及び C D 6 2 L 表面マーカー発現の調節、ならびに I L - 8 誘導を含む、I M P R I M E P G G により誘導される機能的変化と相関する。結果を表 4 に示す。

## 【 0 0 4 4 】

## 【表 4】

表4

機能	全バイオマーカーステータスによる比較 <sup>1</sup>	
	好中球由来のカットオフ <sup>2</sup>	単球由来のカットオフ <sup>3</sup>
C4a 倍率増加 (n=32)	0.0002	0.0002
C5a 倍率増加 (n=32)	0.0037	0.0037
SC5b9 倍率増加 (n=32)	<0.0001	<0.0001
IL-8 倍率増加 (n=129)	0.0006	0.0008
好中球結合 (n=143)	<0.0001	<0.0001
好中球 CR1 倍率増加 (n=32)	0.2585	0.2085
好中球 CR3 倍率増加 (n=40)	0.0249	0.0249
好中球 CD88 倍率減少 (n=32)	0.0074	0.0074
好中球 CD62L 倍率減少 (n=32)	0.0058	0.0058
単球結合 (n=143)	<0.0001	<0.0001
単球 CR1 倍率増加 (n=36)	0.0023	0.0028
単球 CR3 倍率増加 (n=37)	0.0007	0.0007
単球 CD88 倍率減少 (n=37)	0.0801	0.0801

<sup>1</sup> p値

<sup>2</sup> 51  $\mu$  g/ml の好中球 I g G 抗  $\beta$  - グルカン抗体濃度カットオフ及び 118  $\mu$  g/ml の I g M カットオフ

<sup>3</sup> 40  $\mu$  g/ml の単球 I g G 抗  $\beta$  - グルカン抗体濃度カットオフ及び 126  $\mu$  g/ml の I g M カットオフ

## 【 0 0 4 5 】

バイオマーカーのカットオフをその後 I M P R I M E P G G を含む肺がんの治療を研究する 2 つの臨床試験において患者に適用した。第 1 の無作為化、第 2 相試験では、5 9 人のステージ I V の N S C L C 患者が、最初の 4 から 6 サイクルについてそれぞれ 3 週の処置サイクルの 1、8 及び 1 5 日目に I M P R I M E P G G 4 m g / k g を含み、又は含まず（対照）に、セツキシマブ、カルボプラチン、及びパクリタキセルの投与を受けた。セツキシマブ単独で、又は I M P R I M E P G G との組み合わせによる維持治療を疾患の進行まで続けた。上記の健常なボランティアのデータ及び機能的データによって確立された範囲内の種々のポイントにおけるカットオフを調べた。結果を表 5 に示す。

## 【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

【表5】

表5

IgG/IgM カットオフ	バイオマーカー+の数	全生存中央値(月)		生存の差
		バイオマーカー+	バイオマーカー-	
IgG: 51 $\mu$ g/ml IgM: 118 $\mu$ g/ml	25	429	261	168
IgG: 30 $\mu$ g/ml IgM: 60 $\mu$ g/ml	41	289	162	127
IgG: 40 $\mu$ g/ml IgM: 80 $\mu$ g/ml	32	373	217.5	155.5
IgG: 60 $\mu$ g/ml IgM: 130 $\mu$ g/ml	23	378	244	134

10

## 【0047】

全生存中央値 (Median Overall Survival) (OS) は臨床試験現場で研究員によって決定された。一部の患者については、バイオマーカーの状態が処置の経過中に変化する。それゆえ、バイオマーカー陽性状態が、第1又は第2サイクルのいずれかで上記カットオフを測定する患者へと与えられた。

20

## 【0048】

例として、51  $\mu$ g/mlのIgG抗 - グルカン抗体濃度、118  $\mu$ g/mlのIgM抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを使用すると、25人の患者がバイオマーカー陽性である。バイオマーカー陽性患者は、バイオマーカー陰性患者についての261日と比較して、429日の全生存中央値を有した。したがって、2つのグループ間の生存の差は有意差である168日である。ここで与えられた例のうち、このカットオフは本臨床試験における最良の分離をもたらす。残りの例のカットオフは2つのグループ間でより小さい全生存中央値の差をもたらす。しかしながら、ある場合に、カットオフを引き下げることによってより多くの患者を治療することは理想的であり得る。そして上述のように、ROC曲線解析を用いて、患者の分離をカスタマイズするために必要に応じて特異度及び感度を変更することができる。

30

## 【0049】

第2の無作為化、第2相試験では、58人のステージIVのNSCLC患者が、上記試験と同様の処置サイクルでIMPRIME PGG 4mg/kgを含み、又は含まず(対照)に、ペバシズマブ、カルボプラチン、及びパクリタキセルの投与を受けた。ペバシズマブ単独で又はIMPRIME PGGとの組み合わせによる維持治療を疾患の進行まで続けた。上記の健常なボランティアのデータ及び機能的データによって確立された範囲内の種々のポイントにおけるカットオフを調べた。結果を表6に示す。

## 【0050】

40

【表6】

表6

IgG/IgM カットオフ	バイオマーカー+の数	全生存中央値(月)		生存の差
		バイオマーカー+	バイオマーカー-	
IgG: 60 $\mu$ g/ml IgM: 100 $\mu$ g/ml	18	553	357	196
IgG: 38 $\mu$ g/ml IgM: 60 $\mu$ g/ml	26	474	437.5	36.5
IgG: 80 $\mu$ g/ml IgM: 120 $\mu$ g/ml	16	419	483	-64
IgG: 50 $\mu$ g/ml IgM: 80 $\mu$ g/ml	25	474	437.5	36.6

10

## 【0051】

本臨床試験について、最適なカットオフは、60  $\mu$ g/ml の IgG 抗 - グルカン抗体濃度及び 100  $\mu$ g/ml の IgM 抗 - グルカン抗体濃度で生じる。残りの例によって示されるように、そのカットオフのいずれかの側のカットオフはすぐに機能せず、実用的な差異を与えない。

20

## 【0052】

さらに、所望の (ROC 曲線解析により計算された) 特異度及び感度に応じて、抗 - グルカン抗体の補充をすることなく IMPRIME PGG 処置に反応する患者の層別化を達成するために適切なカットオフを選択することができる。

## 【0053】

バイオマーカーの状態 (高バインダー対低バインダー) に基づく患者の分離は、上述の範囲内のカットオフを使用して達成することができる。したがって、バイオマーカーの状態は、成功した - グルカン免疫療法の予測因子として使用することができる。

## 【0054】

上述のように、一部の患者のバイオマーカー状態は治療の過程で変化し得る。それゆえ本発明者らは、治療の1サイクル後にバイオマーカー陽性状態を示した患者、対、治療の任意のサイクル後 - C1 / C2 / C3 のいずれか1つの後 - にバイオマーカー陽性状態を示した患者についての、カットオフ値を評価した。

30

## 【0055】

【表 7】

表7 化学療法の1サイクル後のバイオマーカー陽性状態を示すバイオマーカー陽性患者の全生存

IgG/IgM カットオフ ( $\mu\text{g/ml}$ )	中央値 OS (ペバシズマブ)		中央値 OS (セツキシマブ)	
	BM +	BM -	BM+	BM-
34/146 (235/330 RAU)	401	471.5	283	275
35/100 (242/240 RAU)	478	350	308	263
40/100 (276/240 RAU)	482	343	373	247.5
45/100 (311/240 RAU)	514	338.5	375.5	251
50/100 (345/240 RAU)	514	338.5	375.5	251
55/100 (380/240 RAU)	546	343	373	254.5
60/100 (414/240 RAU)	553	338.5	308	266.5
35/110 (242/264 RAU)	478	350	308	263
40/110 (276/264 RAU)	482	343	378	247.5
45/110 (311/264 RAU)	514	338.5	387.5	251
50/110 (345/264 RAU)	482	343	387.5	251
55/110 (380/264 RAU)	514	350	378	254.5
60/110 (414/264 RAU)	546	343	308	266.5
35/120 (242/288 RAU)	456	374.5	308	263
40/120 (276/288 RAU)	474	357	378	247.5
45/120 (311/288 RAU)	478	350	387.5	251
50/120 (345/288 RAU)	474	357	387.5	251
55/120 (380/288 RAU)	474	364	378	254.5
60/120 (414/288 RAU)	478	360.5	308	266.5

## 【 0 0 5 6 】

例として、バイオマーカー陽性患者とバイオマーカー陰性患者とを分ける、 $60\mu\text{g/ml}$ のIgG抗 - グルカン抗体濃度、 $100\mu\text{g/ml}$ のIgM抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを使用すると、ペバシズマブ治療を受けるバイオマーカー陽性患者は同じカットオフ値を使用するバイオマーカー陰性患者よりも200日超多い全生存中央値を有した。同様に、 $45\mu\text{g/ml}$ のIgG抗 - グルカン抗体濃度、 $110\mu\text{g/ml}$ のIgM抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを使用すると、セツキシマブ治療を受けるバイオマーカー陽性患者は同じカットオフ値を使用するバイオマーカー陰性患者よりも130日超多い全生存中央値を有した。表5及び表6に提示されるデータに関して上述のように、ROC曲線解析を用いて患者の分離をカスタマイズするために必要に応じて、特異度及び感度の所望の組み合わせについて適切なカットオフ値を選択することができる。

## 【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

【表 8】

表8 化学療法の任意のサイクル後のバイオマーカー陽性ステータスを示すバイオマーカー陽性患者の全生存

IgG/IgM カットオフ ( $\mu\text{g/ml}$ )	中央値 OS (ベバシズマブ)		中央値 OS (セツキシマブ)	
	BM +	BM -	BM+	BM-
34/146 (235/330 RAU)	438	551	308	244
35/100 (242/240 RAU)	478	499	298.5	244
40/100 (276/240 RAU)	482	483	328	217.5
45/100 (311/240 RAU)	514	437.5	378	244
50/100 (345/240 RAU)	514	437.5	378	244
55/100 (380/240 RAU)	514	437.5	375.5	244
60/100 (414/240 RAU)	546	392	373	247.5
35/110 (242/264 RAU)	478	499	308	244
40/110 (276/264 RAU)	482	483	328	217.5
45/110 (311/264 RAU)	514	437.5	397	244
50/110 (345/264 RAU)	482	483	397	244
55/110 (380/264 RAU)	482	483	387.5	244
60/110 (414/264 RAU)	514	437.5	378	247.5
35/120 (242/288 RAU)	456	533	308	244
40/120 (276/288 RAU)	474	515	328	217.5
45/120 (311/288 RAU)	478	499	397	244
50/120 (345/288 RAU)	474	515	397	244
55/120 (380/288 RAU)	456	525.5	387.5	244
60/120 (414/288 RAU)	474	515	378	247.5

## 【 0 0 5 8 】

ここでまた、バイオマーカー陽性患者の生存率を最大にするために適切な IgG 及び IgM カットオフ値を選択することができる。例えば、 $60\mu\text{g/ml}$  の IgG 抗 - グルカン抗体濃度、 $100\mu\text{g/ml}$  の IgM 抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを使用すると、ベバシズマブ治療を受けるバイオマーカー陽性患者は同じカットオフ値を使用するバイオマーカー陰性患者よりも 150 日超多い全生存中央値を有した。 $45\mu\text{g/ml}$  又は  $50\mu\text{g/ml}$  のいずれかの IgG 抗 - グルカン抗体濃度、及び  $110\mu\text{g/ml}$  又は  $120\mu\text{g/ml}$  のいずれかの IgM 抗 - グルカン抗体濃度のカットオフを使用すると、ベバシズマブ治療を受けるバイオマーカー陽性患者は同じカットオフ値を使用するバイオマーカー陰性患者よりも 150 日超多い全生存中央値を有した。

## 【 0 0 5 9 】

しかしながらいくつかの臨床的状況では、全生存は必ずしも最も関連性のある臨床的エンドポイントでなくともよい。場合によっては、全奏効率 (overall response rate) (ORR) はより関連性があり得る。本明細書で使用される、「全奏効率」とは、治療後のがんのサイズ及び/又は増殖の測定可能な減少を示す患者のパーセンテージをいう。表 9 のデータは、IgG 及び IgM のカットオフ値が臨床的エンドポイントとして ORR を使用して決定され得ることを示している。表 9 は、エンドポイントとして平均全生存及び全奏効率を反映する、上述のベバシズマブ及びセツキシマブの試験からの総合データを報告する。

【 0 0 6 0 】

【 表 9 】

表9

IgG/IgM カットオフ ( $\mu\text{g/ml}$ )	中央値 OS			%ORR		
	Bio+	Bio-	Diff.	Bio+	Bio-	Diff.
35/100	368.5	294	74.5	57.14%	40.38%	16.76%
40/100	387.5	286	101.5	59.57%	38.89%	20.69%
45/100	438	283.5	154.5	63.41%	38.33%	25.08%
50/100	438	283.5	154.5	63.41%	38.33%	25.08%
55/100	418	286	132	65.00%	37.70%	27.30%
60/100	446	286	160	63.16%	39.68%	23.48%
65/100	425.5	292	133.5	61.11%	41.54%	19.57%
35/110	373	293	80	57.14%	40.38%	16.76%
40/110	397.5	286	111.5	58.70%	40.00%	18.70%
45/110	454	283.5	170.5	62.50%	39.34%	23.16%
50/110	446	286	160	61.54%	40.32%	21.22%
55/110	438	289	149	63.16%	39.68%	23.48%
60/110	454	289	165	61.11%	41.54%	19.57%
65/110	454	293	161	58.82%	43.28%	15.54%
35/120	364	305	59	57.45%	40.74%	16.71%
40/120	387.5	292	95.5	59.09%	40.35%	18.74%
45/120	438	289	149	63.16%	39.68%	23.48%
50/120	418	292	126	62.16%	40.63%	21.54%
55/120	397.5	294	103.5	65.71%	39.39%	26.32%
60/120	417.5	294	123.5	63.64%	41.18%	22.46%
65/120	387.5	316	71.5	61.29%	42.86%	18.43%

10

20

30

【 0 0 6 1 】

表9は、バイオマーカー陽性とバイオマーカー陰性患者とを分けるために最も効果的なIgG/IgMカットオフ値が、分離を行うための臨床的エンドポイントとして全生存かそれとも全奏効率を使用するかによって多少異なってもよいことを示す。したがって、所与のバイオマーカー陽性患者の治療に最も関連性がある臨床的エンドポイントにかかわらず、本明細書に記載される方法はバイオマーカー陽性患者を同定するためのIgG/IgMカットオフ値を提供することができる。

【 0 0 6 2 】

本発明者らはバイオマーカーの状態を、成功した - グルカン免疫療法の予測因子として使用することができたということを確認するとすぐに、本発明者らはその後IgGサブクラスが関与したかどうかを調べた。IMPRIME PGGは糖類であり、そして糖鎖抗原へのヒトIgGの反応は主にIgG<sub>2</sub>サブクラスに限られている。IgG<sub>2</sub>は弱い補体活性因子であり、抗原 - 抗体の等量、又は抗体が過剰な場合にのみ補体活性化の古典経路を活性化する。IMPRIME PGGは補体(C4a、C5a、SC5b9)を活性化することが示されてきたが、それは細胞表面上のMAC形成による細胞溶解を引き起こさない。加えて、IMPRIME PGGは、ドナーの大多数においてベル型の濃度 - 反応曲線を示す。結合、補体活性化、及びIL - 8産生は、10又は25  $\mu\text{g/ml}$ で、ただし100  $\mu\text{g/ml}$ よりも低い場合に最適である。場合によっては、これは、抗原 - 抗体が等量である、又は抗体が10  $\mu\text{g/ml}$ 又は25  $\mu\text{g/ml}$ で過剰であることに起因し

40

50

得るが、抗原は100 μg/mlで過剰である。

【0063】

それらがIgG抗 - グルカン抗体に関連するIgGサブクラスを理解するために、IgG抗 - グルカン抗体の各サブクラスに特異的な二次抗体を用いて好中球結合を行った。まず、高バインダー及び低バインダー血清からのIgGサブクラスを好中球への結合について試験した。結果を図29に示す。結果から明らかなように、IgG<sub>2</sub>サブクラスはバイオマーカーの状態に最も強い相関関係を示した。この知見は図30に作成されたプロットにおいて検証された。高バインダー血清からのIgG<sub>2</sub>抗 - グルカン抗体の好中球結合はIgG<sub>1</sub>よりもはるかに強い相関関係をもたらした。

【0064】

それゆえ、別の実施形態では、IgG<sub>2</sub>抗 - グルカン抗体はIMPRIME PGG免疫療法のための予測バイオマーカーとして使用されてもよい。加えて、低バインダーである患者にとって、IgG<sub>2</sub>抗 - グルカンの投与はIMPRIME PGG免疫療法への患者の反応を向上させるために使用されてもよい。

【0065】

最後に、静注用免疫グロブリン(IVIg)のイン・ピボ注入が抗 - グルカン抗体レベルを増加させ、IMPRIME PGG処置への反応を向上させるということが示された。結腸直腸腺がんのためのセツキシマブ及びIMPRIME PGGの毎週の注入の併用治療を受ける54歳の患者は、処置前の血清試料で測定された低い抗 - グルカン抗体レベルを有した。患者の抗 - グルカン抗体レベルを増加させるために、IVIg(1g/kg)を、サイクル7で開始し、サイクル12まで続く28日の処置サイクルの最初の日に注入した。図31Aに示されるように、処置後の血清試料をELISAによってRAU/mlでIgG抗 - グルカン抗体レベルについて分析した。IVIgの添加は、各サイクルの1日目の試料において抗 - グルカン抗体濃度を上昇させ、その後各サイクルの残りの週の間にベースラインレベルまで低下した。図31Bでは、PMNs及び単球へのIMPRIME PGG結合のイン・ピボ結合をFACSによって分析し、投与前試料と比較したIMPRIME PGG投与後の全血試料におけるIMPRIME PGG+PMNs又は単球の増加により計算した。結合は、患者がIVIgの注入を受けた日にPMNs及び単球の両方について最も高い結合で測定された抗 - グルカン抗体濃度のレベルにより変化した。図31Cでは、補体活性化を、投与前試料と比較したIMPRIME PGG投与後の血清においてELISAにより測定された、C5aの倍率増加によって測定した。C5aレベルの2倍の増加をIVIg注入に該当する患者試料にのみ観察した。

【0066】

本明細書中に記載の方法は、 - グルカン例えばIMPRIME PGGの投与を含む治療レジメンから恩恵を受ける可能性が最も高い個体を同定することができる。したがって、本アッセイは、少なくとも部分的には、 - グルカンを含む治療に反応する対象の可能性に基づいて、医療専門家が治療的処置を個体により良く合わせることを可能にする。本アッセイは、様々な対象集団をより良く定義する臨床試験に含めるための個体をスクリーニングするために使用されてもよい。

【0067】

用語「及び/又は」は、1又は全ての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「含む」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から5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等を含む)。

【0068】

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

10

20

30

40

50

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せを含むことができる。

【0069】

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行われて良い。

【0070】

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】

【0071】

実施例 1

コスター (Costar) ユニバーサル結合プレート (IMPRIME PGG) を、精製水中  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の IMPRIME PGG (バイオセラ、イーガン、ミネソタ州) によりウェル当たり  $50 \mu\text{L}$  でコーティングし、 $37^\circ\text{C}$  で30分間インキュベートした。コーティングされたプレートを続いて  $> 1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  の高強度の紫外線に5分間室温で曝露し、5分間室温で紫外線への第二の曝露前に、乾燥するまで50の強制空気オーブン (forced air oven) 中に静置した。プレートをその後、洗浄緩衝剤 (0.05%の Tween-20 を含むリン酸緩衝食塩水 [PBS]) で洗浄する前に、30分超、ウシ血清アルブミン (BSA) の0.5%溶液でブロックした。各アッセイの実行は2つのアッセイプレートを含んだ。各プレートは参照ヒト血清を連続的に希釈することによって作成された検量線を含んだ。プレートは参照血清として同様に希釈された4つの試験血清試料も含んだ。検量線のための希釈系列及び血清試料は、1:400希釈から開始し、連続的な1:2希釈から最低希釈の1:51,200で続けた。希釈物は洗浄緩衝剤で作成された。参照血清の1:50の希釈を曲線上の最も高いアンカーポイントとして使用した。参照及び血清試料の各希釈を2つのプレートのそれぞれにおける複製 (replicate) ウェルで評価した。

【0072】

ヒト IgG にプレート結合 IMPRIME PGG への結合を可能にするため、試料をアッセイプレート上で室温で90分間インキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを洗浄緩衝剤で洗浄し、酵素標識二次抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したアフィニティー精製されたヤギ抗ヒト IgG、Fc ガンマ特異的抗体) をウェル中でインキュベートし、IMPRIME PGG 抗原に結合したヒト IgG に結合させた。二次抗体を洗浄緩衝剤で洗浄する前に90分間インキュベートした。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分の発色現像において発色現像を  $\sim 1 \text{M}$  の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  $450 \text{nm}$  での光学密度を測定し、複製ウェルからの平均を算出した。

【0073】

結果を2つの方法で計算した:

1) 力価: 力価を、 $0.1 \text{OD}$  よりも大きい又は等しい光学密度測定値を有する試料の最大希釈係数として決定した。

2) RAU - 任意の値の160を参照血清に割り当てた (160 相対抗体単位 (RAU/mL)) したがって、アッセイ方法における1:400希釈は、検量線上の最高点として  $400 \text{mRAU}/\text{mL}$  の値をもたらす。希釈値及び対応する RAU 値を表10に記載する。

【0074】

【表 10】

表10

希釈	平均 OD	計算された濃度 (mRAU/ml)	計算された濃度× Dil	1000で割った= RAU/ml
400	1.577	404.6		
800	1.493	322.2	257749	258
1600	1.369	239.3	382912	383
3200	1.031	119.9	383683	384
6400	0.715	64.3	411398	411
12800	0.393	29.5	378022	378
25600	0.204	14.7	377574	378
51200	0.105	8.0		

10

## 【0075】

試料及び対照についてのRAU値を、検量線として参照ヒト血清希釈系列を使用して4パラメーターフィットにより計算した。検量線の直線部分に含まれる各試料希釈についてのmRAUでの濃度を検量線からの補間によって計算し、希釈の補正に続く。その後、それらの逆算された複数希釈から各試料の平均濃度を導き出した。

20

結果を図1Aに示す。

## 【0076】

## 実施例2

IgG及びIgM抗 - グルカン抗体の「至適参照標準 (gold reference standards)」を、市販の、プールされた正常ヒト血漿由来の95%純度の総IgG及びIgM画分 (アセンズ・リサーチ・アンドテクノロジー (Athens Research and Technology)、アテネ、GA) から精製した。IgG及びIgM画分をIMPRIME PGGアフィニティーカラムを通過させ、濃縮し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて純度を特徴づけた。図22参照。「至適参照標準」の段階希釈を、標準曲線を生成するための以下に記載の方法によって、検量線を作成するために使用した。アッセイの実用参照標準を、「至適参照標準」に対するキャリブレーションによって決定される抗 - グルカン濃度を有するプールされた正常ヒト血清から調製した。アッセイの対照を、実用標準曲線上の定義された位置に近い抗 - グルカン濃度を有する選択された個々の対象からの正常ヒト血清から調製した。

30

## 【0077】

MAXISORP flat bottom 96 - ウェルプレート (サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック (Thermo Fisher Scientific)、ウォルサム、マサチューセッツ州) を、D - PBS (コーニング・インク (Corning Inc.))、トゥックズベリー、マサチューセッツ州) 中、3 µg/mlでのIMPRIME PGGのウェル当たり100 µLでコーティングする。プレートをカバーし、しっかり密封されたジップクロージャープラスチックバッグに入れて、最低でも15時間そして最大で24時間、4 でインキュベートする。コーティングされたプレートをその後冷蔵庫から取り出し、吸引して、洗浄緩衝剤 (PBS中の0.05%ポリソルベート20 (アルファ・エイサー (Alfa Aesar)、ワード・ヒル、マサチューセッツ州)) で3回洗浄する。最終吸引後、コーティングされた各プレートをペーパータオルで完全に包み、ペーパータオルのクッション上で3回強く叩いて、残りの液体を除去する。プレートをその後、ウェル当たり250 µlのStabil Coat Immunoassay Stabilizer (サーモディクス・インク (SurModics, Inc

40

50

。)、エデン・プレイリー、マサチューセッツ州)で1から3時間、ベンチトップ上でブロックする。ブロッキング後、プレートを吸引して内容物を除去し、ペーパータオルに包む。上述の、残りの液体を除去するための叩く工程を繰り返す。プレートのカバーを外し、最低でも45分間そして3時間まで、ベンチトップ上で乾燥させる。

【0078】

各アッセイは実用参照試料を連続的に希釈することによって作成される実用標準曲線を含んだ。実用参照試料の希釈系列を表11及び12に示す。アッセイは1:20、1:400及び1:1600に希釈された対照及び試験試料も含む。希釈物は洗浄緩衝剤で作成された。参照及び血清試料の各希釈を3連で評価した。

【0079】

ヒトIgG及び/又はIgMにプレート結合IMPRIME PGGへの結合を可能にするため、試料を310rpmに設定された2mmの軌道直径を有するオービタルシェイカー上で、アッセイプレートで室温で45分間インキュベートした。インキュベーション後に、ウェルを洗浄緩衝剤で洗浄し、酵素標識二次抗体(西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したアフィニティー精製されたヤギ抗ヒトIgG及び/又はIgM、Fcガンマ特異的抗体)をウェル中でインキュベートし、IMPRIME PGG抗原に結合したヒトIgG及び/又はIgMに結合させた。二次抗体を洗浄緩衝剤で洗浄する前に45分間インキュベートした。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分の発色現像において発色現像を~1Mの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450nmでの光学密度を測定し、複製ウェルからの平均を算出した。

【0080】

IgG及びIgM抗 - グルカン抗体濃度( $\mu\text{g/ml}$ )を、実用参照試料希釈物から作成された実用標準曲線に対して試料の吸光度を相関させることによって決定した。検量線のための希釈値及び対応する濃度を表11及び12に記載する。

【0081】

【表11】

表11. 標準曲線のためのIgG希釈

希釈	平均 OD	計算された平均濃度 (ng/ml)
1:10	2.859	42073.3
1:100	2.626	191.0
1:400	2.214	58.2
1:800	1.773	29.1
1:1600	1.161	13.7
1:3200	0.674	7.1
1:12800	0.202	2.0

【0082】

## 【表 1 2】

表12. 標準曲線のためのIgM希釈

希釈	平均 OD	計算された平均濃度 (ng/ml)
1:6.26	2.642	11176.3
1:50.08	2.133	1354.7
1:100.17	1.706	664.4
1:200.33	1.227	338.5
1:801.38	0.454	83.7
1:3204.76	0.158	20.8
1:12819	0.079	5.2

10

## 【0083】

表 1 1 及び 1 2 のデータから得られる標準曲線をそれぞれ図 1 B 及び 1 C に示す。一度、試験試料の抗体濃度を標準曲線によって決定すると、濃度は計算された平均濃度に希釈係数を掛け、その後 1 0 0 0 で割られることによって  $\mu\text{g} / \text{ml}$  に変換され得る。

## 【0084】

20

## 実施例 3

全血 (WB) を健常なボランティアからヘパリン含有チューブ (BD バキュテイナ (Vacutainer) ヘパリンナトリウムチューブ、ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson)、フランクリン・レイク、ニュー・ジャージー州) に採取した。本試験に使用されるIVI GはPrivigen、100 mg / mLでのヒト多価ヒト免疫グロブリンの10%溶液 (CSLベーリング (CSL Behring)、キング・オブ・プルシア、ペンシルバニア州) であった。試料を、2.5 mg / mL、5 mg / mL、及び10 mg / mLの最終濃度までのPBS中のIVI Gの希釈物、ならびにPBSのみの対照に添加した。

## 【0085】

30

IVI Gに添加された血液のアリコートをその後IgG RAUアッセイ、並びにIMPRIME PGG誘導の補体経路活性化、好中球結合 (実施例 4 で後述)、活性化マーカー発現、及びIL - 8 産生アッセイのために作成した。

## 【0086】

IVI Gに添加されたWBのアリコートを10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ でのIMPRIME PGG又は、対照として等量のクエン酸緩衝剤 (11 mMのクエン酸ナトリウム、140 mMのNaCl、pH 6.3) と、30分間37 °Cでインキュベートした。インキュベーション後、100  $\mu\text{L}$ のWBあたり5  $\mu\text{L}$ のBfD IVマウス抗ベータグルカンIgM抗体を添加し、かつ室温で15分間インキュベートする前に、細胞をPBSで2回洗浄した。試料をその後PBSでさらに2回洗浄し、表面マーカーのための抗体ならびにBfD IV結合の検出のための抗マウスIgMを含む抗体カクテルで染色した。細胞を、2 mLのFACS / Lyse (イーバイオサイエンス (eBiosciences)、サンディエゴ、カリフォルニア州) を添加し、室温で15分間インキュベートする前に、30分室温でインキュベートした。細胞をその後、1%のパラホルムアルデヒドで固定しLSRIIFローサイトメータで分析する前に、PBSで2回洗浄した。FACSデータをFlowJoソフトウェアにより分析した。

40

結果を図 2 ~ 7 に示す。

## 【0087】

## 実施例 4

WB中のIMPRIME PGGの結合及び細胞表面のグルカン結合の検出を本質的に

50

実施例 2 に上述の通り行った。

結果を図 8 ~ 13、23 ~ 30、31A 及び 31B に示す。

【0088】

実施例 5

全血 (WB) を、実施例 3 に記載のとおり、健常なボランティアからヘパリン含有チューブに採取した。チューブを十分に混合し、使用する準備ができるまで氷上で保存した。WB のアリコート量を、 $10 \mu\text{g/mL}$  又は  $100 \mu\text{g/mL}$  の最終濃度で IMPRIME PGG と、あるいは等量の PBS 又はクエン酸緩衝剤とインキュベートした。 $10 \mu\text{g/mL}$  での全グルカン粒子 (Whole glucan particle) (WGP) を陽性対照として使用した。処理された WB を加湿された  $5\% \text{CO}_2$  インキュベーターで 30 分間又は 120 分間、 $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。各時点の終了時すぐに、WB を  $2000 \times \text{rpm}$  (又は  $1150 \times \text{g}$ ) で 10 分間  $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。上清 (血漿) を回収し、 $1.5 \text{mL}$  のエッペンドルフチューブに移して、氷上で保持した。血漿を以下のセクションで述べられる補体調節試験の同日に使用し、又は、使用する準備ができるまで  $-70^\circ\text{C}$  で凍結した。

10

【0089】

補体 C4a 調節試験

MicroVue C4a EIA kit (クイデル・コーポレーション (Quidel Corp.)、サンディエゴ、カリフォルニア州) を販売元の指示に従って血漿中の C4a の定量のために使用した。簡潔には、標準、対照、及び  $1:20$  希釈試験試料 (非処理又は種々の処理血漿調製物) を、特異的な抗 C4a モノクローナル抗体で事前にコーティングしたマイクロアッセイウェルに加えた。室温で 60 分間のインキュベーション後、1 洗浄サイクルでプレート を洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合マウス抗ヒト C4a モノクローナル抗体を各試験ウェルに添加し、さらに 60 分室温でインキュベートした。インキュベーション後、酵素反応を開始させるための発色酵素基質 TMB の添加前に、1 洗浄サイクルでプレート を洗浄した。プレートを 60 分室温でインキュベートし、続いて酵素反応を与えられた停止溶液でクエンチした。色の強度を分光光度法で  $450 \text{nm}$  において測定した。試験試料に存在する C4a の濃度を与えられた標準で作成した標準曲線から計算し、4 パラメーター回帰分析を用いて分析した。

20

結果を図 14 に示す。

30

【0090】

補体 C5a 調節試験

MicroVue C5a EIA kit (クイデル・コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州) を販売元の指示に従って血漿中の C5a の定量のために使用した。簡潔には、標準、対照、及び  $1:60$  希釈試験試料 (非処理又は種々の処理血漿調製物) を、特異的な抗 C5a モノクローナル抗体で事前にコーティングしたマイクロアッセイウェルに加えた。室温で 60 分間のインキュベーション後、1 洗浄サイクルでプレートを洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合マウス抗ヒト C5a モノクローナル抗体を各試験ウェルに添加し、さらに 60 分室温でインキュベートした。インキュベーション後、酵素反応を開始させるための発色酵素基質 TMB の添加前に、1 洗浄サイクルでプレートを洗浄した。プレートを 60 分室温でインキュベートし、続いて酵素反応を与えられた停止溶液でクエンチした。色の強度を分光光度法で  $450 \text{nm}$  において測定した。試験試料に存在する C5a の濃度を与えられた標準で作成した標準曲線から計算し、4 パラメーター回帰分析を用いて分析した。

40

結果を図 15 及び図 31C に示す。

【0091】

SC5b-9 調節試験

MicroVue SC5b-9 Plus EIA kit (クイデル・コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州) を販売元の指示に従って血漿試料に存在する SC5b-9 複合体の量を測定するために使用した。簡潔には、標準、対照、及び  $1:$

50

20 希釈試験試料（非処理又は種々の処理血漿調製物）を、特異的な抗SC5b-9モノクローナル抗体で事前にコーティングされたマイクロアッセイウェルに加えた。プレートを60分間室温でインキュベートし、5回の洗浄に続いた。プレートをその後、SC5b-9に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ結合マウス抗ヒトAbを含有する、与えられたSC5b-9プラス複合体と、30分間室温でインキュベートした。プレートをその後5回洗浄し、酵素反応を開始させるために発色酵素基質TMBと60分間室温でインキュベートし、その後、停止溶液でクエンチした。OD<sub>450</sub>を測定した。結果を、線形回帰分析を用いて作成された標準曲線から計算した。

結果を図16に示す。

#### 【0092】

##### 細胞表面の補体受容体の調節

WBへのIMPRIME PGGの結合を、10 µg/mL及び100 µg/mLで、そして30分及び120分の両方で試験した。結合後、細胞をPBSで2回洗浄し、その後CD88-APC、CD35-PE、及びCD11b-PB（バイオレジェンド（BioLegend））と30分間室温でインキュベートした。RBCを、2mLのFACS/Lyse（イーバイオサイエンス、サンディエゴ、カリフォルニア州）と室温で15分間インキュベートすることによって溶解させた。細胞をPBSで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、LSRIIFローサイトメータで分析した。FACSデータをFlowJoソフトウェアにより分析した。

結果を図17及び図18に示す。

#### 【0093】

##### 実施例6

WBへのIMPRIME PGGの結合を、10 µg/mL及び100 µg/mLで、そして30分及び120分の両方で試験した。結合後、細胞をPBSで2回洗浄し、その後CD62L-PB（バイオレジェンド）と30分間室温でインキュベートした。RBCを、2mLのFACS/Lyse（イーバイオサイエンス、サンディエゴ、カリフォルニア州）と室温で15分間インキュベートすることによって溶解させた。細胞をPBSで2回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、LSRIIFローサイトメータで分析した。FACSデータをFlowJoソフトウェアにより分析した。

結果を図19に示す。

#### 【0094】

##### 実施例7

全血（WB）を、実施例3に記載のとおり、健常なボランティアからヘパリン含有チューブに採取した。WBのアリコートを、10 µg/mLもしくは100 µg/mLの最終濃度でIMPRIME PGGとインキュベートし、あるいは、ベースライン対照としてPBSもしくはクエン酸緩衝剤で、又は陽性対照として100 ng/mLのTLR4アゴニストLPS（E.コリ（coli）株 0127:B8、シグマ（Sigma）、セントルイス、ミズーリ州）で処理した。培養物を加湿された5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで37 °Cでインキュベートした。20~24時間後、WBを10分間1600 x rpmで遠心分離し、血漿上清を回収した。試料を使用の準備ができるまで、96ウェルのマトリックス保存プレート（Matrix storage plate）（マトリックス・テクノロジーズ（Matrix Technologies）、ハドソン、ニューハンプシャー州）中に-80 °Cで保存した。IMPRIME PGG又は対照処理されたWBの血漿試料中のIL-8の存在を、ヒトCXCL8/IL-8 ELISA（R&Dシステムズ（R&D Systems）、Catalog# D8000C、ミネアポリス、マサチューセッツ州）を製造者の指示によって行うことによって判断した。

結果を図20に示す。

#### 【0095】

##### 実施例8

Sc5b-9調節試験

MicroVue SC5b-9 Plus EIA kit (クイードル・コーポレーション、サンディエゴ、カリフォルニア州) を販売元の指示に従って血漿試料に存在するSC5b-9複合体の量を測定するために使用した。簡潔には、標準、対照、及び1:20希釈試験試料(非処理又は種々の処理血漿調製物)を、特異的な抗SC5b-9モノクローナル抗体で事前にコーティングされたマイクロアッセイウェルに加えた。プレートを60分間室温でインキュベートし、5回の洗浄に続いた。プレートをその後、SC5b-9に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ結合マウス抗ヒトAbを含有する、与えられたSC5b-9プラス複合体と、30分間室温でインキュベートした。プレートをその後5回洗浄し、酵素反応を開始させるために発色酵素基質TMBと60分間室温でインキュベートし、その後、停止溶液でクエンチした。OD<sub>450</sub>を測定した。

10

結果を、線形回帰分析を用いて作成された標準曲線から計算した。結果を図21に示す。

#### 【0096】

##### 実施例9

ROC曲線解析をGraphPad Prismソフトウェアを使用して行った。結果を図27及び28に示す。

#### 【0097】

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例として含む)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、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。不必要な制限がそこから理解されるべきではない。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。

20

#### 【0098】

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などは、本願発明によって得ようとする所望の特性によって変動してもよい近似である。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。

30

#### 【0099】

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。

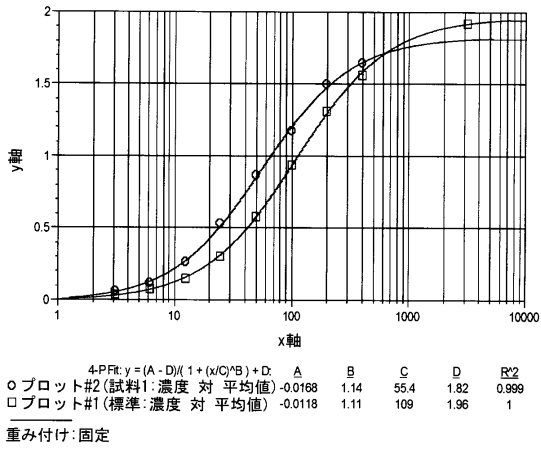
#### 【0100】

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。

40

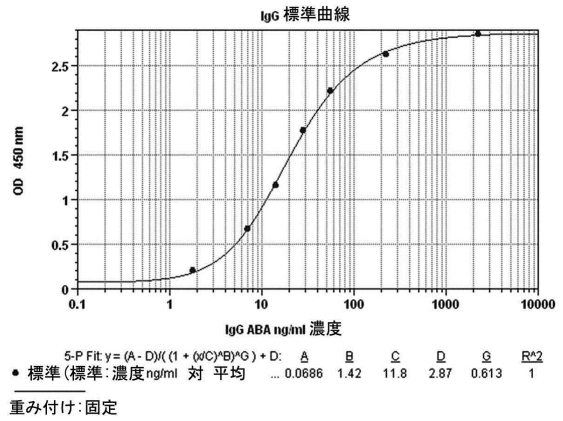
【 図 1 A 】

FIG. 1A



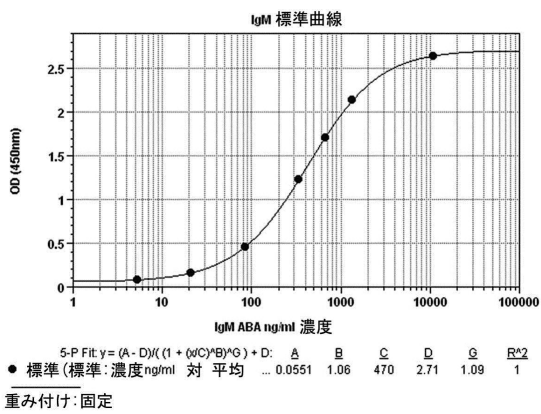
【 図 1 B 】

FIG. 1B



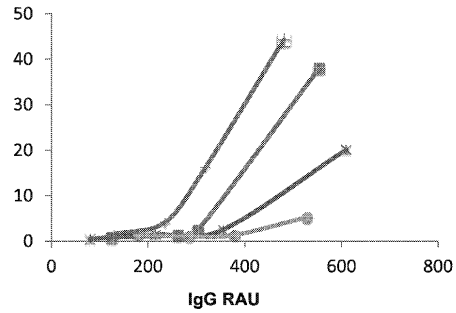
【 図 1 C 】

FIG. 1C



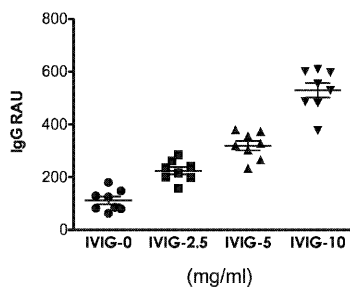
【 図 3 】

FIG. 3



【 図 2 】

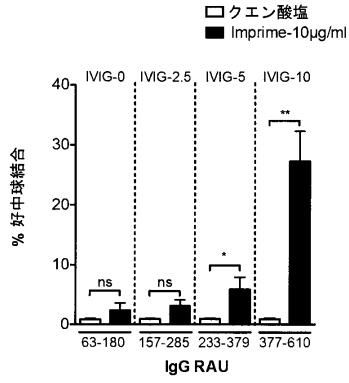
FIG. 2



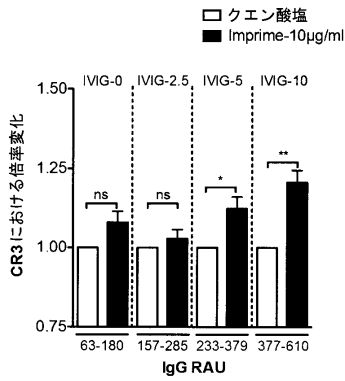
【 図 4 】

FIG. 4

(A)

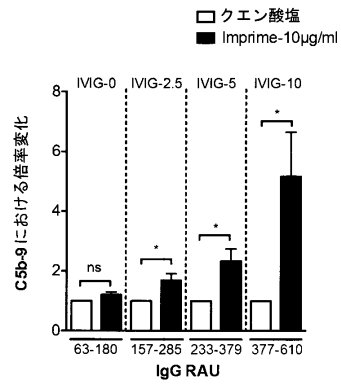


(B)



【 図 5 】

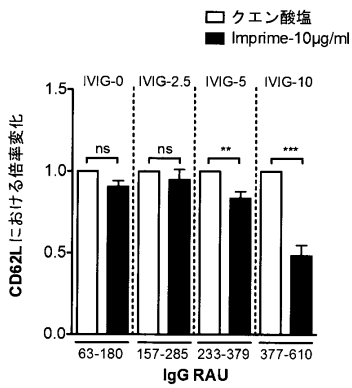
FIG. 5



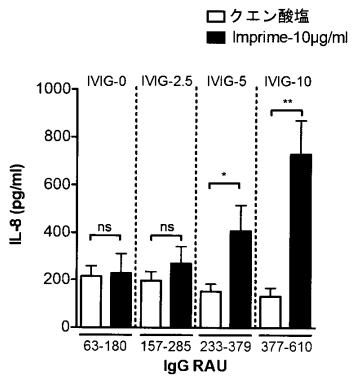
【 図 6 】

FIG. 6

(A)

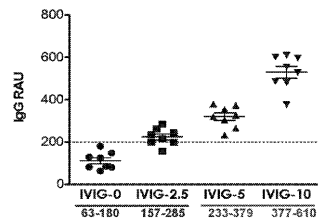


(B)



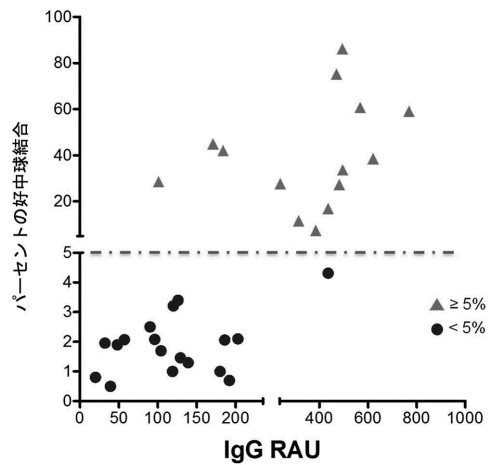
【 図 7 】

FIG. 7

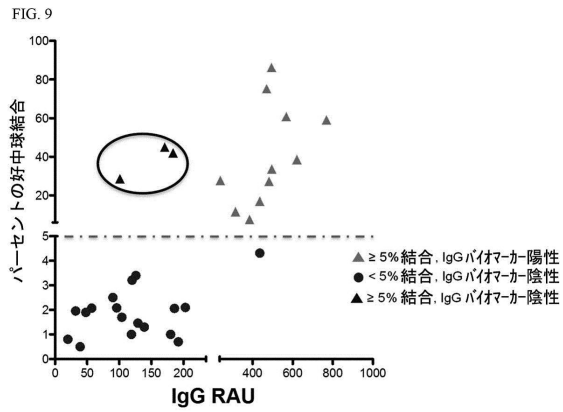


【 図 8 】

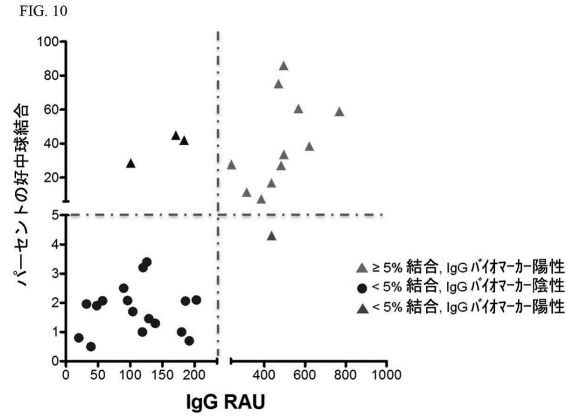
FIG. 8



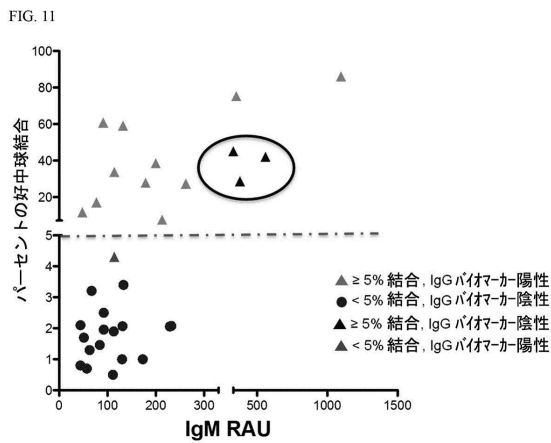
【 図 9 】



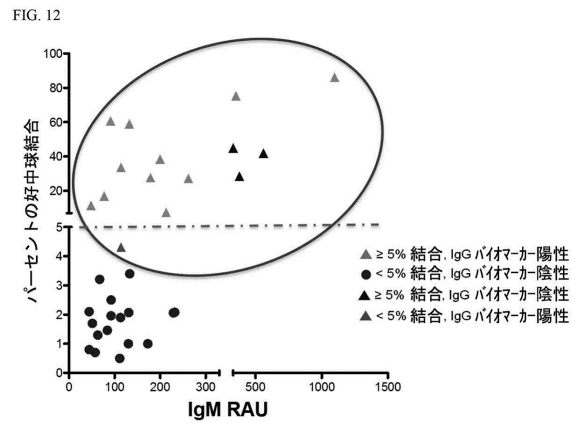
【 図 10 】



【 図 11 】

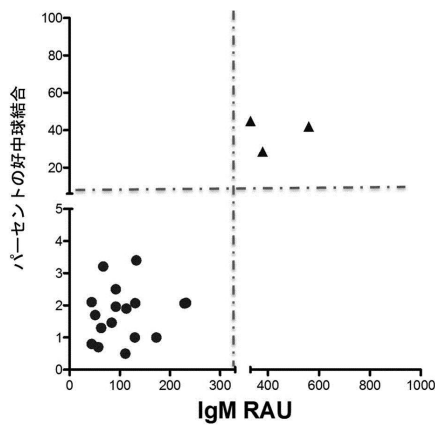


【 図 12 】



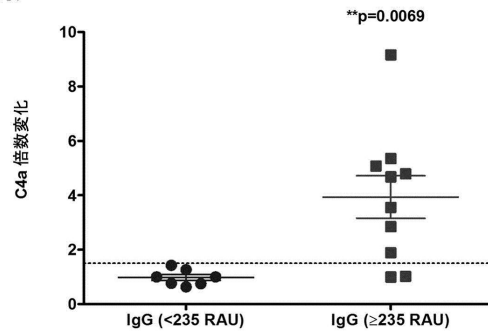
【 図 1 3 】

FIG. 13



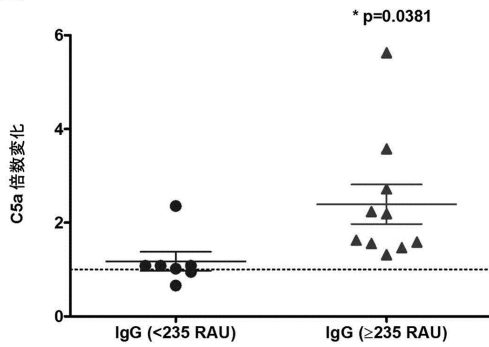
【 図 1 4 】

FIG. 14



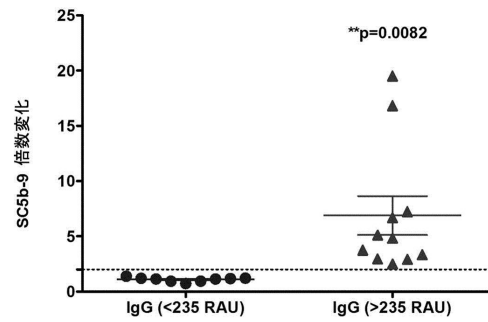
【 図 1 5 】

FIG. 15



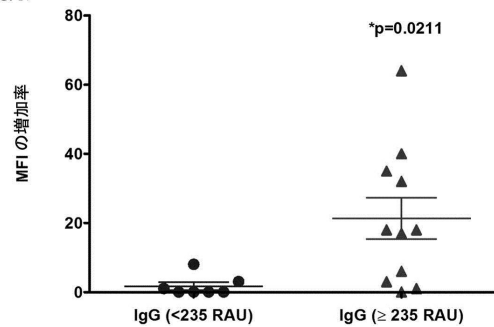
【 図 1 6 】

FIG. 16



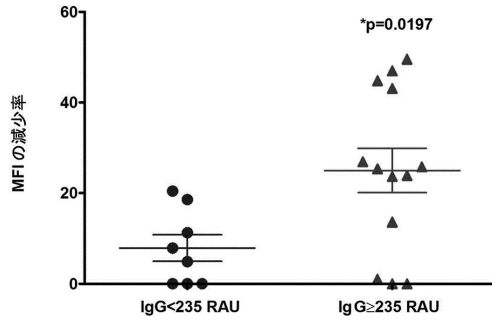
【 図 1 7 】

FIG. 17



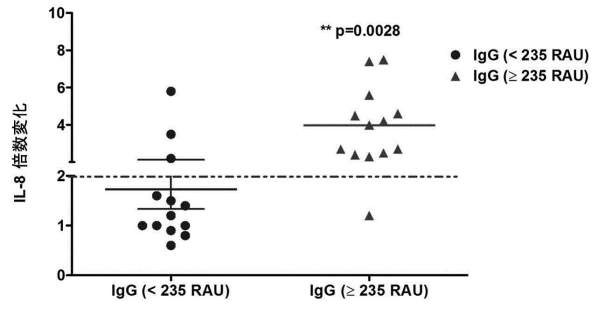
【 図 18 】

FIG. 18



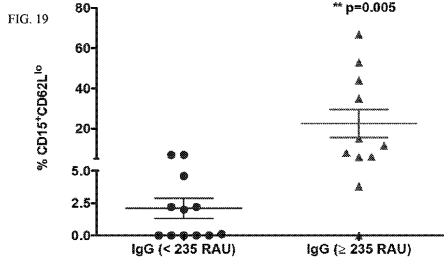
【 図 20 】

FIG. 20



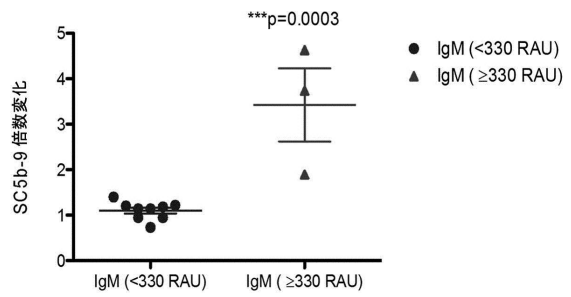
【 図 19 】

FIG. 19



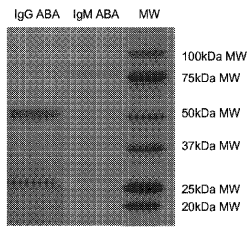
【 図 21 】

FIG. 21



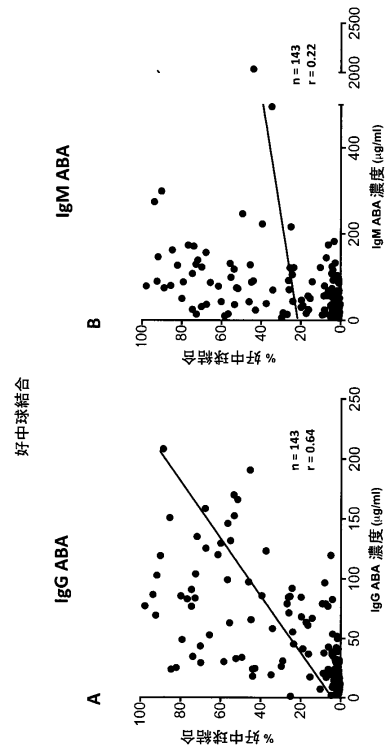
【 図 22 】

FIG. 22



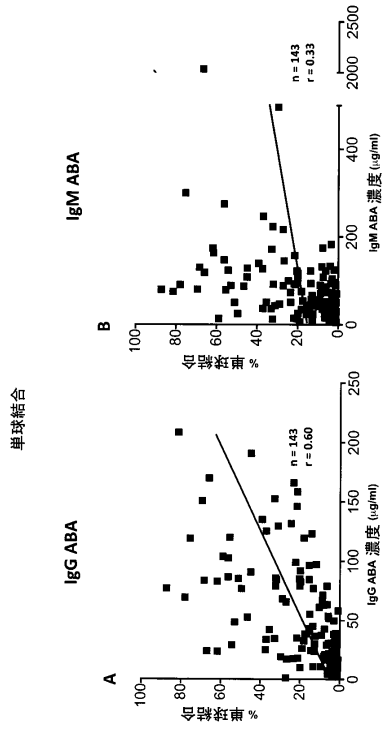
【 図 23 】

FIG. 23



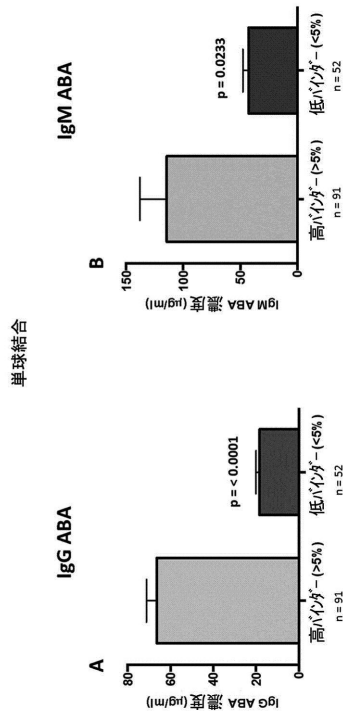
【 図 2 4 】

FIG. 24



【 図 2 6 】

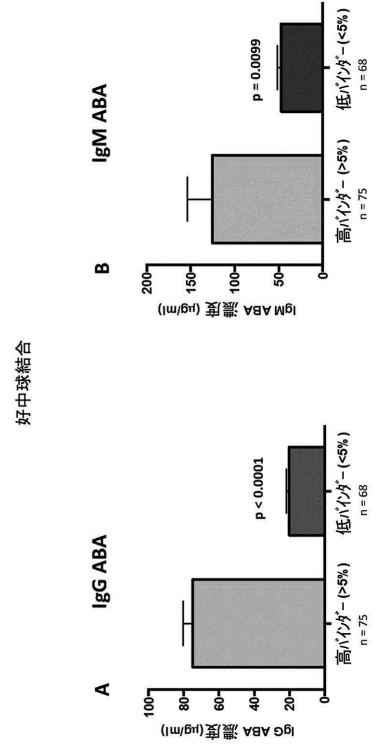
FIG. 26



(32)

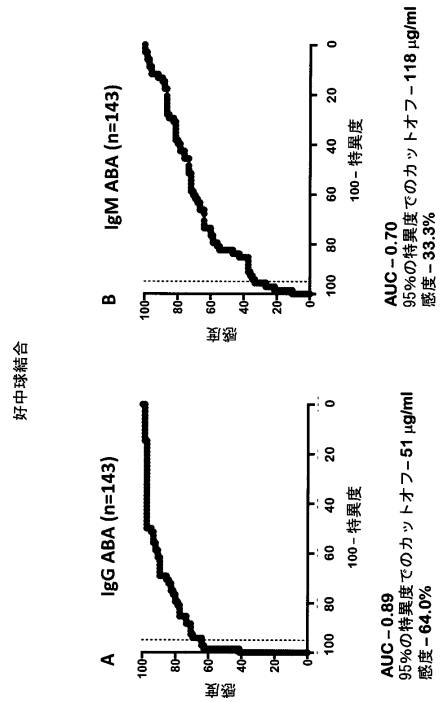
【 図 2 5 】

FIG. 25



【 図 2 7 】

FIG. 27



【 図 2 8 】

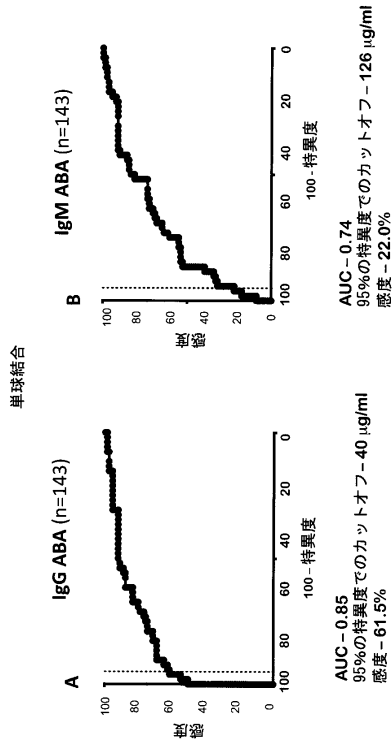


FIG. 28

【 図 3 0 】

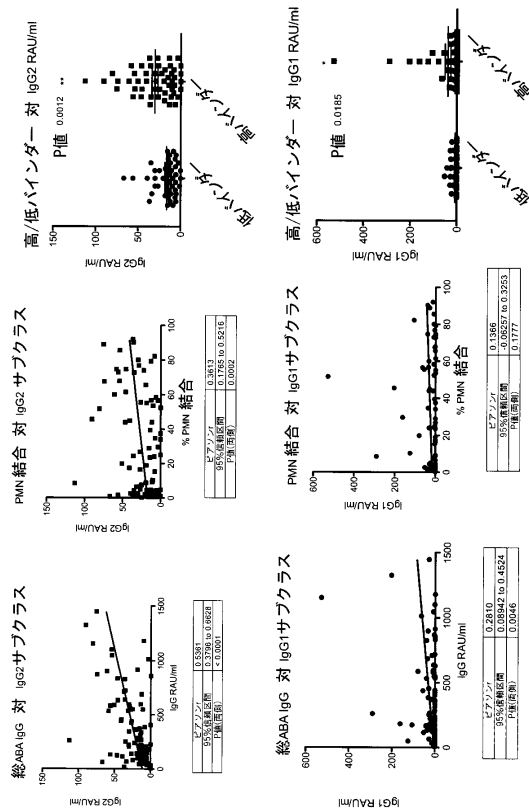


FIG. 30

【 図 2 9 】

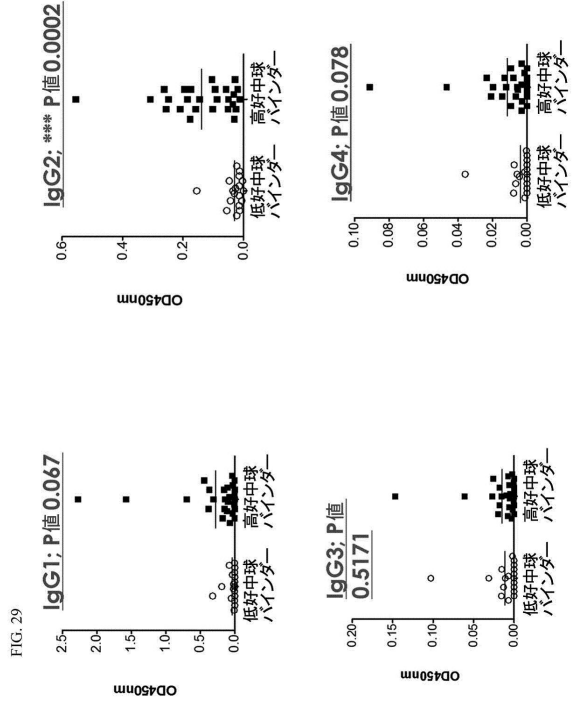


FIG. 29

【 図 3 1 】

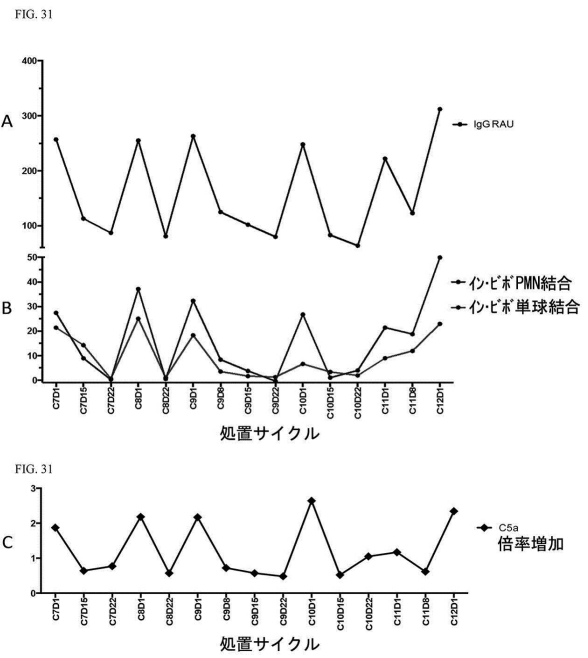


FIG. 31

## フロントページの続き

- (51) Int. Cl. F I  
C 0 7 K 16/44 (2006.01) C 0 7 K 16/44
- (74)代理人 100150810  
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100203828  
弁理士 喜多村 久美
- (72)発明者 ナンディータ ポーズ  
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 4 6 , プリマス, メリマック レーン 4 3 9 0
- (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 5 5 1 2 9 , ウッドベリー, ウォーターフロント ドライブ 1 0 2  
9 3
- (72)発明者 キース ビー. ゴーデン  
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 2 5 , ウッドベリー, レイク ロード 9 3 4 5
- (72)発明者 リチャード ウォルシュ  
アメリカ合衆国, ミネソタ 5 6 0 1 4 , リノ レイクス, ブラック ダック ドライブ サウス  
6 5 5 1
- (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 5 5 1 1 6 , セント ポール, シェファー アベニュー 1 4 4 5
- (72)発明者 ピーター メイモニス  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 0 9 0 , ウェストウッド, フェンスビュー ドライブ  
8 3

審査官 倉持 俊輔

- (56)参考文献 国際公開第2013/165591(WO, A1)  
国際公開第2010/101047(WO, A1)  
特開2011-095132(JP, A)  
特開2007-155334(JP, A)  
特開2008-164579(JP, A)  
特表2005-535298(JP, A)  
特表2011-519049(JP, A)  
特表2015-515983(JP, A)  
豪国特許出願公開第2013203785(AU, A1)  
特開2010-237126(JP, A)  
特開2007-205842(JP, A)  
特表2006-502167(JP, A)  
眞重文子, ROC曲線の作成と最適なカットオフ値の求め方, 生物試料分析, 日本, 2005年  
, Vol.28, No.2, pp.133-139  
Iika Noss et.al. , Allergy and Immunology, 2012年, vol.157, page.98-108  
Ken-Ichi Ishibashi et.al. , International Journal of Medicinal mushrooms, 2011年  
, vol.13 no.2 , page.101-107  
Ken-Ichi Ishibashi et.al. , International Journal of Medicinal mushrooms , 2013年  
, vol.15 no.2, page.115-126  
Ken-Ichi Ishibashi et.al. , International Journal of Medicinal mushrooms , 2009年  
, vol.11 no.2, page.117-131  
中江孝 他, 日本化学療法学会雑誌, 1998年, vol.46 no.6 , page.223-229

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

专利名称(译)	β-葡聚糖测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6673829B2</a>	公开(公告)日	2020-03-25
申请号	JP2016536615	申请日	2014-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	生物治疗公司		
申请(专利权)人(译)	Baiosera公司		
当前申请(专利权)人(译)	Baiosera公司		
[标]发明人	ナンディータポーズ メアリーエーアントニーサミー キースビーゴードン リチャードウォルシュ マイケルイーダニエルソン ピーターメイモニス		
发明人	ナンディータ ポーズ メアリー エー.アントニーサミー キース ビー.ゴードン リチャード ウォルシュ マイケル イー.ダニエルソン ピーター メイモニス		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 A61K31/716 A61P37/02 A61K36/062 C07K16/44		
CPC分类号	A61P37/02 C07K16/16 G01N33/53 G01N33/56961 G01N2400/24 G01N2800/24 A61K39/0002 C07K16/14 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.545.A A61K31/716 A61P37/02 A61K36/062 C07K16/44		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎		
优先权	61/912275 2013-12-05 US 62/005335 2014-05-30 US		
其他公开文献	JP2017501399A JP2017501399A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

在一个方面，本公开提供了一种用于分析来自受试者的样品的生物标志物的方法，所述生物标志物指示受试者对β-葡聚糖的免疫应答。通常，该方法包括从受试者获得生物样品，与参考标准相比分析样品中的生物标志物抗β-葡聚糖抗体，计算样品中抗β-葡聚糖抗体的相对抗体单位 (RAU) 值 并且，如果RAU值大于生物标志物抗β-葡聚糖抗体的预定RAU值，则将该受试者鉴定为生物标志物阳性。

(5) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A
A 6 1 K 31/716 (2006.01)	A 6 1 K 31/716
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 K 36/062 (2006.01)	A 6 1 K 36/062

請求項の数 11 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-536615 (P2016-536615)	(73) 特許権者	508367740
(86) (22) 出願日	平成26年12月1日 (2014.12.1)		バイオセラ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-501399 (P2017-501399A)		アメリカ合衆国 ミネソタ州 5 5 1 2 1
(43) 公表日	平成29年1月12日 (2017.1.12)		イーガン マイク コリンズ ドライヴ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/067944		3 3 8 8
(87) 国際公開番号	W02015/084732	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成27年6月11日 (2015.6.11)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成29年12月1日 (2017.12.1)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	61/912,275		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成25年12月5日 (2013.12.5)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 福本 慎
(31) 優先権主張番号	62/005,335	(74) 代理人	100087413
(32) 優先日	平成26年5月30日 (2014.5.30)		弁理士 古賀 晋次
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(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-グルカンアッセイ方法