



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102119332 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 200980124834. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 04. 29

*G01N 33/53* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*G01N 33/563* (2006. 01)

61/071437 2008. 04. 29 US

*C07K 16/18* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/042117 2009. 04. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/134891 EN 2009. 11. 05

(71) 申请人 免疫刺激公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 I·鲁宾-贝耶拉诺 G·R·芬克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 谭明胜 刘健

权利要求书 7 页 说明书 37 页 附图 5 页

(54) 发明名称

免疫调节组合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明涉及  $\beta$  1-6 葡聚糖、组合物、诊断试剂盒和包含上述物质的装置, 及其在免疫应答的调节和癌症、感染、炎症及自身免疫病的治疗、延迟进展、降低发病率或严重程度中的使用方法。本发明某些实施方案的  $\beta$  1-6 葡聚糖富含 O-乙酰基和/或缀合于固相支持物或连接靶向部分。本发明某些实施方案的  $\beta$  1-6 葡聚糖募集免疫球蛋白 G 抗体以介导补体和嗜中性白细胞杀伤作用。本发明某些实施方案的缀合的  $\beta$  1-6 葡聚糖靶向细胞以通过激活补体-介导的溶胞作用及募集嗜中性白细胞从而在靶位置刺激免疫应答。

1. 一种用于检测应答于  $\beta$ -1,6-葡聚糖所分泌的免疫球蛋白 G (IgG) 抗体的量的方法, 所述方法包括以下步骤:

在用  $\beta$ -1,6-葡聚糖攻击前从受试者中获得第一血样;

在用  $\beta$ -1,6-葡聚糖攻击后从受试者中获得第二血样;

在定量或测量 IgG 抗体存在的测定法中, 提供足够的时间来产生在溶液中可读的信号并检测所述 IgG 抗体结合的溶液中的该信号;

计算来自所述第一和第二血样的所述 IgG 抗体结合的信号, 以确定 IgG 抗体分泌的量, 其中信号间的差异表明应答于  $\beta$ -1,6-葡聚糖所产生的 IgG 抗体的量; 以及

将所述差异与阳性和阴性对照进行比较; 其中超过阈值的所述差异确定受试者对  $\beta$ -1,6-葡聚糖的应答性。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗体包含完整的免疫球蛋白 G 或其片段。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗体包含选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的同种型。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述抗体是 IgG2。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述受试者是人。

6. 权利要求 1 的方法, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖分离自地衣、真菌或酵母。

7. 权利要求 6 的方法, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖分离自石耳科。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖包含 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

9. 权利要求 1 的方法, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖包含化学合成的、基因工程的或 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

10. 权利要求 1 的方法, 其中通过酶联免疫测定法、放射免疫测定法、免疫沉淀反应、荧光免疫测定法、化学发光测定法、免疫印迹测定法、侧向流测定法、凝集测定法或基于微粒的测定法来测定 IgG 抗体的量。

11. 权利要求 1 的方法, 其中所述药物组合物进一步包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

12. 一种用于测量 IgG 水平的诊断试剂盒, 其包含:

(i) 包含  $\beta$ -1,6-葡聚糖的药物组合物;

(ii) 用于检测血样中结合所述药物组合物的 IgG 抗体的试剂;

(iii) 任选地来源于所述药物组合物阳性和阴性应答者的一系列标准样品; 以及

(iv) 使用该药物组合物来检测血样中 IgG 量的说明书。

13. 权利要求 12 的试剂盒, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖处于溶液中或是冻干的。

14. 权利要求 12 的试剂盒, 其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖固定在基质上。

15. 权利要求 14 的试剂盒, 其中所述基质包含选自塑料、玻璃、凝胶、赛璐珞、纸、磁性树脂、聚偏二氟乙烯、尼龙、硝酸纤维素、琼脂糖、胶乳和聚苯乙烯的材料。

16. 权利要求 14 的试剂盒, 其中所述基质包含 ELISA 板、浸渍片、微量滴定板、放射性免疫测定平板、珠子、琼脂糖珠、塑料珠、胶乳珠、免疫印迹膜和免疫印迹纸。

17. 权利要求 14 的试剂盒, 其中所述试剂缀合于可检测的标记。

18. 权利要求 17 的试剂盒, 其中所述可检测的标记选自放射性标记、荧光标记、化学发光标记、生色标记、配体、荧光素、放射性同位素、磷酸酶、生物素、生物素相关化合物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白相关化合物和过氧化物酶。

19. 一种包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖组合物。
20. 权利要求 19 的组合物,其中所述葡聚糖是 O- 乙酰化的。
21. 权利要求 20 的组合物,其中所述葡聚糖包含按重量计至少 25% 的 O- 乙酰化葡聚糖。
22. 权利要求 19 的组合物,其中所述葡聚糖分离自地衣、酵母、真菌、或是化学合成的,或是基因工程的。
23. 权利要求 22 的组合物,其中所述葡聚糖分离自石耳科。
24. 权利要求 19 的组合物,其中所述靶向部分选自抗体、抗原、受体配体、表位、多糖、肽和它们的任意组合。
25. 权利要求 24 的组合物,其中所述靶向部分是抗原;所述抗原选自糖蛋白、黏蛋白、核酸、碳水化合物、蛋白聚糖、脂类、黏蛋白分子、肿瘤相关抗原和它们的任意组合。
26. 权利要求 25 的组合物,其中所述抗原是肿瘤相关抗原。
27. 权利要求 26 的组合物,其中所述肿瘤相关抗原存在于选自卵巢癌、黑素瘤、胰腺癌、结肠直肠癌、伯基特氏淋巴瘤、B- 细胞淋巴瘤、肺癌、白血病、乳腺癌、骨髓癌、结肠腺癌、胃癌、胚胎性癌、前列腺癌和子宫内膜癌的癌细胞上。
28. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是卵巢癌;所述肿瘤相关抗原是 CA125 或 CD46。
29. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是黑素瘤细胞;所述肿瘤相关抗原选自 p97、gp75、HMW-MAA、神经节苷脂 GD2、神经节苷脂 GD3、MAGE、BAGE、Mart-1R24、神经节苷脂 GM2 和神经节苷脂 GM3。
30. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是胰腺癌;所述存在的肿瘤相关抗原是 ADMR 或 CRLR。
31. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是癌胚癌;所述肿瘤相关抗原是 CEA。
32. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是结肠直肠癌;所述肿瘤相关抗原选自 TAG-72、CO17-1A、GICA 19-9、CTA-1、LEA、VEP8、VEP9、My1、VIM-D5、D156-22、C4BP 和 DAF。
33. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是伯基特氏淋巴瘤;所述肿瘤相关抗原是抗原 -38.13 或 CD19。
34. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是人 B- 淋巴瘤;所述肿瘤相关抗原是 CD20 或 CD33。
35. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是人肺癌;所述肿瘤相关抗原是 L6、L20、F3 或 CD117。
36. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是人白血病 T 细胞;所述肿瘤相关抗原是 gp37、拟糖蛋白、神经鞘脂类或 APO-1。
37. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是乳腺癌细胞;所述肿瘤相关抗原是 EGFR、HER/neu、CR1、M18 或 M39。
38. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是骨髓癌;所述肿瘤相关抗原是 T5A7 或 SSEA-1。
39. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是结肠腺癌细胞;所述肿瘤相关抗原是 C14、CO-514 或 NS-10。

40. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是胃癌细胞;所述肿瘤相关抗原是黏蛋白、AH6 或 FHL-1。

41. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是胚胎性癌细胞;所述肿瘤相关抗原选自 Y 半抗原、Ley、FC10. 2、4. 2、GD3、D1. 1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2 和 M1:22:25:8。

42. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是前列腺癌;所述肿瘤相关抗原是 CD55 或 MCP。

43. 权利要求 27 的组合物,其中所述癌细胞是子宫内膜癌;所述肿瘤相关抗原是 CD35。

44. 权利要求 24 的组合物,其中所述靶向部分是表位;所述表位选自 T 辅助细胞表位 (TH)、趋化因子表位、嗜中性白细胞表位、MHCII 类分子和吞噬细胞表位。

45. 权利要求 44 的组合物,其中所述表位是嗜中性白细胞表位;所述嗜中性白细胞表位选自 L- 选择蛋白、2- 整联蛋白、补体受体 1 (CR-1)、衰变加速因子 (DAF)、C5a 受体、胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 和 ICAM-3。

46. 权利要求 44 的组合物,其中所述表位是吞噬细胞表位;所述吞噬细胞表位是 Fc 受体。

47. 权利要求 44 的组合物,其中所述表位是趋化因子表位;所述趋化因子表位是 CD40、CD80 或 CD86。

48. 权利要求 44 的组合物,其中所述表位是 MHC II 类分子;所述 MHC II 类分子选自 CD69、ADAM8、CD14、CD163、CD33、CD63、CD68、CD74、CHIT1、CHST10、CSF1R、DPP4、FABP4、FCGR1A、ICAM2、IL1R2、ITGA1、ITGA2、S100A8 和 TNFRSF8。

49. 权利要求 44 的组合物,其中所述 TH 表位能够被抗原呈递细胞 (APC) 所摄入。

50. 权利要求 49 的组合物,其能够被 APC 所加工,由此 APC 在它的表面呈递结合 MHC II 类分子的 TH 表位。

51. 权利要求 24 的组合物,其中所述靶向部分是抗体;所述抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、双抗体、三链抗体、四链抗体和微抗体。

52. 权利要求 51 的组合物,其中所述抗体是单克隆抗体。

53. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体选自阿仑单抗 (Campath)、贝伐单抗 (Avastin)、西妥昔单抗 (Erbix)、吉姆单抗 (Mylotarg)、替伊莫单抗 (Zevalin)、帕尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan)、托西莫单抗 (Bexxar)、曲妥单抗 (Herceptin)、在呼吸道合胞病毒 A 和 F 蛋白中的帕利珠单抗 (Synagis) 以及免疫球蛋白 G2。

54. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是阿仑单抗 (Campath);所述阿仑单抗 (Campath) 靶向存在于胰腺癌细胞上的 CD52。

55. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是贝伐单抗 (Avastin);所述贝伐单抗 (Avastin) 靶向存在于结肠直肠癌中的 VEGF。

56. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是西妥昔单抗 (Erbix);所述西妥昔单抗 (Erbix) 靶向存在于头颈鳞状细胞癌或乳腺癌上的 EGFR。

57. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是吉姆单抗 (Mylotarg);所述吉姆单抗 (Mylotarg) 靶向存在于骨髓性白血病上的 CD33。

58. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是替伊莫单抗 (Zevalin)、帕尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan) 或托西莫单抗 (Bexxar);所述替伊莫单抗 (Zevalin)、帕

尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan) 或托西莫单抗 (Bexxar) 靶向存在于 B- 细胞淋巴瘤上的 CD20。

59. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是曲妥单抗 (Herceptin);所述曲妥单抗 (Herceptin) 靶向存在于乳腺癌上的 HER/neu。

60. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是帕利珠单抗 (Synagis);所述帕利珠单抗 (Synagis) 靶向存在于呼吸道合胞病毒上的 A 和 F 蛋白。

61. 权利要求 52 的组合物,其中所述单克隆抗体是免疫球蛋白 G;所述免疫球蛋白 G 靶向存在于真菌或细菌性病原体上的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖。

62. 权利要求 24 的组合物,其中所述抗体是多克隆抗体;所述多克隆抗体结合权利要求 25-50 任意一项所述的抗原或表位。

63. 权利要求 51 的组合物,其中所述抗体包含至少一个结合 IgG2 的抗原结合位点。

64. 权利要求 63 的组合物,其中所述抗体包含针对权利要求 25-50 任意一项所述的抗原或表位的第二、第三或第四抗原结合位点。

65. 权利要求 19 的组合物,进一步包含同时或相继给予佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

66. 一种药物制剂,其包含权利要求 19 的组合物;以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

67. 一种用于调节受试者免疫应答的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的权利要求 19-65 任意一项所述的组合物。

68. 权利要求 67 的方法,其中所述针对靶标癌细胞、感染剂、病原体或感染部位的免疫应答被刺激。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述免疫应答刺激或增强热休克蛋白表达。

70. 权利要求 68 的方法,其中所述免疫应答诱导活性氧类别 (ROS) 产生。

71. 权利要求 68 的方法,其中所述免疫应答增强或刺激嗜中性白细胞吞噬作用或细胞毒溶胞作用。

72. 权利要求 68 的方法,其中所述免疫应答增强或刺激补体 - 介导的溶胞作用。

73. 权利要求 67 的方法,其进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、肽、免疫刺激化合物、治疗剂或它们的组合。

74. 权利要求 73 的方法,其中所述治疗剂选自抗炎剂、抗病毒剂、抗生素、抗感染剂、葡聚糖合成抑制剂、抗原虫剂、抗组胺剂、减充血剂、抗精神病药、有丝分裂抑制剂和它们的任意组合。

75. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗病毒剂;所述抗病毒剂是阿昔洛韦、奈非那韦或病毒唑。

76. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗生素;所述抗生素选自氨苄西林、青霉素 G、青霉素、头孢菌素类、氨基糖苷类、大环内酯类、碳青霉烯、青霉烯、单环  $\beta$ - 内酰胺类、 $\beta$ - 内酰胺酶抑制剂、四环素类、多肽类抗生素、氯霉素、夫西地酸、林可霉素、新生霉素、壮观霉素、聚醚离子载体和喹诺酮类。

77. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗感染剂;所述抗感染剂选自苯扎氯铵、洗必泰、氨苯砞、氯霉素、新霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢拉定、红霉

素、克林霉素、林可霉素、阿莫西林、氨苄西林、巴氨西林、羧苄西林、双氯西林、环己西林、picloxacillin、海他西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、青霉素、替卡西林、利福平、四环素、二氟尼柳、布洛芬、吡哌美辛、甲氯胺苯酸盐、甲芬那酸、萘普生、羟布宗、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、阿司匹林、水杨酸盐类和两性霉素 B。

78. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是葡聚糖合成抑制剂;所述葡聚糖合成抑制剂选自卡泊芬净、米卡芬净、阿尼芬净 (LY303366)、益康唑、特康唑、氟康唑、伏立康唑和灰黄霉素。

79. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗原虫剂;所述抗原虫剂是甲硝唑、妥布氯唑、噻苯唑或奥芬唑。

80. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗组胺剂;所述抗组胺剂是阿司咪唑、左卡巴斯汀、西替利嗪或肉桂苯哌嗪。

81. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是减充血剂;所述减充血剂是假麻黄碱。

82. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是抗精神病药;所述抗精神病药是氟司必林、五氟利多、利培酮或齐拉西酮。

83. 权利要求 74 的方法,其中所述治疗剂是有丝分裂抑制剂;所述有丝分裂抑制剂是依托泊甙、秋水仙碱或长春花生物碱类。

84. 权利要求 67 的方法,其中所述免疫应答被下调或消除。

85. 权利要求 84 的方法,其中所述免疫应答被下调或消除干扰素、白介素、肿瘤坏死因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、嗜中性白细胞活化蛋白 (NAP)、巨噬细胞趋化及活化因子 (MCAF)、RANTES 或巨噬细胞炎性肽的活化。

86. 权利要求 67 的方法,其进一步包括同时或相继给予免疫抑制剂。

87. 一种对受试者的癌症进行治疗、延迟癌症的进展、延长癌症的缓解或降低癌症的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的权利要求 19-65 任意一项所述的组合物。

88. 权利要求 87 的方法,所述针对靶标癌细胞、增生性病变或瘤前病变的免疫应答被刺激。

89. 权利要求 88 的方法,其中所述免疫应答增强嗜中性白细胞吞噬作用、刺激细胞毒溶胞作用、诱导 ROS 产生、诱导热休克蛋白的表达或增强补体-介导的溶胞作用。

90. 权利要求 87 的方法,其进一步包括同时或相继给予化学治疗剂、细胞毒剂、抗肿瘤剂或它们的组合。

91. 权利要求 90 的方法,其中所述细胞毒剂选自 ErbB 受体抑制剂、VEGF 受体抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白激酶 A 抑制剂、抗血管生成剂、抗激素剂和细胞因子。

92. 权利要求 90 的方法,其中所述化学治疗剂选自顺铂、多柔比星、吉西他滨、多西他赛、紫杉醇和博来霉素。

93. 权利要求 90 的方法,其中所述抗肿瘤剂选自螺铂、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素、安丝菌素、博来霉素、阿糖胞苷、阿糖腺苷、巯基聚赖氨酸、长春新碱、白消安、苯丁酸氮芥、美法仑、PAM、L-PAM、苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、米托坦、盐酸丙卡巴肼放线菌素 D、盐酸柔红霉素、盐酸多柔比星、紫杉醇和其他紫杉烷类、雷帕霉素、手霉素

A、TNP-470、普卡霉素、光辉霉素、氨鲁米特、雌氮芥磷酸钠、氟他胺、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、柠檬酸他莫昔芬、睾内酯、曲洛司坦、安吡啶 (m-AMSA)、天冬酰胺酶 (L-天冬酰胺酶) 欧文氏菌属天冬酰胺酶、干扰素  $\alpha$ -2a、干扰素  $\alpha$ -2b、替尼泊忒 (VM-26)、硫酸长春碱 (VLB)、硫酸长春新碱、硫酸博来霉素、羟基脲、丙卡巴肼和达卡巴嗪。

94. 权利要求 87 的方法,其进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

95. 一种对受试者的感染进行治疗、延迟感染的进展、延长感染的潜伏状态或降低感染的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的权利要求 19-65 任意一项所述的组合物。

96. 权利要求 95 的方法,其中所述针对靶标寄生虫、病毒、真菌、病原体、细菌或感染剂的免疫应答被刺激。

97. 权利要求 96 的方法,其中所述免疫应答增强嗜中性白细胞吞噬作用、刺激细胞毒溶胞作用、诱导 ROS 产生、诱导热休克蛋白的表达或增强补体 - 介导的溶胞作用。

98. 权利要求 95 的方法,进一步包括同时或相继给予抗生素、抗病毒剂、抗感染剂、抗原虫剂、佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

99. 一种对受试者的炎症进行治疗、延迟炎症的进展、降低炎症的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的权利要求 19-65 任意一项所述的组合物。

100. 权利要求 99 的方法,其中位于靶标炎症病灶处的所述炎症被下调或消除。

101. 权利要求 99 的方法,其进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、肽、免疫刺激化合物、抗炎剂或它们的组合。

102. 权利要求 101 的方法,其中所述抗炎剂选自倍他米松、强的松龙、吡罗昔康、阿司匹林、氟比洛芬和 (+)-N-[4-[3-(4-氟代苯氧基)苯氧基]-2-环戊烯-1-基]-N-羟基脲。

103. 一种对受试者的自身免疫应答进行治疗、延迟自身免疫应答的进展或降低自身免疫应答的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的权利要求 27-72 任意一项所述的组合物。

104. 权利要求 103 的方法,其中针对靶标移植组织、移植细胞、自身抗原或 HIV 感染的所述自身免疫应答被下调或消除。

105. 权利要求 104 的方法,其中所述自身免疫应答下调白介素、肿瘤坏死因子或干扰素的活化。

106. 权利要求 103 的方法,进一步包括同时或相继给予免疫抑制剂。

107. 一种包含纯化的连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物,其中所述组合物是药物组合物、食品或食物产品、食品补充剂或化妆用组合物。

108. 权利要求 107 的组合物,其中所述组合物包含已被加工的连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖,相对于未加工的  $\beta$ -1,6-葡聚糖,增加了它的介导免疫应答能力。。

109. 权利要求 107 的组合物,其中至少 95% 的包含于所述组合物中的葡聚糖是连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

110. 一种包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的胶粒,其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖任选地是 O-乙酰化的。

111. 一种包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的组合物,其中

所述生物可降解的聚合物降解形成生物学活性的水杨酸盐或  $\alpha$ -羟酸部分以及所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖任选地是 O-乙酰化的。

112. 一种包含连接于权利要求 111 的组合物的微球的颗粒。

113. 一种包含权利要求 111 的组合物的医用装置。

114. 权利要求 113 的医用装置,其中用包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物涂覆至少一部分表面。

115. 权利要求 113 的医用装置,其中该装置选自导管、支架、瓣膜、起搏器、中心线、子宫托、管、分流器、饲管、引流管和矫形外科硬件装置。

116. 权利要求 113 的医用装置,其中所述组合物包含含有聚合物和连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的涂层。

117. 权利要求 113 的医用装置,其中所述组合物包含含有聚合物和连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的涂层,其中所述聚合物是生物可降解的。

118. 一种治疗受试者的方法,其包括将权利要求 113 所述的医用装置植入或导入需要其的受试者体中。

119. 一种涂覆材料,其包含:(a) 基质;和 (b) 与所述基质的至少一部分表面在物理上相结合的包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物,其中所述组合物任选地以凝胶或薄膜的形式存在。

120. 权利要求 119 的涂覆材料,其中所述组合物是聚合物。

121. 权利要求 119 的涂覆材料,其中所述组合物包含生物可降解的聚合物。

122. 权利要求 119 的涂覆材料,其中所述基质至少部分由金属、陶瓷或聚合物组成。

123. 一种治疗受试者的方法,其包括将需要其的受试者的身体与权利要求 119 所述的涂覆材料接触。

## 免疫调节组合物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 29 日提交的美国临时专利申请序列号 61/071,437 的优先权,其在此全部引入作为参考。

[0003] 政府利益声明

[0004] 本发明全部或部分在国立卫生研究院授予的基金号 GM035010-22 的政府资助下完成。政府在本发明中享有某些权利。

### 背景技术

[0005] 真菌细胞壁引起强有力的免疫刺激应答,并且已计划用作潜在的抗感染和抗肿瘤药物。真菌细胞还可激活树突细胞并引发 II 类限制性抗原特异性 T 细胞应答。病原真菌(白色念珠菌(*Candida albicans*))和非病原真菌(酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))细胞壁的大部分(50-60%)由共价连接多种细胞表面甘露糖蛋白的 $\beta$ -葡聚糖( $\beta$ -1,3-和 $\beta$ -1,6-葡聚糖)内层组成[Klis, F.M.等 *Med Mycol* 39Suppl 1,1-8, 2001;Klis, F.M.等, *FEMS Microbiol Rev* 26,239-56,2002]。

[0006] 巨噬细胞识别 $\beta$ -葡聚糖主要通过 Dectin-1 与包括 TLR2 在内的 TLRs 的协同作用来进行[Brown, G.D.等 *Nature* 413,36-7,2001]。Dectin-1 活性被 $\beta$ -1,3-葡聚糖和 $\beta$ -1,6-葡聚糖抑制, $\beta$ -1,3-葡聚糖昆布多糖具有最强效果。然而,寡糖微阵列结果显示 Dectin-1 特异性结合 $\beta$ -1,3-葡聚糖。嗜中性白细胞是专职的杀伤细胞,充分鉴定了其在吞噬作用以及杀伤细菌和真菌中的作用。嗜中性个体对细菌和真菌感染更加敏感,恢复至正常计数在感染消退中起重要作用。与巨噬细胞不同,嗜中性白细胞需要血清来进行最佳吞噬作用和杀伤作用。主要的调理性受体是补体受体 CR3 和免疫球蛋白结合受体 Fc $\gamma$ R。CR3 具有凝集素结构域[Brown, G.D.等 *Immunity* 19,311-5,2003],该结构域介导嗜中性白细胞向 $\beta$ -1,3-葡聚糖和 $\beta$ -1,6-葡聚糖(PGG-葡聚糖)混合物的增加的游动性[Wakshull, E.等 *Immunopharmacology* 41,89-107,1999]。

[0007] 已发现 $\beta$ -1,6-葡聚糖提供较强的抗真菌活性等,具有佐剂活性并激活补体。

[0008] 人和其他哺乳动物的补体(C)系统包含超过 20 种补体,参与有序的反应序列,产生补体激活。来源于 C 成分激活的产物包括非自身识别分子 C3b、C4b 和 C5b,以及影响多种细胞免疫应答的过敏毒素 C3a、C4a 和 C5a(Hugli 等(1982) 15th International Leucocyte Culture Conference, Asilomar, CA(Abtract);Fujii 等(1993) *Protein Science* 2: 1301-1312;Morgan 等(1982) *J. Exp. Med.* 155:1412-1426;Morgan(1993) *Complement Today* 1:56-75;Morgan 等(1983) *J. Immunol.* 130:1257-1261)。补体激活主要经由“经典”途径或“替代”途径发生。经典途径起始于第一补体成分(C1)通过 C1q(一种涉及抗体结合的亚成份)与免疫复合物的结合。c1 复合物由 C1q 和两种同源的丝氨酸蛋白酶 C1r 和 C1s 组成(1:2:2 摩尔比率)。与免疫复合物结合后,C1q 经历构象变化,导致 C1r 和 C1s 转变为它们的活化形式。活化的 C1s 切割 C4 和 C2 产生它们的片段的复合物 C4b2a,其又将 C3 切割为 C3a 和 C3b。C3b 结合免疫复合物。

[0009] 替代途径的激活不涉及抗体。通过 C3 与两种丝氨酸蛋白酶, 因子 B 和 D 的相互作用由 C3 产生的 C3b 分子沉积在微生物表面上, 在此处 C3 的活化得以扩增。任一途径激活所产生的 C3b 在随后能够溶解微生物的攻膜复合体形成中发挥中枢分子的作用, 还发挥调理素的作用。

[0010] 还不知道  $\beta$ -1,6-葡聚糖是否在所有受试者中产生强免疫应答以及通过何种机制产生这样的应答。

[0011] 发明概述

[0012] 在一个实施方案中, 本发明提供了用于确定受试者对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性的诊断方法, 该方法包括:

[0013] ▶评估暴露于葡聚糖的受试者中免疫球蛋白 G(IgG) 1、2、3 和 4 同种型的相对效价; 和

[0014] ▶使相对于 IgG4, 高 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或它们的组合的存在与对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性相关联。

[0015] 在一个实施方案中, 该方法进一步包括在评估相对 IgG 同种型效价之前, 将受试者细胞与基于葡聚糖的疫苗或佐剂接触, 其中在一个实施方案中, 包含 0-乙酰化葡聚糖, 以及在另一个实施方案中, 包含分离自或来源于地衣或真菌的葡聚糖, 其中真菌任选地是酵母, 其中在一个实施方案中, 其分离自或来源于石耳科 (Umbilicariaceae)。在另一个实施方案中, 基于葡聚糖的疫苗或佐剂包含化学合成的或乙酰化的葡聚糖; 在另一个实施方案中, 基于葡聚糖的疫苗或佐剂包含缀合于颗粒的葡聚糖。

[0016] 在一个实施方案中, 该方法进一步包括给予所述受试者细胞因子, 其中在一个实施方案中, 所述细胞因子包含白介素 2、白介素 12、干扰素- $\gamma$  或它们的组合

[0017] 在另一个实施方案中, 本发明提供了用于确定受试者对基于葡聚糖的疫苗或佐剂应答性的诊断试剂盒, 所述试剂盒包含:

[0018] ▶与所述疫苗或佐剂中的葡聚糖相应或同源的葡聚糖;

[0019] ▶用于检测受试者样品中相对免疫球蛋白 G(IgG) 1、2、3 和 4 同种型效价的试剂; 和

[0020] ▶任选地来源于对所述基于葡聚糖的疫苗或佐剂阳性和阴性应答者的一系列标准样品。

[0021] 根据本发明的该方面, 以及在一个实施方案中, 葡聚糖附着于基质, 其中在一个实施方案中, 所述基质是微量滴定板, 或在另一个实施方案中所述基质是珠子。在一个实施方案中, 试剂包含可检测的标记, 使该检测得以半定量。

[0022] 在另一个实施方案中, 本发明提供了刺激受试者免疫应答的方法, 其包括给予受试者纯化的  $\beta$ -1-6-葡聚糖以及试剂, 其使抗体生产倾向于以产生与免疫球蛋白 G(IgG) 4 相比, 相对更多量的免疫球蛋白 G(IgG) 1、2 或 3。

[0023] 根据本发明的该方面, 以及在一个实施方案中, 同时给予受试者纯化的  $\beta$ -1-6-葡聚糖和试剂, 或在另一个实施方案中, 顺序给予受试者纯化的  $\beta$ -1-6-葡聚糖和试剂。在另一个实施方案中, 给予受试者所述纯化的  $\beta$ -1-6-葡聚糖和所述细胞因子各自至少两次。

[0024] 在一个实施方案中, 试剂是细胞因子, 其中在一个实施方案中, 所述细胞因子是白

介素-2、白介素-12或干扰素- $\gamma$ 或它们的组合。在另一个实施方案中,试剂下调白介素-4或白介素-10产生或干扰白介素-4或白介素-10活性。

[0025] 在一个实施方案中,受试者进一步暴露于与免疫应答的靶相关的抗原,其中在一个实施方案中,所述抗原是肿瘤相关抗原。根据本发明的该方面,以及在一个实施方案中,受试者具有增生性或瘤前病变;在另一个实施方案中,该方法对受试者的癌症进行治疗、延迟癌症的进展、延长癌症的缓解或降低癌症的发病率或严重程度。在另一个实施方案中,受试者患有癌症。在另一个实施方案中,受试者未被诊断有癌症。在另一个实施方案中,受试者未被诊断有肿瘤。

[0026] 在另一个实施方案中,抗原来源于病原体,其中在一个实施方案中,所述病原体是真菌。在一个实施方案中,该方法对受试者的感染进行治疗、延迟感染的进展、延长感染的潜伏状态或降低感染的发病率或严重程度。

[0027] 在一个实施方案中,本发明提供了基于葡聚糖的疫苗或佐剂,或包含含有 $\beta$ 1-6葡聚糖的颗粒的葡聚糖的用途。在某些实施方案中,所述颗粒由按干重计至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的 $\beta$ 1-6葡聚糖组成。在某些实施方案中,所述颗粒基本上由 $\beta$ 1-6葡聚糖组成。任选地,在某些实施方案中,所述 $\beta$ 1-6葡聚糖富含O-乙酰基。本发明进一步提供了如本文所述的方法和试剂盒,其可利用任何上述颗粒,或包含任何上述颗粒的组合物。

[0028] 在一个实施方案中, $\beta$ 1-6葡聚糖富含O-乙酰基,其中在一个实施方案中,包含按重量计至少25%的O-乙酰化葡聚糖。

[0029] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的基于葡聚糖的疫苗或佐剂,或葡聚糖包含具有 $\beta$ -1,6葡聚糖支链的 $\beta$ -1,3葡聚糖(也称为 $\beta$ 1,3/1,6,葡聚糖或 $\beta$ -1,6-支化 $\beta$ -1,3-葡聚糖),其中至少某些 $\beta$ -1,6葡聚糖支链富含O-乙酰基。在另一个实施方案中,本发明使用了包含(i)富含O-乙酰基的 $\beta$ 1-6葡聚糖和(ii) $\beta$ -1,6-支化 $\beta$ -1,3-葡聚糖的组合物。

[0030] 在本发明的任何实施方案中,关于术语“接触”或其语法形式,所述接触可发生在受试者体外或体内。在一个实施方案中,将细胞从受试者中移除,与所述试剂或成分或组合物接触,然后在随后的时间点给予受试者,其中在一些实施方案中,所述细胞是嗜中性白细胞。将细胞(其中在一些实施方案中,所述细胞是嗜中性白细胞,或在其他实施方案中,所述细胞是其他免疫系统细胞,例如其他专职的抗原呈递细胞,例如巨噬细胞或树突细胞、单核细胞、NK细胞、B细胞等)在体外与本发明的试剂/成分或组合物接触,然后在另一试剂给予受试者的时间点返回至受试者,或将另一细胞群在体外与本发明的试剂/成分或组合物接触,然后返回至受试者。合适的时间段可以是例如在已进行治疗但未获得期望结果之后,或例如期望更好的效果,例如免疫球蛋白G4(IgG4)产量太高,以及之后的重复给予细胞因子,并随后暴露于葡聚糖,产生更多的IgG1、2或3。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供了包含含有葡聚糖的基质的试剂盒。在一个实施方案中,该基质是微粒、毫微粒、微量滴定板或任何适合于这样的诊断测定法例如适合于自动化测定法的一部分,或以微粒、毫微粒、微量滴定板或任何适合于这样的诊断测定法例如适合于自动化测定法的形式存在。

[0032] 本发明的一个方面涉及用于检测应答于 $\beta$ -1,6-葡聚糖所分泌的免疫球蛋白

G(IgG) 抗体的量的方法 ;所述方法包括以下步骤 :

- [0033] 在用  $\beta$ -1,6- 葡聚糖攻击前从受试者中获得第一血样 ;
- [0034] 在用  $\beta$ -1,6- 葡聚糖攻击后从受试者中获得第二血样 ;
- [0035] 在定量或测量 IgG 抗体存在的测定中,提供足够的时间来产生在溶液中可读的信号并检测所述 IgG 抗体结合的溶液中的该信号 ;
- [0036] 计算来自所述第一和第二血样的所述 IgG 抗体结合的信号,以确定 IgG 抗体分泌的量,其中信号间的差异表明应答于  $\beta$ -1,6- 葡聚糖所产生的 IgG 抗体的量 ;以及
- [0037] 将所述差异与阳性和阴性对照进行比较 ;其中超过阈值的所述差异确定受试者对  $\beta$ -1,6- 葡聚糖的应答性。
- [0038] 在某些实施方案中,所述抗体包含完整的免疫球蛋白 G 或其片段。
- [0039] 在某些实施方案中,所述抗体可包含选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的同种型。
- [0040] 在某些实施方案中,所述抗体是 IgG2。
- [0041] 在某些实施方案中,所述受试者可以是人。
- [0042] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖分离自地衣、真菌或酵母。
- [0043] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖分离自石耳科。
- [0044] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖包含 O- 乙酰化的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖。
- [0045] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖包含化学合成的、基因工程的或 O- 乙酰化的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖。
- [0046] 在某些实施方案中,通过酶联免疫测定法、放射免疫测定法、免疫沉淀、荧光免疫测定法、化学发光测定法、免疫印迹测定法、侧向流测定法、凝集测定法或基于微粒的测定法来测定 IgG 抗体的量。
- [0047] 在某些实施方案中,该药物组合物进一步包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖。
- [0048] 本发明的另一个方面涉及用于测量 IgG 水平的诊断试剂盒,其包含 :
- [0049] (i) 包含  $\beta$ -1,6- 葡聚糖的药物组合物 ;
- [0050] (ii) 用于检测血样中结合所述药物组合物的 IgG 抗体的试剂 ;
- [0051] (iii) 任选地来源于所述药物组合物阳性和阴性应答者的一系列标准样品 ;以及
- [0052] (iv) 使用该药物组合物来检测血样中 IgG 量的说明书。
- [0053] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖处于溶液中或是冻干的。
- [0054] 在某些实施方案中,所述  $\beta$ -1,6- 葡聚糖固定在基质上。
- [0055] 在某些实施方案中,所述基质包含选自塑料、玻璃、凝胶、赛璐珞、纸、磁性树脂、聚偏二氟乙烯、尼龙、硝酸纤维素、琼脂糖、胶乳和聚苯乙烯的材料。
- [0056] 在某些实施方案中,所述基质包含 ELISA 板、浸渍片、微量滴定板、放射性免疫测定平板、珠子、琼脂糖珠、塑料珠、胶乳珠、免疫印迹膜和免疫印迹纸。
- [0057] 在某些实施方案中,所述试剂缀合于可检测的标记。
- [0058] 在某些实施方案中,所述可检测的标记选自放射性标记、荧光标记、化学发光标记、生色标记、配体、荧光素、放射性同位素、磷酸酶、生物素、生物素相关化合物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白相关化合物和过氧化物酶。
- [0059] 本发明的另一个方面涉及包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6- 葡聚糖的组合物。
- [0060] 在某些实施方案中,所述葡聚糖是 O- 乙酰化的。

- [0061] 在某些实施方案中,所述葡聚糖包含按重量计至少 25% 的 O-乙酰化葡聚糖。
- [0062] 在某些实施方案中,所述葡聚糖分离自地衣、酵母、真菌、或是化学合成的,或是基因工程的。
- [0063] 在某些实施方案中,所述葡聚糖分离自石耳科。
- [0064] 在某些实施方案中,所述靶向部分选自抗体、抗原、受体配体、表位、多糖、肽以及它们的任意组合。
- [0065] 在某些实施方案中,所述靶向部分是抗原;所述抗原选自糖蛋白、黏蛋白(mucoprotein)、核酸、碳水化合物、蛋白聚糖、脂类、黏蛋白分子(mucin molecule)、肿瘤相关抗原以及它们的任意组合。
- [0066] 在某些实施方案中,所述抗原是肿瘤相关抗原。
- [0067] 在某些实施方案中,所述肿瘤相关抗原存在于选自卵巢癌、黑素瘤、胰腺癌、结肠直肠癌、伯基特氏淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、肺癌、白血病、乳腺癌、骨髓癌、结肠腺癌、胃癌、胚胎性癌、前列腺癌和子宫内膜癌的癌细胞上。
- [0068] 在某些实施方案中,所述癌细胞是卵巢癌;所述肿瘤相关抗原是 CA125 或 CD46。
- [0069] 在某些实施方案中,所述癌细胞是黑素瘤细胞;所述肿瘤相关抗原选自 p97、gp75、HMW-MAA、神经节苷脂 GD2、神经节苷脂 GD3、MAGE、BAGE、Mart-1R24、神经节苷脂 GM2 和神经节苷脂 GM3。
- [0070] 在某些实施方案中,所述癌细胞是胰腺癌;所述存在的肿瘤相关抗原是 ADMR 或 CRLR。
- [0071] 在某些实施方案中,所述癌细胞是癌胚癌;所述肿瘤相关抗原是 CEA。
- [0072] 在某些实施方案中,所述癌细胞是结肠直肠癌;所述肿瘤相关抗原选自 TAG-72、C017-1A、GICA 19-9、CTA-1、LEA、VEP8、VEP9、My1、VIM-D5、D156-22、C4BP 和 DAF。
- [0073] 在某些实施方案中,所述癌细胞是伯基特氏淋巴瘤;所述肿瘤相关抗原是抗原-38.13 或 CD19。
- [0074] 在某些实施方案中,所述癌细胞是人 B-淋巴瘤;所述肿瘤相关抗原是 CD20 或 CD33。
- [0075] 在某些实施方案中,所述癌细胞是人肺癌;所述肿瘤相关抗原是 L6、L20、F3 或 CD117。
- [0076] 在某些实施方案中,所述癌细胞是人白血病 T 细胞;所述肿瘤相关抗原是 gp37、拟糖蛋白、神经鞘脂类或 APO-1。
- [0077] 在某些实施方案中,所述癌细胞是乳腺癌细胞;所述肿瘤相关抗原是 EGFR、HER/neu、CR1、M18 或 M39。
- [0078] 在某些实施方案中,所述癌细胞是骨髓癌;所述肿瘤相关抗原是 T5A7 或 SSEA-1。
- [0079] 在某些实施方案中,所述癌细胞是结肠腺癌细胞;所述肿瘤相关抗原是 C14、C0-514 或 NS-10。
- [0080] 在某些实施方案中,所述癌细胞是胃癌细胞;所述肿瘤相关抗原是黏蛋白、AH6 或 FHL-1。
- [0081] 在某些实施方案中,所述癌细胞是胚胎性癌细胞;所述肿瘤相关抗原选自 Y 半抗原、Ley、FC 10.2、4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2 和 M1:22:25:8。

- [0082] 在某些实施方案中,所述癌细胞是前列腺癌;所述肿瘤相关抗原是 CD55 或 MCP。
- [0083] 在某些实施方案中,所述癌细胞是子宫内膜癌;所述肿瘤相关抗原是 CD35。
- [0084] 在某些实施方案中,所述靶向部分是表位;所述表位选自 T 辅助细胞表位 (TH)、趋化因子表位、嗜中性白细胞表位、MHC II 类分子和吞噬细胞表位。
- [0085] 在某些实施方案中,所述表位是嗜中性白细胞表位;所述嗜中性白细胞表位选自 L- 选择蛋白、2- 整联蛋白、补体受体 1 (CR-1)、衰变加速因子 (DAF)、C5a 受体、胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 和 ICAM-3。
- [0086] 在某些实施方案中,所述表位是吞噬细胞表位;所述吞噬细胞表位是 Fc 受体。
- [0087] 在某些实施方案中,所述表位是趋化因子表位;所述趋化因子表位是 CD40、CD80 或 CD86。
- [0088] 在某些实施方案中,所述表位是 MHC II 类分子;所述 MHC II 类分子选自 CD69、ADAM8、CD 14、CD163、CD33、CD63、CD68、CD74、CHIT1、CHST10、CSF 1R、DPP4、FABP4、FCGR1A、ICAM2、IL1R2、ITGA1、ITGA2、S100A8 和 TNFRSF8。
- [0089] 在某些实施方案中,所述 TH 表位能够被抗原呈递细胞 (APC) 摄入,所述 TH 表位能够被 APC 加工,由此 APC 在它的表面呈递结合 MHC II 类分子的 TH 表位。
- [0090] 在某些实施方案中,所述靶向部分是抗体;所述抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、双特异性抗体、双抗体、三链抗体、四链抗体和微抗体。
- [0091] 在某些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。
- [0092] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体选自阿仑单抗 (Campath)、贝伐单抗 (Avastin)、西妥昔单抗 (Erbix)、吉姆单抗 (Mylotarg)、替伊莫单抗 (Zevalin)、帕尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan)、托西莫单抗 (Bexxar)、曲妥单抗 (Herceptin)、在呼吸道合胞病毒 A 和 F 蛋白中的帕利珠单抗 (Synagis) 以及免疫球蛋白 G2。
- [0093] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是阿仑单抗 (Campath);所述阿仑单抗 (Campath) 靶向存在于胰腺癌细胞上的 CD52。
- [0094] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是贝伐单抗 (Avastin);所述贝伐单抗 (Avastin) 靶向存在于结肠直肠癌中的 VEGF。
- [0095] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是西妥昔单抗 (Erbix);所述西妥昔单抗 (Erbix) 靶向存在于头颈鳞状细胞癌或乳腺癌上的 EGFR。
- [0096] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是吉姆单抗 (Mylotarg);所述吉姆单抗 (Mylotarg) 靶向存在于骨髓性白血病上的 CD33。
- [0097] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是替伊莫单抗 (Zevalin)、帕尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan) 或托西莫单抗 (Bexxar);所述替伊莫单抗 (Zevalin)、帕尼单抗 (Vectibix)、利妥昔单抗 (Rituxan) 或托西莫单抗 (Bexxar) 靶向存在于 B- 细胞淋巴瘤上的 CD20。
- [0098] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是曲妥单抗 (Herceptin);所述曲妥单抗 (Herceptin) 靶向存在于乳腺癌上的 HER/neu。
- [0099] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是帕利珠单抗 (Synagis);所述帕利珠单抗 (Synagis) 靶向存在于呼吸道合胞病毒上的 A 和 F 蛋白。
- [0100] 在某些实施方案中,所述单克隆抗体是免疫球蛋白 G;所述免疫球蛋白 G 靶向存在

于真菌或细菌性病原体上的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

[0101] 在某些实施方案中,所述抗体是多克隆抗体;所述多克隆抗体结合任意前述抗原和表位。

[0102] 在某些实施方案中,所述抗体包含至少一个结合 IgG2 的抗原结合位点。

[0103] 在某些实施方案中,所述抗体包含针对任意前述抗原和表位的第二、第三或第四抗原结合位点。

[0104] 在某些实施方案中,该组合物进一步包含同时或相继给予佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

[0105] 本发明的另一个方面涉及药物制剂,其包含任意前述的连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物中的一种组合物;以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0106] 本发明的另一方面涉及用于调节受试者免疫应答的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的任意前述连接于靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的组合物中的一种组合物。

[0107] 在某些实施方案中,所述针对靶标癌细胞、感染剂、病原体或感染部位的免疫应答被刺激。

[0108] 在某些实施方案中,所述免疫应答刺激或增强热休克蛋白表达。

[0109] 在某些实施方案中,所述免疫应答诱导活性氧类别 (RoS) 产生。

[0110] 在某些实施方案中,所述免疫应答增强或刺激嗜中性白细胞吞噬作用或细胞毒溶胞作用。

[0111] 在某些实施方案中,所述免疫应答增强或刺激补体 - 介导的溶胞作用。

[0112] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、肽、免疫刺激化合物、治疗剂或它们的组合。

[0113] 在某些实施方案中,所述治疗剂选自抗炎剂、抗病毒剂、抗生素、抗感染剂、葡聚糖合成抑制剂、抗原虫剂、抗组胺剂、减充血剂、抗精神病药、有丝分裂抑制剂和它们的任意组合。

[0114] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗病毒剂;所述抗病毒剂是阿昔洛韦、奈非那韦或病毒唑。

[0115] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗生素;所述抗生素选自氨苄西林、青霉素 G、青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、大环内酯类、碳青霉烯、青霉烯、单环  $\beta$ -内酰胺类、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂、四环素类、多肽抗生素、氯霉素、夫西地酸、林可霉素、新生霉素、壮观霉素、聚醚离子载体和喹诺酮类。

[0116] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗感染剂;所述抗感染剂选自苯扎氯铵、洗必泰、氨苯砜、氯霉素、新霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢拉定、红霉素、克林霉素、林可霉素、阿莫西林、氨苄西林、巴氨西林、羧苄西林、双氯西林、环己西林、picloxacillin、海他西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、青霉素、替卡西林、利福平、四环素、二氟尼柳、布洛芬、吡哆美辛、甲氯胺苯酸盐、甲芬那酸、萘普生、羟布宗、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、阿司匹林、水杨酸盐类和两性霉素 B。

[0117] 在某些实施方案中,所述治疗剂是葡聚糖合成抑制剂;所述葡聚糖合成抑制剂选自卡泊芬净、米卡芬净、阿尼芬净 (LY303366)、益康唑、特康唑、氟康唑、伏立康唑和灰黄霉素。

[0118] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗原虫剂;所述抗原虫剂是甲硝唑、妥布氯唑、噻苯唑或奥芬唑。

[0119] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗组胺剂;所述抗组胺剂是阿司咪唑、左卡巴斯汀、西替利嗪或肉桂苯哌嗪。

[0120] 在某些实施方案中,所述治疗剂是减充血剂;所述减充血剂是假麻黄碱。

[0121] 在某些实施方案中,所述治疗剂是抗精神病药;所述抗精神病药是氟司必林、五氟利多、利培酮或齐拉西酮。

[0122] 在某些实施方案中,所述治疗剂是有丝分裂抑制剂;所述有丝分裂抑制剂是依托泊甙、秋水仙碱,或长春花生物碱类。

[0123] 在某些实施方案中,所述免疫应答被下调或消除。

[0124] 在某些实施方案中,所述免疫应答下调或消除干扰素、白介素、肿瘤坏死因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、嗜中性白细胞活化蛋白(NAP)、巨噬细胞趋化及活化因子(MCAF)、RANTES或巨噬细胞炎性肽的活化。

[0125] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予免疫抑制剂。

[0126] 本发明的另一个方面涉及对受试者的癌症进行治疗、延迟癌症的进展、延长癌症的缓解或降低癌症的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的任意前述连接靶向部分的 $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物中的一种组合物。

[0127] 在某些实施方案中,所述针对靶标癌细胞、增生性病变或瘤前病变的免疫应答被刺激。

[0128] 在某些实施方案中,所述免疫应答增强嗜中性白细胞吞噬作用、刺激细胞毒溶胞作用、诱导ROS产生、诱导热休克蛋白的表达或增强补体-介导的溶胞作用。

[0129] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予化学治疗剂、细胞毒剂、抗肿瘤剂或它们的组合。

[0130] 在某些实施方案中,所述细胞毒剂选自ErbB受体抑制剂、VEGF受体抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白激酶A抑制剂、抗血管生成剂、抗激素剂和细胞因子。

[0131] 在某些实施方案中,所述化学治疗剂选自顺铂、多柔比星、吉西他滨、多西他赛、紫杉醇和博来霉素。

[0132] 在某些实施方案中,所述抗肿瘤剂选自螺铂、顺铂、卡铂、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素、安丝菌素、博来霉素、阿糖胞苷、阿糖腺苷、巯基聚赖氨酸、长春新碱、白消安、苯丁酸氮芥、美法仑、PAM、L-PAM、苯丙氨酸氮芥、巯基嘌呤、米托坦、盐酸丙卡巴肼、放线菌素D、盐酸柔红霉素、盐酸多柔比星、紫杉醇和其他紫杉烷类、雷帕霉素、手霉素A、TNP-470、普卡霉素、光辉霉素、氨鲁米特、雌氮芥磷酸钠、氟他胺、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、柠檬酸他莫昔芬、睾内酯、曲洛司坦、安吡啶(m-AMSA)、天冬酰胺酶(L-天冬酰胺酶)欧文氏菌属天冬酰胺酶、干扰素 $\alpha$ -2a、干扰素 $\alpha$ -2b、替尼泊甙(VM-26)、硫酸长春碱(VLB)、硫酸长春新碱、硫酸博来霉素、羟基脲、丙卡巴肼和达卡巴嗪。

[0133] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

[0134] 本发明的另一个方面涉及对受试者的感染进行治疗、延迟感染的进展、延长感染

的潜伏状态或降低感染的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的任意前述连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物。

[0135] 在某些实施方案中,所述针对靶标寄生虫、病毒、真菌、病原体、细菌或感染剂的免疫应答被刺激。

[0136] 在某些实施方案中,所述免疫应答增强嗜中性白细胞吞噬作用、刺激细胞毒溶胞作用、诱导 ROS 产生、诱导热休克蛋白的表达或增强补体-介导的溶胞作用。

[0137] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予抗生素、抗病毒剂、抗感染剂、抗原虫剂、佐剂、抗原、免疫调节化合物或它们的组合。

[0138] 本发明的另一个方面涉及对受试者的炎症进行治疗、延迟炎症的进展、降低炎症的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的任意前述连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物。

[0139] 在某些实施方案中,位于靶标炎症病灶处的所述炎症被下调或消除。

[0140] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予佐剂、抗原、肽、免疫刺激化合物、抗炎剂或它们的组合。

[0141] 在某些实施方案中,所述抗炎剂选自倍他米松、强的松龙、吡罗昔康、阿司匹林、氟比洛芬和 (+)-N-{4-[3-(4-氟代苯氧基)苯氧基]-2-环戊烯-1-基}-N-羟基脲。

[0142] 本发明的另一个方面涉及对受试者的自身免疫应答进行治疗、延迟自身免疫应答的进展或降低自身免疫应答的发病率或严重程度的方法,其包括给予需要其的受试者治疗有效量的任意前述连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物。

[0143] 在某些实施方案中,针对靶标移植组织、移植细胞、自身抗原或 HIV 感染的所述自身免疫应答被下调或消除。

[0144] 在某些实施方案中,所述自身免疫应答下调白介素、肿瘤坏死因子或干扰素的活化。

[0145] 在某些实施方案中,该方法进一步包括同时或相继给予免疫抑制剂。

[0146] 本发明的另一个方面涉及包含纯化的连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的组合物,其中该组合物是药物组合物、食品或食物产品 (foodproduct)、食品补充剂或化妆用组合物。

[0147] 在某些实施方案中,该组合物包含已被加工的连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖,相对于未加工的  $\beta$ -1,6-葡聚糖,增加了它的介导免疫应答能力。

[0148] 在某些实施方案中,至少 95% 的包含于该组合物中的葡聚糖是连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。

[0149] 本发明的另一个方面涉及包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的胶粒,其中所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖任选地是 O-乙酰化的。

[0150] 本发明的另一个方面涉及包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的组合物,其中所述生物可降解的聚合物降解形成生物学活性的水杨酸盐或  $\alpha$ -羟酸部分以及所述  $\beta$ -1,6-葡聚糖任选地是 O-乙酰化的。

[0151] 本发明的另一个方面涉及包含微球的颗粒,该微球连接于任意前述连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的组合物。

[0152] 本发明的另一个方面涉及医用装置,其包含任意前述连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡

聚糖和生物可降解的聚合物的组合物中的组合物。

[0153] 在某些实施方案中,用包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的组合物涂覆至少一部分表面。

[0154] 在某些实施方案中,该装置选自导管、支架、瓣膜、起搏器、中心线 (central line)、子宫托、管、分流器、饲管、引流管和矫形外科硬件装置。

[0155] 在某些实施方案中,该组合物包含含有聚合物和连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的涂层。

[0156] 在某些实施方案中,该组合物包含含有聚合物和连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的涂层,其中该聚合物是生物可降解的。

[0157] 本发明的另一个方面涉及治疗受试者的方法,其包括将任意前述医用装置植入或导入需要其的受试者体内。

[0158] 本发明的另一个方面涉及涂覆材料,其包含:(a) 基质;和 (b) 与所述基质的至少一部分表面在物理上相结合的包含连接靶向部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖组合物,其中所述组合物任选地以凝胶或薄膜的形式存在。

[0159] 在某些实施方案中,该组合物是聚合物。

[0160] 在某些实施方案中,该组合物包含生物可降解的聚合物。

[0161] 在某些实施方案中,该基质至少部分由金属、陶瓷或聚合物组成。

[0162] 本发明的另一个方面涉及治疗受试者的方法,其包括将需要其的受试者的身体与任意前述涂覆材料中的涂覆材料接触。

[0163] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请均在此全部引入作为参考,如同单个出版物或专利被明确且单独地说明引入作为参考。在说明书和引入的参考之间冲突的情况下,应以说明书为准。在该文件中给出数值范围处,端点包括在该范围内。此外,应当理解除非另有说明或明显不同于上下文和本领域普通技术人员的理解,表示为范围的值可取所述范围内的任何特定值或亚范围,任选地包括或排除端点之一或两者,在本发明不同的实施方案中,除非上下文另有清楚说明,否则至范围下限单位的十分之一。在百分数以关于固有地具有整数单位的值列举时,任何所得到的分数可大约至最接近的整数。

[0164] 附图简述

[0165] 图 1 显示了  $\beta$ -1,6-葡聚糖-包被的珠子 (A) 的吞入作用以及 ROS 产生 (B) 是抗体依赖的,与补体 (C) 的存在无关。

[0166] 图 2 显示了  $\beta$ -1,6-葡聚糖抗体在正常的成人血清中普遍存在。

[0167] 图 3 显示了选择 IgG 同种型影响对  $\beta$ -葡聚糖的应答性。

[0168] 图 4 显示了  $\beta$ -1,6-葡聚糖-Herceptin 缀合物是功能性的。

[0169] 图 5 显示了  $\beta$ -1,6-葡聚糖-Herceptin 缀合物介导由补体和嗜中性白细胞进行的杀伤癌细胞。

[0170] 应当理解的是为了图解的简单清楚起见,附图中所显示的要素不必按比例绘制。例如,为了清楚起见,某些要素的尺寸相对于其他要素可被放大。此外,在考虑适合的情况下,附图标记可在附图间重复以说明相应或类似的要素。

[0171] 发明详述

[0172] 在下列详细说明中,列出大量具体细节以提供本发明的详尽理解。然而,本领域普

通技术人员应当理解本发明无需这些具体细节就可实施。在其他的情况下,不详细描述众所周知的方法、过程和成分,也不会使本发明难以理解。

[0173] 葡聚糖是迄今为止在所有研究的地衣真菌物种中都有发现的多糖。部分 0-乙酰化的石耳素是石耳科 (Umbilicariacear) 的特征,并已在石耳属 (Umbilicaria) 的几个种例如 *U. pustulata* 和 *U. hirsute*、*U. angulata*、*U. caroliniana*、以及复叶石耳 (*U. polyphylla*) 中描述。

[0174] 本发明人发现对  $\beta$ -1,6-葡聚糖的应答性是抗体依赖的,并且发现该应答的稳定性 (robustness) 与受试者具有特定免疫球蛋白 G (IgG) 同种型表达相关。因此,这样的表达可用于预测受试者对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性,并且这样的活性可用于调节免疫应答。

[0175] 在一个实施方案中,本发明提供了用于确定受试者对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性的诊断方法,该方法包括:

[0176] ➤评估暴露于葡聚糖的受试者中免疫球蛋白 G (IgG) 1、2、3 和 4 同种型的相对效价;和

[0177] ➤使相对于 IgG4,高 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或它们的组合的存在与对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性相关联。

[0178] 在一些实施方案中,这种方法可在受试者的任何生物液体或分离自受试者的任何样品上实施。在一些实施方案中,这种方法在分离自受试者的血清或血浆上实施。

[0179] 应当理解的是存在多种本领域已知的用于评估 IgG 同种型效价的方法,例如,可进行改进的 ELISA 测定法,在此葡聚糖或其片段吸附于基质,然后与来自受试者的液体或样品温育,使得可通过用酶标记的抗  $\beta$ -IgG 亚类特异性第二抗体的探测来测定葡聚糖诱导的抗体同种型。还可利用其他测定法,例如 Ouchterlony (双扩散) 测定法,或其他市售的单步鉴定方法。

[0180] 在一个实施方案中,该方法特异性评估给定样品中 IgG 同种型表达中的相对差异,使得相对于 IgG4, IgG1、IgG2 或 IgG3 的相对增加作为对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性的指示剂。

[0181] 在一个实施方案中,该方法进一步包括在评估 IgG 同种型相对效价之前将受试者中细胞与基于葡聚糖的疫苗或佐剂接触,其中在一个实施方案中,所述葡聚糖包含 0-乙酰化葡聚糖,以及在另一个实施方案中,包含分离自或来源于地衣或真菌的葡聚糖,其中所述真菌任选地是酵母,在一个实施方案中,其分离自或来源于石耳科。

[0182] 在一些实施方案中,本发明的方法使用了包含纯化的  $\beta$  1-6 葡聚糖的组合物,其中在本发明的多个实施方案中,该组合物是药物组合物、食品或食物产品、食品补充剂或化妆用组合物。在一些实施方案中,该组合物不同于例如石耳素的组合物或真菌细胞壁制品。在本发明的某些实施方案中,按重量计包含在该组合物中的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99% 的葡聚糖是  $\beta$  1-6 葡聚糖。在某些实施方案中,包含于组合物中的 20% -50% 的葡聚糖是  $\beta$  1-6 葡聚糖。在某些实施方案中,包含于组合物中的 50% -100% 的葡聚糖是  $\beta$  1-6 葡聚糖。在本发明任意组合物或方法的一个实施方案中,葡聚糖包含按重量计约 15% - 约 30% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖。在本发明任意组合物或方法的另一个实施方案中,葡聚糖包含按重量计约 10% - 约 35% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖,或在另

一个实施方案中,按重量计约 20% - 约 50% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 25% - 约 60% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 35% - 约 80% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 18% - 约 35% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 15% - 约 75% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖。在某些实施方案中,所述葡聚糖是寡聚物或聚合物的混合物,其中按那些寡聚物或聚合物的重量计, $\beta$  -1,6- 葡聚糖大于约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或 99%。在本发明的某些实施方案中,“重量”指“干重”。在其他实施方案中,“重量”指总重量。在本发明的某些实施方案中, $\beta$  1-6 葡聚糖是经加工的。这种加工可包括例如脱乙酰作用、用消化除  $\beta$  1-6 葡聚糖以外的葡聚糖的酶处理、用消化  $\beta$  1-6 葡聚糖的酶进行有限消化、选择特定的分子量范围等。在某些实施方案中,加工包括与其他葡聚糖如  $\alpha$ - 葡聚糖、. 1-3 葡聚糖等分离。在某些实施方案中,该加工包括从 . 1-3 葡聚糖上除去  $\beta$  1-6 葡聚糖侧链以及任选地分离  $\beta$  1-6 葡聚糖侧链。在某些实施方案中,该组合物包含经加工的  $\beta$  1-6 葡聚糖,其中相对于未加工的葡聚糖或相对于未加工的  $\beta$  1-6 葡聚糖,该经加工的  $\beta$  1-6 葡聚糖显示所期望的调节免疫应答的能力有所增强。

[0183] 在一个实施方案中,本发明使用了富含 O- 乙酰基的  $\beta$  1-6 葡聚糖。在一个实施方案中,在根据本发明的方法使用的任意制品中,葡聚糖包含按重量计至少 25% 的 O- 乙酰化葡聚糖。在一个实施方案中,在根据本发明的方法使用的任意制品中,葡聚糖包含按重量计约 15% - 约 30% 的 O- 乙酰化葡聚糖。在另一个实施方案中,在根据本发明的方法使用的任意制品中,葡聚糖包含按重量计约 10% - 约 35% 的 O- 乙酰化葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 20% - 约 50% 的 O- 乙酰化葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 25% - 约 60% 的 O- 乙酰化葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 35% - 约 80% 的 O- 乙酰化葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 18% - 约 35% 的 O- 乙酰化葡聚糖,或在另一个实施方案中,按重量计约 15% - 约 75% 的 O- 乙酰化葡聚糖。在其他实施方案中,葡聚糖包含按重量计约 75% -100% 的 O- 乙酰化葡聚糖,如按重量计 75% -90% 或 90% -100% 的 O- 乙酰化葡聚糖。在一个实施方案中,在根据本发明的方法使用的任意制品中,葡聚糖包含大约一定百分数的 O- 乙酰化的葡萄糖单元(按重量或数量计,在本发明的多个实施方案中),其产生自用 . 1-6 内切葡聚糖酶消化天然存在的  $\beta$  1-6 葡聚糖(如石耳素或本文提及的任何其他  $\beta$  1-6 葡聚糖)足以将按重量计至少 90% 的  $\beta$  1-6 葡聚糖消化为包含 5 个或更少的葡萄糖单元的寡糖的时间,然后 (i) 从组合物中除去包含 5 个或更少的葡萄糖残基的那些寡糖或 (ii) 分离分子量大于 5kD 的所产生的组合物的一部分,或在某些实施方案中,分子量大于 10、20、30、50 或 100kD。

[0184] 在一些实施方案中,术语“富含 O- 乙酰化的残基”指与天然葡聚糖分子相比,在葡聚糖分子中的个体葡萄糖单元中具有增加百分比的 O- 乙酰化位点,在葡聚糖分子中具有增加百分比的 O- 乙酰化的葡萄糖单元,或它们的组合。在一个实施方案中,提及富含特定重量百分比的 O- 乙酰化葡聚糖的葡聚糖制品,是指与葡聚糖分子相比,在葡聚糖分子中的个体葡萄糖单元中包含增加百分比的 O- 乙酰化位点的制品,在葡聚糖分子中包含增加百分比的 O- 乙酰化的葡萄糖单元的制品,或它们的组合。

[0185] 在个体葡萄糖单元的 O- 乙酰化位点、葡聚糖分子中的 O- 乙酰化葡萄糖单元或它们的组合中,源自不同来源的葡聚糖可包含不同量的 O- 乙酰化。根据本发明的该方面,在

一些实施方案中,术语“富含 O-乙酰化葡聚糖”指与该葡聚糖所来源的参考源相比,具有增加的如本文所述的 O-乙酰化,但并不代表与任何葡聚糖来源相比是总体富含的。

[0186] 在一个实施方案中,术语“富含 O-乙酰化葡聚糖”指按重量计富含至少 25% 的在至少一个葡萄糖单元上是 O-乙酰化的葡聚糖链,或在该组合物的葡聚糖中存在的至少 25% 的葡萄糖单元是 O-乙酰化的或它们的组合。在一些实施方案中,在至少 1% 的  $\beta$  葡聚糖链中的至少 25% 的葡萄糖单元是 O-乙酰化的,或在另一个实施方案中,在至少 5% 的  $\beta$  葡聚糖链中的至少 25% 的葡萄糖单元是 O-乙酰化的。在其他实施方案中,在至少 5% 的  $\beta$  葡聚糖链中的 25% -35%、25% -50%、25% -75%、15% -45%、20% -60%、35% -80%,或其他量的葡萄糖单元是 O-乙酰化的等。在其他实施方案中,体现为在至少 10% 的  $\beta$  葡聚糖链中的 25% -35%、25% -50%、25% -75%、15% -45%、20% -60%、35% -80%,或其他量的葡萄糖单元是 O-乙酰化的,或在另一个实施方案中,在至少 15% 的  $\beta$  葡聚糖链中,或在另一个实施方案中,在至少 20% 的  $\beta$  葡聚糖链中上述含量的葡萄糖单元是 O-乙酰化的。

[0187] 在一个实施方案中,葡聚糖分离自或来源于地衣,在一个实施方案中,其分离自或来源于石耳属。在一个实施方案中,葡聚糖分离自真菌。在一个实施方案中,葡聚糖分离自酵母,或在另一个实施方案中,葡聚糖是化学合成的或乙酰化的。在另一个实施方案中,葡聚糖缀合于固相支持物。

[0188] 葡聚糖是尤其在真菌细胞壁中发现的含葡萄糖的多糖。 $\alpha$ -葡聚糖包含葡萄糖亚单元之间的一个或更多个  $\alpha$ -键,以及  $\beta$ -葡聚糖包括处于葡萄糖亚单元之间的一个或更多个  $\beta$ -键。

[0189]  $\beta$ -1,6-葡聚糖通常出现在真菌中,但罕见于真菌之外。根据本发明所使用的葡聚糖包含  $\beta$  1,6 葡聚糖。在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖来源于石耳科,例如 *U. pustulata* 和 *U. hirsute*、*U. angulata*、*U. caroliniana*、以及复叶石耳 (*U. polyphylla*)。

[0190] 在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖来源于念珠菌属 (*Candida*),例如白色念珠菌 (*C. albicans*)。其他可用到的  $\beta$ -葡聚糖所来源的生物包括粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*)、疣状毛癣菌 (*Trichophyton verrucosum*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatidis*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*) 和 *Pythium insidiosum*。在一些实施方案中,如本领域所知的, $\beta$ -葡聚糖是化学或酶促合成的,在其他实施方案中, $\beta$ -葡聚糖来源于任何产生其的物种,并且例如经化学或酶促改变来增加该分子的 O-乙酰化。

[0191] 在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖是真菌葡聚糖。“真菌”葡聚糖通常获自真菌,但当特定的葡聚糖结构见于真菌和非真菌(如细菌、低等植物或藻类)中时,则非真菌生物体可用作替代来源。

[0192] 全长天然  $\beta$ -葡聚糖是不溶性的,并具有兆道尔顿范围的分子量。在一些实施方案中,本发明提供了可溶性  $\beta$ -1,6-葡聚糖。在一些实施方案中,本发明提供了可溶的 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。在一些实施方案中,可通过将长的不溶性葡聚糖片段化来获得增溶。这可通过例如水解或在一些实施方案中通过用葡聚糖酶消化(如用  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶消化或用  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶进行限制性消化)得以实现。在其他实施方案中,可合成制备葡聚糖,以及例如在一些实施方案中,通过连接单糖构件 (building blocks)。这样的葡聚糖

的 O-乙酰化可容易地通过本领域已知方法实现。这些方法可包括化学和 / 或酶促乙酰化, 例如本领域已知的。

[0193] 存在多种真菌  $\beta$ -葡聚糖来源。例如, 纯的  $\beta$ -葡聚糖是市售的, 如石耳素 (Calbiochem) 是从 *Umbilicaria papullosa* 中纯化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。 $\beta$ -葡聚糖可以多种方式从真菌细胞壁中纯化, 例如 Tokunaka 等 [(1999) *Carbohydr Res* 316:161-172] 中所描述的, 并且通过本领域已知的方法产物可富含  $\beta$ -1,6-葡聚糖部分, 或 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖部分。

[0194] 本领域普通技术人员应当能够鉴定或选择合适的方法来富集  $\beta$ -1,6-葡聚糖部分和 / 或 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。在一个实施方案中, 通过化学方法进行  $\beta$ -葡聚糖的 O-乙酰化。例如, 在 speed vac 离心机中干燥多糖 (50mg) 并重悬于 1.5mL 乙酸酐 (Mallinckrodt) 中。在重悬后, 添加少许的 4-二甲基氨基吡啶晶体 (Avocado Research Chemist, Ltd) 作为催化剂。将反应在室温下进行 5、20 或 120 分钟, 然后用 2 体积水终止。然后用水将样品透析过夜。应当理解如本领域普通技术人员显而易见的, 该过程可以改变或按比例增大。在其他实施方案中, 用于分离 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的方法包括一个或更多个下列步骤, 其可以不同顺序来进行: (a) 基于更高的疏水性的分离, 例如结合至任何疏水基质 / 树脂; (b) 基于用合适的内切或外切葡聚糖酶或它们的组合消化的分离, 其中 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖对该消化具有抗性; (c) 使用结合  $\beta$ -1,6-葡聚糖或结合其中 O-乙酰基的抗体或其他部分的亲和分离; (d) 基于分子量的分离。在一个实施方案中, 用消化未乙酰化的和 / 或轻度乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的酶来消化  $\beta$ -1,6-葡聚糖。基于大小或分子量分离所得到的物质, 并分离包含高度乙酰化的葡聚糖的一部分。在一些实施方案中, 获得  $\beta$ -1,6-葡聚糖制品, 消化并将 O-乙酰化的寡糖分离, 或在另一个实施方案中, 将 O-乙酰化的寡糖分离并用于制备新组合物。这样的组合物代表了本发明的富含 O-乙酰化残基的  $\beta$ -1,6-葡聚糖制品的实施方案。

[0195] 应当理解用于制备富含 O-乙酰化的  $\beta$ -1,6-葡聚糖制品的任何方法的产物都应当被认为是适合于本发明的方法和试剂盒使用的。

[0196] 在一些实施方案中, 用于本发明的试剂盒和 / 或根据本发明的方法使用的葡聚糖可包含天然葡聚糖制品中不存在的结构修饰。这样的修饰可包含如本文所述的 O-乙酰化。在其他实施方案中, 这样的修饰可包括甲基化、烷基化、烷氧基化、硫酸化、磷酸化、脂类缀合或如本领域普通技术人员所知的其他修饰。在一些实施方案中, 该修饰包含用酸例如甲酸、琥珀酸、柠檬酸或本领域已知的其他酸的修饰 (如酯化)。

[0197] 在一些实施方案中, 可通过任何一种或多种本领域已知方法实现将脂类缀合于任何或所有的游离羟基, 例如在 Drouillat B, 等, *Pharm Sci.* 1998Jan; 87(1):25-30, B. N. A. Mbadugha, 等, *Org. Lett.*, 5(22), 4041-4044, 2003 中所描述的。

[0198] 在一些实施方案中, 可通过任何一种或多种本领域已知方法来实现并验证甲基化, 例如在 Mischnick 等 1994 *Carbohydr. Res.*, 264, 293-304; Bowie 等 1984, *Carbohydr. Res.*, 125, 301-307; Sherman 和 Gray 1992, *Carbohydr. Res.*, 231, 221-235; Stankowski 和 Zeller 1992, *Carbohydr. Res.*, 234, 337-341; Harris, P. J., 等 (1984) *Carbohydr. Res.* 127, 59-73; Carpita, N. C. & Shea, E. M. (1989) *Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol*

acetates. In Analysis of carbohydrates by GLC and MS (Biermann, C. J. & McGinnis, G. D., 编), pp. 157-216. CRC Press, Boca Raton, FL 中所描述的。

[0199] 在一些实施方案中,甲基化可通过如下得以确认:进一步衍生的 TMS 酯类、醋酸酯类或其他酯类的 GLC, 偶联的 MS, 或消化为单糖, 去-O-甲基化以及通过衍生化和 GLC/MS 的分析, 例如在 Pazur 1986, Carbohydrate Analysis-A Practical Approach, IRL Press, Oxford, pp. 55-96; Montreuil 等 1986, Glycoproteins. In M. F. Chaplin 和 J. F. Kennedy, (编), Carbohydrate Analysis-a Practical Approach, IRL Press, Oxford, pp. 143-204; Sellers 等 1990, Carbohydr. Res., 207, C1-C5; O' Neill 等 1990, Pectic polysaccharides of primary cell walls. In P. M. Dey (编), Methods in Plant Biochemistry, Volume 2, Carbohydrates, Academic Press, London, pp. 415-441; Stephen 等 1990, Methods in Plant Biochemistry, Volume 2, Carbohydrates, Academic Press, London, pp. 483-522; or Churms 1991, CRC Handbook of Chromatography. Carbohydrates, Volume II, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA) 中所描述的。

[0200] 在一些实施方案中,磷酸化,任选地包括其他修饰的引入,以及所得产物的验证可通过本领域普通技术人员熟知的方法来完成,参见例如 Brown, D. H., Biochem. Biophys. Acta, 7, 487 (1951); Roseman, S., 和 Daffner, I., Anal. Chem., 28, 1743 (1956); Kornberg, A., 和 Horecker, . B. L., in Methods in enzymology, Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 323; 美国专利号 4, 818, 752。

[0201] 在一些实施方案中,葡聚糖硫酸化以及所得产物的验证可根据本领域公知的任意方法来完成,例如在 Alban, S., 和 Franz, G. (2001), Biomacromolecules 2, 354-361; Alban, 等 (1992) Arzneimittelforschung 42, 1005-1008; 或 Alban, S., 等 (2001). Carbohydr. Polym. 47, 267-276 中所描述的。

[0202] 本发明还提供包含  $\beta$ -1,6-葡聚糖的胶粒的应用。在某些实施方案中,胶粒包含由含有  $\beta$ -1,6-葡聚糖的表面活性剂分子组成的复合物,其可分散于液态胶体中。在某些实施方案中,表面活性剂分子是两亲性的,即它们同时包含疏水基(它们的“尾部”)和亲水基(它们的“头部”)。在某些实施方案中,亲水成分包含  $\beta$ -1,6-葡聚糖,任选地根据任意一种或更多种本文描述的方法进行修饰。在某些实施方案中,处于水溶液中的胶粒形成聚集集体,亲水“头部”区与周围溶剂相接触,使得疏水尾部区隔绝在胶粒中心中。胶粒在形状上可以是球形的或近似球形的,但在某些实施方案中,胶粒是椭圆体、圆柱体或双层。在一些实施方案中,胶粒是聚合胶粒,例如在美国公开号 20020035217 中所描述的那些。在一些实施方案中,胶粒包囊活性剂,如疏水分子。示例性活性剂包括抗感染剂例如抗细菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗寄生虫药;用于治疗癌症的化学治疗剂;细胞因子、抗原等。

[0203] 本发明进一步提供了通过向其缀合脂类而被修饰的  $\beta$ -1,6-葡聚糖,其中在一些实施方案中,该修饰容许产生包含  $\beta$ -1,6-葡聚糖的胶粒,其中脂类附着于  $\beta$ -1,6-葡聚糖上。该脂类可以是直链或分支的,任选地被取代的烃。在一些实施方案中,该脂类包含脂肪酸。在一些实施方案中,脂类如脂肪酸,包含 4-26 个或 4-40 个碳原子。

[0204] 本发明还提供了包含共价或非共价连接于包含酵母葡聚糖或基本上由酵母葡聚糖组成的颗粒的  $\beta$ -1,6-葡聚糖的颗粒的应用或包含该颗粒的试剂盒。还提供了包含能与酵母葡聚糖的官能团反应以形成共价键的反应部分的  $\beta$ -1,6-葡聚糖。酵母葡聚糖可包含

$\beta$ -1,6-葡聚糖、 $\beta$ -1,3-葡聚糖、其他葡聚糖或它们的组合。

[0205] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于确定受试者对基于葡聚糖的疫苗或佐剂的应答性的诊断试剂盒,所述试剂盒包含:

[0206] ▶与所述疫苗或佐剂中的葡聚糖相应或同源的葡聚糖;

[0207] ▶用于检测受试者样品中免疫球蛋白 G(IgG) 1、2、3 和 4 同种型的相对效价的试剂;以及

[0208] ▶任选地来源于对所述基于葡聚糖的疫苗或佐剂阳性和阴性应答者的一系列标准样品。

[0209] 根据本发明的该方面,以及在一个实施方案中,葡聚糖附着于基质,在一个实施方案中,基质是微量滴定板,或在另一个实施方案中,基质是珠子。在一个实施方案中,试剂包含可检测的标记,其使该检测得以半定量。

[0210] 在一些实施方案中,受试者已暴露于环境葡聚糖,并且诊断用于测定受试者对特定的基于葡聚糖的疫苗的应答性。根据该方面,该试剂盒应当包含与要被测定应答性的疫苗中的葡聚糖相应的或是其片段,或与之高度同源的葡聚糖。

[0211] 根据该方面,以及在一个实施方案中,当提及如本文所述的葡聚糖时,术语“同源性”指与相应的葡聚糖参照分子相比,结构同一性或根据候选分子中组成或含量的同一性的一定百分数。

[0212] 在一个实施方案中,术语“同源性”、“同源物”或“同源的”在任何情况下表示所提及的分子与参照分子显示至少 70%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 72%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 75%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 77%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 80%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 82%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 85%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与所示序列显示至少 87%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 90%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 92%一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 95%或更多的一致性。在另一个实施方案中,葡聚糖分子与参照分子显示至少 95%-100%一致性。

[0213] 关于与参照分子的一致性,这样的一致性可指结构同一性或根据化学内含物的组成同一性。在一些实施方案中,类似制备的葡聚糖用于本发明的试剂盒中,其与那些用于基于葡聚糖的佐剂或疫苗中的葡聚糖是可以相比的,然而在试剂盒中使用的葡聚糖可以不被进行所有的加工步骤,其包含用于基于葡聚糖的疫苗或佐剂的制备过程。

[0214] 在一个实施方案中,可通过本领域熟知的方法确定同源性,包括免疫印迹分析,或利用经已建立的方法可获得的多种软件包的任何一种,通过计算机算法分析。

[0215] 本发明还提供的是包含含有  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的组合物的试剂盒或该组合物的应用。在一些实施方案中,生物可降解的聚合物包含生物学活性的亚单位。在一些实施方案中,术语“生物可降解的”指在其被发现的细胞或受试者的生物环境中被降解即破裂成较小片段的物质。在一个实施方案中,生物降解包括通过例如酶促或非酶促水解、消化等,聚合物降解为其组成亚单位。在一个实施方案中,生物降解可包括聚合

物骨架中的键（共价键或非共价键）切割。在另一个实施方案中，生物降解可包括侧链内部的或连接侧链与聚合物骨架的键（共价或非共价）的切割。在一些实施方案中，降解产物是受试者可代谢的。在一些实施方案中，降解产物可被受试者用来合成较大的生物分子。在一些实施方案中，降解产物被受试者排泄或以其他方式消除。在一些实施方案中，聚合物和 / 或其降解产物是生物相容的，即当以与本发明相符合的量给予或以其他方式导入受试者体内时，它们是基本上无毒并且不会产生无法接受的炎性或免疫应答。

[0216] 在一些实施方案中，术语“生物活性剂”包括当以有效量给予动物（如哺乳动物，例如人）时提供治疗所需效果的治疗剂，应当理解不是所有的受试者都会受益于该治疗剂。在一些实施方案中，聚合物是聚酐，其任选地包含生物学活性的水杨酸盐类和  $\alpha$ -羟酸。聚合物的降解释放所述生物学活性的水杨酸盐类和 / 或  $\alpha$ -羟酸。在一些实施方案中， $\beta$ -1,6-葡聚糖共价或非共价附着于生物可降解的聚合物。合适的聚合物以及用于制造其的方法描述于例如美国公开号 20030035787 和 20050053577 中。在某些实施方案中，聚合物包含 10-1000 个，或 50-500 个，或约 100 个单体。在一个实施方案中，聚合物是 **polyaspirin®**。对于本领域普通技术人员而言，形成其中  $\beta$ -1,6-葡聚糖共价连接至聚合物的化合物的方法是显而易见的。 $\beta$ -1,6-葡聚糖在聚合前可共价附着于单体，或在聚合后可缀合于聚合物的官能团。在一些实施方案中， $\beta$ -1,6-葡聚糖通过连接基团共价附着。示例性连接基团描述于美国公开号 20050053577 中，其他连接基团对于本领域普通技术人员应是显而易见的。

[0217] 在一些实施方案中，所述试剂盒包含含有  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的颗粒以及所述方法利用了这些颗粒。在一些实施方案中，颗粒包被有或充满  $\beta$ -1,6-葡聚糖。在一些实施方案中， $\beta$ -1,6-葡聚糖共价附着于聚合物。在一些实施方案中，组合物包被植入物或如本文另外所述的其他医学或外科手术装置。

[0218] 进一步提供的是给予受试者  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物学活性的水杨酸盐或  $\alpha$ -羟酸的方法，该方法包括给予受试者包含  $\beta$ -1,6-葡聚糖和生物可降解的聚合物的组合物，所述聚合物包括所述生物学活性的水杨酸盐类和 / 或  $\alpha$ -羟酸，或将包含所述聚合物和所述生物学活性的水杨酸盐类和 / 或  $\alpha$ -羟酸的装置植入或导入受试者中。

[0219] 在一些实施方案中，本发明提供了包含低分子量葡聚糖的试剂盒和使用低分子量葡聚糖的方法，该低分子量葡聚糖具有小于 100kDa（如小于 80、70、60、50、40、30、25、20 或 15kDa）的分子量。在一些实施方案中，本发明提供了寡糖，如包含 85 个或更少的（如 85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4 个）葡萄糖单糖单元。

[0220] 在一些实施方案中，在本发明的试剂盒或方法中使用的  $\beta$ -1,6-葡聚糖包含低分子量葡聚糖或基本上由其组成。在使用  $\beta$ -1,6-葡聚糖的本发明任意方法的一些实施方案中， $\beta$ -1,6-葡聚糖包含低分子量葡聚糖或基本上由其组成。任选地，在本发明的任意实施方案中，至少某些低分子量  $\beta$ -1,6-葡聚糖富含 O-乙酰基。

[0221] 测定葡聚糖中的键合类型和结构的常用技术是碳-13 核磁共振波谱法 ( $^{13}\text{C}$ -NMR)。在给定的波谱中  $^{13}\text{C}$  信号的数目以及相对强度可用于测定葡聚糖聚合物中键合

构型和位置。例如,与相应的未连接的碳相比,参与糖苷键的碳原子的化学位移(信号)向低磁场处强烈移动(最多 9ppm)。

[0222] 在一些实施方案中,本发明提供了包含  $\beta$  1-6 葡聚糖的试剂盒以及包含  $\beta$  1-6 葡聚糖的组合物的应用,其中葡聚糖缀合于固相支持物。在一个实施方案中,固相支持物是珠子或颗粒。

[0223] 在一个实施方案中,葡聚糖缀合的珠子或颗粒或基质包含变性蛋白(如人血清白蛋白(Benacerraf 等,1957Brit. J. Exp. Path, 38 :35))、不溶性物质(如碳黑、硅石、二氧化硅、聚苯乙烯、胶乳)、金属氧化物(如氧化钛、铁氧化物)和印度墨汁(即胶态碳颗粒的悬浮液)(描述于 Reichard 和 Filkins,1984, The Reticuloendothelial System ;A Comprehensive Treatise,pp. 73-101(Plenum Press),及其中的参考文献)、水凝胶(例如,如美国专利公开号 20050191361 中所述)、琼脂糖凝胶(sepharose)或琼脂糖(agarose)珠子或微粒。在一些实施方案中,珠子或微粒成型自生物可降解的且无毒的材料(如聚( $\alpha$ -羟酸)例如聚(丙交酯-乙交酯)共聚物、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚酐、聚己酸内酯等)。本发明的珠子或颗粒可包含已清除它们细胞质的红细胞(RBCs),称为“血影”RBCs、细菌(如通过 RES 清除的细菌;参见如 Benacerraf 和 Miescher,1960, Ann NY Acad Sci, 88 :184-195)、细胞片段、脂质体、噬菌体、噬菌体片段以及无病毒核酸的病毒衣壳(如乙型肝炎病毒表面抗原颗粒)等。

[0224] 在一个实施方案中,缀合于固相支持物是通过将固相化学交联至本发明的葡聚糖进行的。交联化学是本领域熟知的。用于缀合葡聚糖和固相(如珠子或颗粒)的交联剂的性质可以是本领域已知的任何合适试剂。应当理解任何合适的交联剂都可使用,但要注意保持葡聚糖的活性。

[0225] 颗粒可以是噬菌体或细菌的片段。

[0226] 在某些实施方案中,颗粒的尺寸适合于被巨噬细胞、嗜中性白细胞或两者所摄取。颗粒可具有任何本文所述的组合物。在某些实施方案中,本发明提供了颗粒群,其中至少 50%的颗粒具有适合于被巨噬细胞、嗜中性白细胞或两者所摄取尺寸。本发明提供了颗粒群,其中至少 50%、75%或 90%的颗粒落入期望的尺寸范围内。在某些实施方案中,期望的尺寸范围在给定值的  $\pm 10\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 40\%$ 或  $\pm 50\%$ 中。该值可以是例如 20nm、100nm、500nm、1、5、10、20、50 微米等。在任意这些实施方案中,颗粒可具有任何本文描述的组合物。该群体可包含具有以任何比例存在的不同组合物的颗粒。颗粒群可用于任何本文描述的目的,用于这种应用的方法是本发明的一个方面。

[0227] 可使用的交联剂包括但不限于对-叠氨基苯甲酰基酰肼、N-(4-[对-叠氨基水杨酰氨基]-丁基)-3'-(2'-吡啶基二硫)-丙酰胺、双( $\beta$ -[4-叠氨基水杨酰氨基]-乙基)二硫化物、1,4-二马来酰亚氨基-2,3-二羟基丁烷、1,6-二马来酰亚氨基己烷、1,5-二氟-2,4-二硝基苯、二甲基己二亚酰胺-2HCl、二甲基辛二亚酰胺-2HCl、二甲基己二酰二亚酰胺-2HCl、二甲基庚二亚酰胺-2HCl、双琥珀酰亚氨基戊二酸酯、二琥珀酰亚氨基酒石酸盐、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸化物、(N-羟基琥珀酰亚氨基)-4-叠氨基水杨酸、磺基琥珀酰亚氨基-2-[7-叠氨基-4-甲基-香豆素-3-乙酰胺基甲基]-1,3-氨基丙酸酯、N-琥珀酰亚胺-4-碘代乙酰基氨基苯甲酸酯、N-琥珀酰亚氨基-3-[2-吡啶巯基]丙酸酯和琥珀酰亚氨基-6-[3-(2-吡啶巯基)-丙酰胺]己酸酯(Pierce Chemical Co.,

Rockford, Ill.)。在一个实施方案中,如 Nature Methods Vol 2No. 11, p. ,845,2005 中所述或类似方法衍生葡聚糖。在一个实施方案中,使用试剂例如 2,6-二氨基吡啶 (DAP),用提供游离的、反应性伯胺的部分衍生葡聚糖。席夫碱甲亚胺可例如通过氰基硼氢钠被还原成稳定的仲胺。在一个实施方案中,然后将衍生的葡聚糖与 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯例如 NHS-生物素反应。

[0228] 其他交联剂包含醛、亚胺、氰基、卤素、羧基、活化的羧基、酞和马来酰亚胺官能团。在一些实施方案中,交联剂可包含杂双功能交联剂例如 ABH、M2C2H、MPBH 和 PDPH(Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.)。参见例如 Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques, Academic Press, Inc., 对交联方法和试剂的进一步讨论。

[0229] 在另一个实施方案中,可通过使用包含官能团的珠子将葡聚糖缀合于珠子或颗粒,该官能团可根据如 Brumeanu 等 (Genetic Engineering News, Oct. 1, 1995, p. 16) 公开的方法被缀合。

[0230] 还有可能通过非共价方法将珠子/颗粒/固相支持物缀合至葡聚糖。获得非共价缀合的一种方便的方法包括利用针对葡聚糖的抗体,其共价或非共价地附着于颗粒、珠子等。在另一个实施方案中,使用生物素-抗生物素蛋白(其中“抗生物素蛋白”应当理解为任何形式的抗生物素蛋白)获得非共价缀合。例如,抗生物素蛋白-包被的或缀合的珠子可与用生物素部分衍生的葡聚糖接触。

[0231] 在一些实施方案中,缀合的葡聚糖的制备包括基本上不含有未缀合的反应物的最终缀合物的纯化。可基于缀合物任意成分的性质通过亲和力、凝胶过滤、疏水层析、切向超滤、透滤或离子交换层析实现纯化。例如,纯化可减少一种或更多种未缀合的反应物(如葡聚糖或固相支持物)的量至该未缀合的反应物原始存在的量的 10% 或更少、5% 或更少、或 1% 或更少的量。

[0232] 在一些实施方案中,本发明提供了包含  $\beta$  1-6 葡聚糖的颗粒,其中在一些实施方案中,该  $\beta$  1-6 葡聚糖富含 O-乙酰基。在一些实施方案中,该颗粒包含按重量计至少 50% 得  $\beta$  1-6 葡聚糖。在一些实施方案中, $\beta$  1-6 葡聚糖均匀分布于颗粒中。应当理解的是本发明包含  $\beta$  1-6 葡聚糖的颗粒可又包含如本文所述的任何适合于其的实施方案。

[0233] 在一个实施方案中,缀合的葡聚糖富含 O-乙酰基,以及在一个实施方案中,缀合的葡聚糖包含按重量计至少 25% 的 O-乙酰化葡聚糖,或如本文所述的任何相关实施方案。在一个实施方案中,葡聚糖缀合于微球,在一个实施方案中,其具有约 1-100 微米的直径。在一个实施方案中,微球具有约 10-50 微米的直径。在另一个实施方案中,微球具有约 5-40 微米的直径。在另一个实施方案中,直径在 0.1-5 微米。在另一个实施方案中直径在 0.5-1 微米。在另一个实施方案中,颗粒或珠子处于纳米范围内,如 100-500nm。

[0234] 在一个实施方案中,术语“珠子”或“颗粒”或“固相支持物”指球形材料。在另一个实施方案中,术语“珠子”或“颗粒”或“固相支持物”指非球形材料。在一个实施方案中,非球形珠子或颗粒在它们表面上任意两点之间具有任意前述范围内的最长的轴或最长的尺寸。在一个实施方案中,选择颗粒的尺寸(如直径)以促进吞噬细胞例如嗜中性白细胞、巨噬细胞或树突细胞对颗粒的吞噬作用。

[0235] 在一个实施方案中,术语“珠子”或“颗粒”或“固相支持物”指可为吞噬细胞所摄取、具有一定大小和组成、葡聚糖可附着的任何固体或凝胶的,或基于溶胶凝胶的物质。

[0236] 在一个实施方案中,本发明的试剂盒/组合物包含或本发明的方法使用了具有一定尺寸和表面密度的葡聚糖(如-1,6葡聚糖,任选地富含O-乙酰基)的珠子或颗粒,当与例如具有不同尺寸和/或表面密度的葡聚糖的颗粒相比时,该珠子或颗粒可被抗原呈递细胞有效地吞噬。

[0237] 在一个实施方案中,可用通过与包含反应性官能团的固相支持物起反应的直接键合实现缀合于固相支持物。

[0238] 可使用任何已知的方法进行通过连接基团的键合,例如在美国专利号 6,642,363; 4,882,317 或 4,695,624 中描述的方法。有用类型的键合是己二酸接头,其可通过将胺化的葡聚糖上游离的-NH<sub>2</sub>基与己二酸偶联(使用例如二酰亚胺活化),然后将蛋白与所产生糖类-己二酸中间体的偶联来形成。另一种类型的键合是羰基键,其可通过将修饰的葡聚糖的游离羟基与 CDI 起反应,继之以与蛋白起反应以形成氨基甲酸酯接头来形成。其他接头包括 B-丙酰氨基、硝基苯乙胺、卤酰基卤化物(haloacyl halides)、糖苷键、6-氨基己酸、ADH、C4-C12 部分等。

[0239] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含 $\beta$ 1-6葡聚糖的颗粒。在某些实施方案中,颗粒包含按干重计至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的 $\beta$ 1-6葡聚糖。在某些实施方案中,颗粒基本上由 $\beta$ 1-6葡聚糖组成。在某些实施方案中,除任何溶剂成分例如水之外,颗粒基本上由 $\beta$ 1-6葡聚糖组成。在某些实施方案中, $\beta$ 1-6葡聚糖富含O-乙酰基。在某些实施方案中,颗粒包含按干重计小、于50%、40%、30%、20%、10%或5%的1-3葡聚糖。本发明进一步提供了组合物,其包含任何上述颗粒,该颗粒包含或基本上由任选地富含O-乙酰基的 $\beta$ 1-6葡聚糖组成。该组合物可进一步包含药学上可接受的载体或佐剂。本发明进一步提供了调节哺乳动物受试者的免疫应答的方法,其包括给予受试者任何上述颗粒,或包含任何上述颗粒的组合物。可使用任何本领域已知方法制备颗粒。颗粒可被磨碎或过筛来获得所需尺寸。在某些实施方案中, $\beta$ 1-6葡聚糖均匀地或均质地分布于颗粒中。在某些实施方案中,“均匀地分布”意味着 $\beta$ 1-6葡聚糖不包囊在不同的材料中,并不仅仅包被由不同的材料组成的颗粒的表面,或不是共价或非共价地附着于由不同的材料组成的颗粒表面。而在某些实施方案中,将 $\beta$ 1-6葡聚糖任选地与另一种材料混合成型为颗粒,使得该 $\beta$ 1-6葡聚糖基本上遍布于颗粒的全部体积中。应当理解的是 $\beta$ 1-6葡聚糖的密度可以改变,但通常在颗粒中逐步且连续地而非突然地改变。

[0240] 在另一个实施方案中,本发明提供了缀合于固相支持物的 $\beta$ 1-6葡聚糖,其中该固相支持物是基质,该基质上或其中可用于进行测定法。例如,以及在某些实施方案中,本发明的试剂盒/方法使用了 $\beta$ 1-6葡聚糖已附着的微量滴定板,或96孔板,并在该孔/平板中进行测定法。这样的基质可包含任何合适的材料,例如对溶剂耐受、透明的材料使得可以对基质中样品实施分光光度测定法。

[0241] 在某些实施方案中,用于本发明方法中的 $\beta$ 1-6葡聚糖可进一步包含靶向部分。在某些实施方案中,该靶向部分针对特定细胞类型,或在某些实施方案中,针对患病细胞,例如受感染细胞、或赘生性细胞或前肿瘤细胞。在某些实施方案中,例如可通过葡聚糖与病毒共同受体的连接来实现靶向病毒感染的细胞。在某些实施方案中,靶向部分可包括整联蛋白或MHC II类分子,在受感染细胞例如专职抗原呈递细胞上可被上调。

[0242] 在一些实施方案中,靶向受感染细胞引起对受试者中感染的增强的治疗应答。例如,以及在一些实施方案中,靶向受感染细胞增强对病原体的吞噬作用和 / 或细胞毒性应答,或在一些实施方案中,增强补体 - 介导的病原体溶胞作用。在一些实施方案中,靶向受感染细胞增强对病原体的免疫应答。

[0243] 在一些实施方案中,靶向部分与如本文所述的并且包含其任何实施方案的赘生性或前肿瘤细胞特异性相互作用。在一些实施方案中,使用连接于靶向赘生性或前肿瘤细胞的靶向部分的  $\beta$  1-6 葡聚糖可促进宿主抗癌应答。在一些实施方案中,这样的靶向促进肿瘤细胞裂解,或在一些实施方案中,增强宿主抗肿瘤应答。

[0244] 在一些实施方案中,并且不受限制,使用葡聚糖、连接靶向部分的  $\beta$  1-6 葡聚糖和 / 或本发明的组合物使得多糖靶向癌细胞上特异性表达的抗原,并从而增强该细胞的补体 - 介导的溶胞作用。

[0245] 在一个实施方案中,本发明提供了刺激受试者免疫应答的方法,其包括给予受试者纯化的  $\beta$  -1-6- 葡聚糖以及试剂,所述试剂使抗体生产倾向于产生与免疫球蛋白 G(IgG) 4 相比,相对更多量的免疫球蛋白 G(IgG) 1、2 或 3。

[0246] 根据本发明的该方面,以及在一个实施方案中,同时给予受试者纯化的  $\beta$  -1-6- 葡聚糖和试剂,或在另一个实施方案中,顺序给予受试者纯化的  $\beta$  -1-6- 葡聚糖和试剂。在另一个实施方案中,给予受试者所述纯化的  $\beta$  -1-6- 葡聚糖和所述细胞因子各自至少两次。

[0247] 在一个实施方案中,试剂是细胞因子,其中在一个实施方案中,所述细胞因子是白介素 -2、白介素 -12 或干扰素 - $\gamma$  或它们的组合。在另一个实施方案中,试剂下调白介素 -4 或白介素 -10 产生或干扰白介素 -4 或白介素 -10 活性。

[0248] 在一个实施方案中,受试者进一步暴露于与免疫应答的靶标相关的抗原,其中在一个实施方案中,所述抗原是肿瘤相关抗原。根据本发明的该方面,以及在一个实施方案中,受试者具有增生性或瘤前病变;在另一个实施方案中,该方法对受试者的癌症进行治疗、延迟癌症的进展、延长癌症的缓解或降低癌症的发病率或严重程度。在另一个实施方案中,受试者患有癌症。在另一个实施方案中,受试者未被诊断有癌症。在另一个实施方案中,受试者未被诊断有肿瘤。

[0249] 在另一个实施方案中,抗原来源于病原体,其中在一个实施方案中,所述病原体是真菌。在一个实施方案中,该方法对受试者的感染进行治疗、延迟感染的进展、延长感染的潜伏状态或降低感染的发病率或严重程度。

[0250] 在一些实施方案中,该方法包括将 . 葡聚糖和任选的细胞因子靶向赘生性或前肿瘤细胞或组织、或肿瘤,其可通过靶向如本文所述的肿瘤抗原得以实现。在一些实施方案中,这样的细胞可表达肾上腺髓素受体 (ADMR)、降钙素受体 - 样受体 (CRLR)、CD117 或如本文所述的肿瘤相关抗原的任何组合。

[0251] 根据该方面,以及在一个实施方案中,通过用本发明的连接的葡聚糖靶向表达肾上腺髓素受体的细胞,可治疗肺癌、胰腺癌、卵巢癌和其他相关癌症。在一些实施方案中,通过用本发明的连接的葡聚糖靶向表达 CRLR 和 / 或 CD117 的细胞,可治疗血管瘤、神经胶质瘤和 / 或其他相关癌症。

[0252] 在一些实施方案中,本文提及的靶向部分应当理解为包含抗体,或如本文所述的

其片段,针对所提及受体的天然存在的肽配体,或其修饰的形式,例如截短产物。在一些实施方案中,本文提及的靶向部分应当理解为包含人工肽、小分子等。

[0253] 在一些实施方案中,本发明提供了将葡聚糖、连接靶向部分的  $\beta$  1-6 葡聚糖和 / 或本发明的组合物 (如本文所述的,包括它们的任何实施方案) 作为一种方式来确定赘生性或前肿瘤细胞或组织对治疗方案的应答性的应用。在一些实施方案中,这种方法包括从含有赘生性或前肿瘤细胞的受试者或活检材料中获得肿瘤样品,评估细胞对体外裂解的敏感性或耐受性和 / 或测定内源性补体控制蛋白的表达和 / 或分泌水平。

[0254] 在一些实施方案中,肿瘤细胞表达或过表达 (如相对于该细胞类型的正常细胞或该细胞所起源的组织) 内源性补体调控蛋白例如补体受体 1 (CR1 或 CD35)、衰变加速因子 (DAF 或 CD55)、膜辅因子蛋白 (MCP 或 CD46)、补体因子 H (fH) (或 FHL-1) 和 / 或 C4b- 结合蛋白 (C4BP)。

[0255] 在一些实施方案中,本发明提供了将葡聚糖、连接靶向部分的  $\beta$  1-6 葡聚糖和 / 或本发明的组合物 (如本文所述的,包括它们的任何实施方案) 作为一种方式来靶向病理性维管结构例如动脉粥样硬化患者的维管结构的应用,或在一些实施方案中,为了增强这种维管结构的消除,靶向病理性新生维管结构例如肿瘤相关新生维管结构。

[0256] 根据本发明的该方面以及在一些实施方案中,靶向部分尤其包含抗体或抗体片段或与这样的维管结构的成分特异性相互作用的配体,例如与 VEGF、组织因子、凝血因子、血管细胞黏着分子、整联蛋白、选择蛋白或任何其他在内皮细胞上表达或处于其表面的标记特异性相互作用的试剂。

[0257] 在一个实施方案中,靶向部分是肽、抗体、抗体片段、受体、蛋白 A、蛋白 G、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、金属离子螯合物、酶辅因子、核酸或配体。

[0258] 在一些实施方案中,这样的靶向部分可包含抗体或抗体片段。在一些实施方案中,这样的抗体或抗体片段会与如本文所述的期望靶标特异性相互作用,并且所述抗体或片段与葡聚糖的连接不会抑制这样的相互作用。

[0259] 在一些实施方案中,术语“抗体”指能与如本文所述的期望靶标特异性相互作用的完整的分子及其功能片段,例如 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv。在一些实施方案中,抗体片段包含:

[0260] (1) Fab, 包含抗体分子的单价抗原结合片段的片段,其可通过用木瓜蛋白酶消化完整的抗体以产生完整的轻链和一条重链的一部分而产生;

[0261] (2) Fab', 可通过用胃蛋白酶处理完整的抗体、接着还原以产生完整的轻链和一条重链的一部分来获得的抗体分子片段;每个抗体分子获得两条 Fab' 片段;

[0262] (3) (Fab')<sub>2</sub>, 可通过用胃蛋白酶处理完整的抗体无需之后的还原而获得的抗体片段;F(ab')<sub>2</sub> 是通过两个二硫键将两条 Fab' 片段保持在一起的二聚体;

[0263] (4) Fv, 包含表示为两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工程片段;和

[0264] (5) 单链抗体 ("SCA"), 包含轻链可变区和重链可变区的基因工程分子,其通过合适的多肽接头连接为基因融合的单链分子。

[0265] 制备这些片段的方法是本领域已知的。(参见例如 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 在此引入作为参考)。

[0266] 在一些实施方案中,可通过抗体的蛋白水解或编码片段的 DNA 在大肠杆菌

(*E. coli*) 或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其他蛋白表达系统)中的表达来制备抗体片段。

[0267] 在一些实施方案中,可用常规方法通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整的抗体来获得抗体片段。例如,可通过用胃蛋白酶的酶促切割抗体产生抗体片段来提供称为  $F(ab')_2$  的 5S 片段。该片段可进一步用巯基还原剂切割,并任选地使用针对二硫键切割所产生的巯基的封闭基团,以产生 3.5S  $Fab'$  单价片段。可选地,使用胃蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价  $Fab'$  片段和 Fc 片段。这些方法在例如 Goldenberg, 美国专利号 4,036,945 和 4,331,647, 以及其中包含的参考文献所描述,该专利在此全部引入作为参考。还参见 Porter, R. R., *Biochem. J.*, 73:119-126, 1959。还可使用其他切割抗体的方法例如分离重链以形成单价轻-重链片段,片段的进一步切割,或其它酶促、化学或基因技术,只要片段结合被完整的抗体识别的抗原即可。

[0268]  $Fv$  片段包含缔合的 VH 和 VL 链。该缔合可以是非共价的,如在 Inbar 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2659-62, 1972 中所描述的。可选地,可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学药品例如戊二醛交联。优选地,  $Fv$  片段包含通过肽接头连接的 VH 和 VL 链。通过构建包含寡核苷酸连接的编码 VH 和 VL 区的 DNA 序列的结构基因制备这些单链抗原结合蛋白(sFv)。将该结构基因插入表达载体中,随后导入宿主细胞例如大肠杆菌中。重组宿主细胞合成用接头肽桥连两个 V 区的单条多肽链。用于产生 sFvs 的方法描述于例如 Whitlow 和 Filpula, *Methods*, 2:97-105, 1991; Bird 等, *Science* 242:423-426, 1988; Pack 等, *Bio/Technology* 11:1271-77, 1993; 和 Ladner 等, 美国专利号 4,946,778, 其在此全部引入作为参考。

[0269] 另一种形式的抗体片段是编码单个互补决定区(CDR)的肽。可通过构建编码目标抗体的 CDR 的基因获得 CDR 肽(“最小识别单位”)。举例来说,通过使用聚合酶链反应从产生抗体的细胞的 RNA 来合成可变区,从而制备这样的基因。参见例如 Larrick 和 Fry, *Methods*, 2:106-10, 1991。

[0270] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体或片段可包含“人源化形式”的抗体。在一些实施方案中,术语“人源化形式的抗体”指非人(如鼠)抗体,其是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如  $Fv$ 、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、 $F(ab')$ 、 $sub. 2$  或抗体的其他抗原结合亚序列)的嵌合分子,包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠或兔的 CDR 的残基所取代的人免疫球蛋白(受体抗体)。在某些情况下,人免疫球蛋白的  $Fv$  构架残基被相应的非人残基所取代。人源化抗体还可包含既未在受体抗体中也未在输入 CDR 或构架序列中发现的残基。一般而言,人源化抗体应包含基本上全部的至少一个,以及通常两个可变区,其中全部或基本上全部的 CDR 区相应于非人免疫球蛋白的那些 CDR 区,以及全部或基本上全部的 FR 区是人免疫球蛋白共有序列的那些 FR 区。人源化抗体最佳地还应包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc) [Jones 等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann 等, *Nature*, 332:323-329 (1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)]。

[0271] 用于人源化非人抗体的方法是本领域熟知的。通常,人源化抗体具有一个或更多个来自非人来源并引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常被称作输入

残基,其通常取自输入可变区。人源化可基本上根据 Winter 及其同事的方法,通过用啮齿动物 CDRs 或 CDR 序列来取代人抗体相应的序列来进行 [Jones 等, *Nature*, 321 : 522-525 (1986) ; Riechmann 等, *Nature* 332 : 323-327 (1988) ; Verhoeyen 等, *Science*, 239 : 1534-1536 (1988)]。因此,这样的人源化抗体是嵌合抗体 (美国专利号 4, 816, 567), 其中基本上小于完整的人可变区的部分被来自非人物种的相应序列所取代。实际上,人源化抗体通常是这样的人抗体,其中某些 CDR 残基以及可能的某些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基所取代。

[0272] 还可使用多种本领域已知技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库 [Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227 : 381 (1991) ; Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222 : 581 (1991)]。Cole 等和 Boerner 等的技术也可用于制备人单克隆抗体 (Cole 等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) 和 Boerner 等, *J. Immunol.*, 147 (1) : 86-95 (1991))。类似地,可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如其中内源免疫球蛋白基因已经部分或完全失活的小鼠,来制备人抗体。一旦攻击 (challenge), 就观察到人抗体产生,其在所有方面包括基因重排、装配和抗体所有组成部分均很接近地类似于在人类中所见的。该方法描述于例如美国专利号 5, 545, 807、5, 545, 806、5, 569, 825、5, 625, 126、5, 633, 425、5, 661, 016 中,以及描述于下列科技出版物中: Marks 等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992) ; Lonberg 等, *Nature* 368 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994) ; Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996) ; Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 1365-93 (1995)。

[0273] 在一个实施方案中,靶向部分是特异性识别嗜中性白细胞的抗体或其片段,以及例如特异性识别 L- 选择蛋白、 $\beta$  2- 整联蛋白、补体受体 1 (CR-1)、衰变加速因子 (DAF)、C5a 受体、胞间黏附分子 -1 (ICAM-1)、ICAM-3 和本领域普通技术人员应当意识到的其他分子的抗体。

[0274] 在一些实施方案中,吞噬细胞被与 Fc 受体、趋化因子受体、CD40、CD80、CD86、MHC II 类分子、CD69、ADAM8、CD 14、CD163、CD33、CD63、CD68、CD74、CHIT1、CHST10、CSF 1R、DPP4、FABP4、FCGR1A、ICAM2、IL1R2、ITGA1、ITGA2、S100A8、TNFRSF8 和本领域普通技术人员应当意识到的相互作用的其他分子所靶向。

[0275] 在另一个实施方案中,靶向部分可以是任何合适的部分,例如适配子、天然存在的或人工配体,或工程化的结合蛋白可包含如本文所述的靶向部分,如本文所述的它们与葡聚糖的物理缔合可通过任何本领域已知手段容易地实现,包括例如下文中所描述的方法,或其变型,以适合所选择的靶向部分的特定性质。

[0276] 在一个实施方案中,靶向部分增强了向细胞的附着,或在另一个实施方案中,增强了向细胞的归巢 (homing)。在一个实施方案中,在提供能源后靶向部分增强了附着。在一个实施方案中,靶向部分通过化学交联基团被化学附着于葡聚糖,或在另一个实施方案中,与葡聚糖形成稳定的缔合,或在另一个实施方案中,与葡聚糖形成缔合,该缔合在环境条件例如盐浓度或 pH 改变后解离。

[0277] 在一个实施方案中,靶向部分可以是特异性识别目标分子例如蛋白或核酸的抗体。在另一个实施方案中,抗体可特异性识别附着于目标分子的报道分子。在另一个实施

方案中,靶向部分可以是抗体片段、蛋白 A、蛋白 G、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、金属离子螯合物、酶辅因子或核酸。在另一个实施方案中,靶向部分可以是结合目标关联配体的受体,或可与目标细胞或分子缔合,或在另一个实施方案中,靶向部分可以是配体,其用于通过其关联受体的相互作用附着至细胞。

[0278] 可通过任何本领域已知手段实现将靶向部分连接至本发明的葡聚糖,例如本文实施例 7 中所进一步描述的,或例如美国专利号 5,965,714,或美国专利公开号 20070141084,或 Schneerson 等,Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):8945-50, Lees 等, Vaccine. 1996Feb;14(3):190-8 中所描述,或通过使用如本文所述的交联剂,或本领域普通技术人员应当意识到的其他方法。

[0279] 在一些实施方案中,使用糖基化抗体,并将 B-1,6-葡聚糖连接于抗体的糖基化残基,或在另一个实施方案中,如本领域普通技术人员应当理解的,键合可以是多个的,且涉及在抗体或靶向部分上的多个位点。

[0280] 在一些实施方案中,连接葡聚糖至靶向部分引起增强的吞噬作用和/或靶细胞或生物体的杀伤作用。在一些实施方案中,这样的裂解可由任何专职抗原呈递细胞或杀伤细胞,例如,举例来说,嗜中性白细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞等介导。

[0281] 在一些实施方案中,任何 O-乙酰化葡聚糖可与靶向部分物理缔合,并包含本发明的葡聚糖或组合物,代表其的一个实施方案。使用这样的 O-乙酰化葡聚糖,例如已被 O-乙酰化的 -1,3-葡聚糖来调节免疫应答、治疗癌症或癌前病变、促进感染消退或任何本文所述的方法应被认为是本发明的一部分。

[0282] 在一些实施方案中,本发明的试剂盒中的以及本发明的方法使用的任何一种葡聚糖制品可连接于标记试剂,使得该葡聚糖的检测容易实现。在一个实施方案中,术语“标记试剂”指使得与标记试剂相接触的可容易检测的分子。在一个实施方案中,标记试剂是标记多肽。标记多肽可包含例如绿色荧光蛋白(GFP)、DS-Red(红色荧光蛋白)、分泌型碱性磷酸酶(SEAP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶或本领域普通技术人员已知的任何数量的其他报告蛋白。在另一个实施方案中,标记试剂可缀合于另一种提供针对要被标记的靶标更强特异性的分子。举例来说,以及在一个实施方案中,标记试剂是缀合于特异性结合给定的靶标分子的抗体的荧光染料,或在另一个实施方案中,其特异性结合另一种抗体,该另一种抗体结合靶标分子,例如为本领域普通技术人员所容易意识到的靶标分子。在一些实施方案中,如本领域普通技术人员所应当意识到的,连接抗体的葡聚糖将荧光染料参入抗体中。

[0283] 在一个实施方案中,本发明提供了  $\beta$ -葡聚糖和佐剂的组合使用,或包含  $\beta$ -葡聚糖和佐剂的组合物,或在使用基于  $\beta$ -葡聚糖的佐剂时,将第二佐剂与  $\beta$ -葡聚糖一起施用。在一些实施方案中,佐剂可包括但不限于:(A) 铝化合物(如氢氧化铝、磷酸铝、羟基磷酸铝、羟基氧化铝、正磷酸铝、硫酸铝等[如参见参考文献 96 的第 8 和 9 章]),或不同的铝化合物的混合物,这些化合物采用任何合适的形式(如凝胶、晶体、无定形物等),并且优选是吸附的;(B) MF59(5%角鲨烯、0.5%吐温 80 和 0.5%斯盘 85,使用微型流化床配制成亚微米颗粒);(C) 脂质体;(D) ISCOMs,其可不含有另外的去垢剂;(E) SAF,包含 10%角鲨烯、0.4%吐温 80、5%普流尼克-嵌段共聚物 L121 和 thr-MDP,微流化成亚微米乳剂或涡旋产生较大粒度的乳剂;(F) Rib<sup>i</sup>™ 佐剂体系(RAS), (Ribi Immunochem), 包含 2%角鲨烯、

0.2%吐温 80 和选自单磷酸脂质 A (MPL)、海藻糖二霉菌酸酯 (TDM) 和细胞壁骨架 (CWS) 的一种或更多种细菌细胞壁成分, 优选 MPL+CWS (Detox™); (G) 皂苷佐剂, 例如 QuilA 或 QS21, 也称为 Stimulon™; (H) 壳聚糖; (I) 完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA); (J) 细胞因子, 例如白介素 (如 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 等)、干扰素 (如干扰素- $\gamma$ )、巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子等; (K) 单磷酸脂质 A (MPL) 或 3-O-去乙酰 MPL (3dMPL)]; (L) 3dMPL 与例如 QS21 和 / 或水包油乳剂的组合; (M) 包含 CpG 基序的寡核苷酸, 即包含至少一个 CG 二核苷酸, 其具有 5-甲基胞嘧啶任选地置换胞嘧啶; (N) 聚氧乙烯醚或聚氧乙烯酯; (O) 聚氧乙烯山梨醇酯表面活性剂与辛苯昔醇组合或聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂与至少一种另外的非离子型表面活性剂例如辛苯昔醇组合; (P) 免疫刺激的寡核苷酸 (如 CpG 寡核苷酸) 和皂苷; (Q) 免疫刺激剂和金属盐颗粒; (R) 皂苷和水包油乳剂; (S) 皂苷 (如 QS21)+3dMPL+IL12 (任选地 + 甾醇); (T) 大肠杆菌不耐热肠毒素 (“LT”), 或其脱毒突变体, 例如 K63 或 R72 突变体; (U) 霍乱毒素 (“CT”), 或白喉毒素 (“DT”) 或两者之一的脱毒突变体; (V) 双链 RNA; (W) 单磷酸脂质 A 模拟物, 例如氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸盐衍生物, 如 RC-529; (X) 聚膦腈 (PCPP); 或 (Y) 生物粘附剂, 例如酯化的透明质酸微球或粘膜粘着剂, 例如聚 (丙烯酸)、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、多糖和羧甲基纤维素的交联衍生物。

[0284] 胞壁肽包括 N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷氨酰胺 (thr-MDP)、N-乙酰基-正胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺 (nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-棕榈酰基-sn-丙三基-3-羟基磷酸氧基) 乙胺 MTP-PE) 等。

[0285] 在另一个实施方案中, 本发明提供了组合使用  $\beta$ -葡聚糖、试剂和抗原, 所述试剂使抗体生产倾向于产生与免疫球蛋白 G (IgG) 4 相比, 相对更多量的免疫球蛋白 G (IgG) 1、2 或 3。

[0286] 在多个实施方案中, 抗原可以是任何被受试者免疫系统识别为外源的分子。例如, 抗原可以是任何外源分子, 例如蛋白 (包括修饰的蛋白例如糖蛋白、黏蛋白等)、核酸、碳水化合物、蛋白聚糖、脂质、黏蛋白分子或其他类似分子, 包括它们的任意组合。在另一个实施方案中, 抗原可以是细胞或其一部分, 例如细胞表面分子。在另一个实施方案中, 抗原可来源于传染性病毒、细菌、真菌、或其他生物体 (如原生生物)、或它们的一部分。在一个实施方案中, 这些传染性生物体可以是有活性的或无活性的, 在另一个实施方案中, 其可例如通过暴露于热或除去生物体复制所必需的至少一种蛋白或基因得以实现。在一个实施方案中, 抗原性蛋白或肽是分离出的, 或在另一个实施方案中, 是合成的。

[0287] 在一个实施方案中, 术语“抗原”指在暴露于或与之接触后, 刺激或增强免疫应答的物质, 例如蛋白、肽或任何片段。在一个实施方案中, 抗原被受试者免疫系统诠释为“危险”信号, 由于该信号而引发或增强免疫应答。在另一个实施方案中, 抗原代表了宿主区分“非自身”分子存在的能力。

[0288] 在一个实施方案中, 抗原来源于病原体、受感染细胞、赘生性细胞或前肿瘤细胞。在另一个实施方案中, 抗原是自身抗原, 或引发或增强自身免疫应答的分子。

[0289] 在一个实施方案中, 抗原来源于寄生物, 其在它的生活周期的至少某些阶段期间存在于细胞内。期望的细胞内寄生虫包括例如原生动物。感染细胞的原生动物包括: 疟

原虫属（如恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*P. Vivax*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 和三日疟原虫 (*P. malariae*)）、锥虫属、弓形虫属、利什曼原虫属、血吸虫属和隐孢子虫属的寄生虫。在另一个实施方案中，寄生物在它的生活周期的至少一部分期间存在于胞外。实例包括线虫、吸虫（肝蛭）和绦虫。在一些实施方案中，抗原来源于所述原生动物的副产物，例如血吸虫属的虫卵抗原、弓形虫属包囊专一性表达的抗原以及本领域普通技术人员应当意识到的其他副产物。

[0290] 在一个实施方案中，抗原来源于患病和 / 或异常细胞。期望的患病或异常细胞包括：受感染细胞、赘生性细胞、前肿瘤细胞、炎性病灶、良性肿瘤或息肉、咖啡牛乳色斑、粘膜白斑、其他皮肤痣、自身反应性细胞，包括 T 和 / 或 NK 细胞等。

[0291] 在一个实施方案中，抗原来源于传染性病毒，尤其包括：逆转录病毒科（如人免疫缺陷病毒，例如 HIV-1（也称为 HTLV-III、LAV 或 HTLV-III/LAV，或 HIV-III；和其他分离株，例如 HIV-LP）；细小 RNA 病毒科（如脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒；肠病毒、人柯萨奇病毒、鼻病毒、艾柯病毒）；杯状病毒科（如引起胃肠炎的毒株）；披膜病毒科（如马脑炎病毒、风疹病毒）；黄病毒科（如登革热病毒、脑炎病毒、黄热病毒）；冠状病毒科（如冠状病毒）；弹状病毒科（如水疱性口膜炎病毒、狂犬病病毒）；纤丝病毒科（如埃博拉病毒）；副粘液病毒科（如副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒）；正粘病毒科（如流感病毒）；布尼亚病毒科（如汉坦病毒、布尼亚病毒、白蛉病毒和内罗毕病毒）；沙粒病毒科（出血热病毒）；呼肠孤病毒科（如呼肠孤病毒、环状病毒和轮状病毒）；双 RNA 病毒科；嗜肝 DNA 病毒科（乙型肝炎病毒）；细小病毒科（细小病毒）；乳多空病毒科（乳头瘤病毒、多瘤病毒）；腺病毒科（大多数的腺病毒）；疱疹病毒科（单纯疱疹病毒 (HSV) 1 和 2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒 (CMV)、疱疹病毒）；痘病毒科（天花病毒、牛痘病毒、痘病毒）；和虹膜病毒科（如非洲猪瘟病毒）；以及未分类的病毒物（如海绵样脑病的病原物、丁型肝炎的病原物（被认为是乙型肝炎病毒的缺陷型卫星产物）、非甲非乙型肝炎的病原物（第 1 类 = 体内传染；第 2 类 = 胃肠外传染（即丙型肝炎）；诺瓦克及相关病毒和星状病毒）。

[0292] 在一个实施方案中，抗原来源于细菌，尤其包括：幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、伯氏疏螺旋体 (*Borellia burgdorferi*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、分枝杆菌属（如结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、鸟分枝杆菌 (*M. avium*)、细胞内分枝杆菌 (*M. intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、戈登分枝杆菌 (*M. goodii*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、奈瑟氏脑膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes* (A 组链球菌))、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae* (B 组链球菌))、链球菌属（绿色组）、粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*)、牛链球菌 (*Streptococcus bovis*)、链球菌属（厌氧组）、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、致病性弯曲杆菌属、肠球菌属、衣原体属、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、棒杆菌属、丹毒杆菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium perfringens*)、破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*)、产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*)、拟杆菌属、具核梭杆

菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*)、苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*)、细弱密螺旋体 (*Treponema pertenuae*)、钩端螺旋体属、衣氏放线菌 (*Actinomyces israeli*) 和土拉热弗朗西丝菌 (*Francisella tularensis*)。

[0293] 在一个实施方案中, 抗原来源于真菌, 尤其包括: 犁头霉属如伞枝犁头霉 (*Absidia corymbifera*), 阿耶罗菌属如荚膜阿耶罗菌 (*Ajellomyces capsulatus*)、皮炎组织胞浆菌 (*Ajellomyces dermatitidis*), 节皮菌属如苯黑末节皮菌 (*Arthroderma benhamiae*)、粉节皮菌 (*Arthroderma fulvum*)、石膏样节皮菌 (*Arthroderma gypseum*)、内弯节皮菌 (*Arthroderma incurvatum*)、太田节皮菌 (*Arthroderma otae*)、万博节皮菌 (*Arthroderma vanbreuseghemii*), 曲霉属如黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 芽生菌属如皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*), 念珠菌属如白色念珠菌 (*Candida albicans*)、光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、吉利蒙念珠菌 (*Candida guilliermondii*)、克鲁斯念珠菌 (*Candida krusei*)、近平滑念珠菌 (*Candida parapsilosis*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*)、菌膜假丝酵母 (*Candida pelliculosa*), 支孢瓶霉属 (*Cladophialophora*) 如 *Cladophialophora carrionii*, 球孢子菌属如粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*), 隐球菌属如新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*), 小克银霉属, 表皮癣菌属如絮状麦皮癣菌 (*Epidermophyton floccosum*), 外瓶霉属如皮炎外瓶霉 (*Exophiala dermatitidis*), 丝状黑粉菌属如新型线黑粉菌 (*Filobasidiella neoformans*), 产色芽生菌属如裴氏着色霉 (*Fonsecaea pedrosoi*), 镰刀菌属如茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*), 地霉属如白地霉 (*Geotrichum candidum*), 组织浆菌属如荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*), 何德霉属 (*Hortaea*) 如威尼克何德霉 (*Hortaea werneckii*), 伊萨酵母属如东方伊萨酵母 (*Issatschenkia orientalis*), 马杜拉分支菌属如灰马杜拉分支菌 (*Madurella grisea*), 马拉色氏霉菌属如糠秕马拉色氏霉菌 (*Malassezia furfur*)、球形马拉色菌 (*Malassezia globosa*)、*Malassezia obtuse*、厚皮病马拉色菌 (*Malassezia pachydermatis*)、限制马拉色菌 (*Malassezia restricta*)、*Malassezia slooffiae*、合轴马拉色菌 (*Malassezia sympodialis*), 小孢霉属如犬小孢霉 (*Microsporum canis*)、黄褐色小孢霉 (*Microsporum fulvum*)、石膏样小孢霉 (*Microsporum gypseum*), 毛霉属如卷枝毛霉菌 (*Mucor circinelloides*), 丛赤壳属如 *Nectria haematococca*, 拟青霉属如多变拟青霉 (*Paecilomyces variotii*), 副球孢子菌属如巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*), 青霉属如马尔尼菲青霉 (*Penicillium marneffeii*), 毕赤酵母属如异常毕赤酵母 (*Pichia anomala*)、季也蒙毕赤酵母 (*Pichia guilliermondii*), 肺囊虫属如卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*), 假霉样真菌属如波氏假霉样真菌 (*Pseudallescheria boydii*), 根霉属如米根霉 (*Rhizopus oryzae*), 红酵母属如深红类酵母菌 (*Rhodotorula rubra*), 丝孢菌属如尖端赛多孢子菌 (*Scedosporium apiospermum*), 裂褶菌属如裂褶菌 (*Schizophyllum commune*), 孢子丝菌属如申氏孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*), 毛癣菌属如须毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*)、红色毛癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、疣状毛癣菌 (*Trichophyton verrucosum*)、紫色毛癣菌 (*Trichophyton violaceum*), 毛孢子菌属如阿氏毛孢子菌 (*Trichosporon asahii*)、皮肤毛孢子菌 (*Trichosporon cutaneum*)、墨汁毛孢子菌 (*Trichosporon inkin*)、粘性毛孢子菌 (*Trichosporon mucoides*) 等。

[0294] 在一个实施方案中,病原真菌感染人宿主。在一个实施方案中,病原真菌感染非人动物。

[0295] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法容许组合使用相同来源的多种抗原,相同类别生物体的多种抗原,不同类别生物体的多种抗原,或它们的任意组合。

[0296] 在另一个实施方案中,本发明提供了对受试者的感染进行治疗、延迟感染的进展、延长感染的潜伏状态或降低感染的发病率或严重程度的方法,所述方法包括给予所述受试者包含纯化的  $\beta$  1-6 葡聚糖的组合物。在本发明的某些实施方案中,该感染是归因于病原真菌的感染。在本发明的某些实施方案中,该感染是归因于病原细菌、病毒或寄生虫的感染。在本发明的某些实施方案中,除本发明的组合物之外,受试者接受任何本领域已知对于治疗或预防受试者处于感染的风险中或受试者所遭受的感染有用的药剂。因此,在一个实施方案中,该方法包括给予受试者 (i) 包含  $\beta$  1-6 葡聚糖的本发明的组合物;和 (ii) 已知的抗真菌剂、抗细菌剂、抗病毒剂或抗寄生虫药。该组合物和抗真菌剂可在单一组合物中给予或分别给予。在一些实施方案中,这样的分别给予可间隔最多 24 或最多 48 小时,以及在一些实施方案中,间隔小于 1 小时。该组合物可适合于在人用、兽医或两者均适用。

[0297] 在一些实施方案中,使用本发明的  $\beta$  葡聚糖和任选的试剂可刺激、增强或促进了补体固定,其中所述试剂使抗体生产倾向于产生与免疫球蛋白 G(IgG)4 相比,相对更多量的免疫球蛋白 G(IgG)1、2 或 3。在一些实施方案中,该效应是抗体 - 介导的。

[0298] 根据该方面,以及在一些实施方案中,使用本发明的  $\beta$  葡聚糖以及任选的试剂可刺激、增强或促进了涉及补体固定的免疫应答,在受试者中产生治疗作用,其中所述试剂使抗体生产倾向于产生与免疫球蛋白 G(IgG)4 相比,相对更多量的免疫球蛋白 G(IgG)1、2 或 3。在一些实施方案中,这样的应用可涉及治疗受试者的败血症。在一些实施方案中,这样的应用可涉及治疗受试者的恰加斯氏病、肺病原体、或寄生虫或蠕虫。在一些实施方案中,这样的应用涉及治疗病毒感染,例如 HSV。

[0299] 在一些实施方案中,根据本发明该方面的方法可进一步包括给予可促进补体级联确立的试剂。根据本发明该方面,在一些实施方案中,该方法可进一步包括给予特异性识别受试者所感染的病原物的抗体。

[0300] 在另一个实施方案中,本发明刺激免疫应答的方法涉及刺激抗癌应答。在一个实施方案中,该方法进一步包括将受试者暴露于抗原,所述抗原是肿瘤相关抗原。在一个实施方案中,受试者具有增生性或瘤前病变。在另一个实施方案中,受试者患有癌症。

[0301] 在一个实施方案中,本发明的方法和组合物可治疗或预防与下列癌症抗原相关的癌症。KS 1/4 泛癌抗原 (Perez 和 Walker, 1990, J. Immunol. 142 :32-37 ;Bumal, 1988, Hybridoma 7(4) :407-415), 卵巢癌抗原 (CA125) (Yu 等, 1991, Cancer Res. 51(2) :48-475), 前列腺酸性磷酸盐 (Tailor 等, 1990, Nucl. Acids Res. 18(1) :4928), 前列腺特异性抗原 (Henttu 和 Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2) :903-910 ;Israeli 等, 1993, Cancer Res. 53 :227-230), 黑素瘤 - 相关抗原 p97 (Estin 等, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6) :445-44), 黑素瘤抗原 gp75 (Vijayasardahl 等, 1990, J. Exp. Med. 171(4) :1375-1380), 高分子量黑素瘤抗原 (HMW-MAA) (Natali 等, 1987, Cancer 59 :55-3 ;Mittelman 等, 1990, J. Clin. Invest. 86 :2136-2144), 前列腺特异性膜抗原, 癌胚抗原 (CEA) (Foon 等, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13 :294), 多态性上皮黏蛋白抗

原,人乳脂肪球抗原,结肠直肠癌相关抗原例如:CEA、TAG-72(Yokata等,1992,Cancer Res. 52:3402-3408)、CO 17-1A(Ragnhammar等,1993,Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9(Herlyn等,1982,J. Clin. Immunol. 2:135)、CTA-1和LEA,伯基特氏淋巴瘤抗原-38.13、CD19(Ghetie等,1994,Blood 83:1329-1336),人B-淋巴瘤抗原-CD20(Reff等,1994,Blood 83:435-445),CD33(Sgouros等,1993,J. Nucl. Med. 34:422-430),黑素瘤特异性抗原例如神经节苷脂GD2(Saleh等,1993,J. Immunol., 151, 3390-3398)、神经节苷脂GD3(Shitara等,1993,Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380)、神经节苷脂GM2(Livingston等,1994,J. Clin. Oncol. 12:1036-1044)、神经节苷脂GM3(Hoon等,1993,Cancer Res. 53:5244-5250),肿瘤特异性迁移型细胞表面抗原(TSTA)例如病毒诱导的肿瘤抗原包括DNA肿瘤病毒的T-抗原和RNA肿瘤病毒的包膜抗原,癌胚抗原-甲胎蛋白例如结肠的CEA、膀胱肿瘤癌胚抗原(Hellstrom等,1985,Cancer. Res. 45:2210-2188),分化抗原例如人肺癌抗原L6、L20(Hellstrom等,1986,Cancer Res. 46:3917-3923),纤维肉瘤抗原,人白血病T细胞抗原-Gp37(Bhattacharya-Chatterjee等,1988,J. of Immun. 141:1398-1403),拟糖蛋白,神经鞘脂类,乳腺癌抗原例如EGFR(表皮生长因子受体),HER2抗原(p185HER2),多态性上皮黏蛋白(PEM)(Hilkens等,1992,Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359),恶性人淋巴细胞抗原-AP0-1(Bernhard等,1989,Science 245:301-304),分化抗原(Feizi,1985,Nature 314:53-57)例如见于胎儿红细胞和原内胚层中的I抗原、见于胃腺癌中的I(Ma)、见于乳腺上皮中的M18和M39、见于骨髓细胞中的SSEA-1、见于结直肠癌中的VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5和D156-22、TRA-1-85(血型H)、见于结肠腺癌中的C14、见于肺腺癌中的F3、见于胃癌中的AH6、Y半抗原、见于胚胎性癌细胞中的Ley、TL5(血型A)、见于A431细胞中的EGF受体、见于胰腺癌中的E1系列(血型B)、见于胚胎性癌细胞、胃腺癌中的FC 10. 2、见于腺癌中的CO-514(血型Lea)、见于腺癌中的NS-10、CO-43(血型Leb)、G49、见于结肠腺癌中的EGF受体(血型ALeb/Ley)、见于结肠癌中的19. 9、胃癌黏蛋白、见于骨髓细胞的T5A7、见于黑素瘤中的R24、4. 2、GD3、D1. 1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2、见于胚胎性癌细胞中的M1:22:25:8和见于4-8细胞阶段胚胎中的SSEA-3、SSEA-4。在另一个实施方案中,抗原是来自皮肤T细胞淋巴瘤的T细胞受体衍生肽(参见Edelson,1998,The Cancer Journal 4:62)。

[0302] 在另一个实施方案中,抗原来源于HER2/neu或绒毛膜胚胎抗原(CEA),用于阻抑/抑制表达这些抗原的乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌和肺癌。类似地,黏蛋白型抗原例如MUC-1可用于抗多种癌症;MAGE、BAGE和Mart-1抗原可用于抗黑素瘤。在一个实施方案中,对于具体癌症患者可修改该方法,使得抗原性肽或蛋白的选择基于该患者癌细胞中所表达的抗原,在其他实施方案中,这可通过外科活检或血细胞采样然后进行免疫组织化学来预先确定。

[0303] 在另一个实施方案中,本发明提供了 $\beta$ -葡聚糖和试剂以及任选的另外的免疫调节化合物的组合使用,其中所述试剂使抗体生产倾向于产生与免疫球蛋白G(IgG)4相比,相对更多量的免疫球蛋白G(IgG)1、2或3。

[0304] 有用的试剂的实例包括细胞因子、趋化因子、补体成分、免疫系统辅助和粘着分子以及它们具有人或非人动物特异性的受体。有用的实例包括但不限于:GM-CSF、IL-2、IL-12、OX40、OX40L(gp34)、淋巴细胞趋化蛋白、CD40和CD40L。进一步有用的实例包括但

不限于：白介素例如白介素 1-15，干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$ ，肿瘤坏死因子，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)，巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF)，粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)，趋化因子例如嗜中性白细胞活化蛋白 (NAP)，巨噬细胞趋化及活化因子 (MCAF)，RANTES，巨噬细胞炎性肽 MIP-1a 和 MIP-1b，补体成分和它们的受体或辅助分子例如 B7. 1、B7. 2、TRAP、ICAM-1、2 或 3 和细胞因子受体。OX40 和 OX40- 配体 (gp34) 是进一步有用的免疫调控蛋白的实例。应当理解的是，根据本发明的方法，可使用能够刺激免疫应答产生倾向性以及参与该倾向性过程、或促进该倾向性应答的激活、在给定的免疫应答中与如本文所述的葡聚糖起协同作用的任何试剂，并且应被认为是本发明的一个实施方案。

[0305] 在一个实施方案中，根据本发明的应用还可包含给予另外的治疗剂，其可包含抗炎剂，例如倍他米松、强的松龙、吡罗昔康、阿司匹林、氟比洛芬和 (+)-N-[4-[3-(4-氟代苯氧基)苯氧基]-2-环戊烯-1-基]-N-羟基脲；抗病毒剂，例如阿昔洛韦、奈非那韦或病毒唑；抗生素例如氨苄西林和青霉素 G 或属于青霉素家族的抗生素、头孢菌素类、氨基糖苷类、大环内酯类、碳青霉烯和青霉烯、单环  $\beta$ -内酰胺类、 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂、四环素类、多肽类抗生素、氯霉素及衍生物、夫西地酸、林可霉素、新生霉素、壮观霉素、聚醚离子载体、喹诺酮类；抗感染剂，例如苯扎氯铵或洗必泰；氨苯砞、氯霉素、新霉素、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢拉定、红霉素、克林霉素、林可霉素、阿莫西林、氨苄西林、巴氨西林、羧苄西林、双氯西林、环己西林、picloxacillin、海他西林、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、青霉素包括青霉素 G 和青霉素 V、替卡西林、利福平和四环素；抗炎剂，例如二氟尼柳、布洛芬、吲哚美辛、甲氯胺苯酸盐、甲芬那酸、萘普生、羟布宗、保泰松、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、阿司匹林和水杨酸盐类；抗真菌剂，例如两性霉素 B、葡聚糖合成抑制剂例如卡泊芬净、米卡芬净，或阿尼芬净 (LY303366)、益康唑、特康唑、氟康唑、伏立康唑或灰黄霉素；抗原虫剂例如甲硝唑；咪唑型抗肿瘤剂例如妥布氯唑；驱肠虫药例如噻苯唑或奥芬唑；抗组胺剂，例如阿司咪唑、左卡巴斯汀、西替利嗪或肉桂苯哌嗪；减充血剂例如假麻黄碱；抗精神病药，例如氟司必林、五氟利多、利培酮或齐拉西酮；抗肿瘤剂，例如铂化合物（如螺铂、顺铂和卡铂）、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、阿霉素、丝裂霉素、安丝菌素、博来霉素、阿糖胞苷、阿糖腺苷、巯基聚赖氨酸、长春新碱、白消安、苯丁酸氮芥、美法仑（如 PAM、L-PAM 或苯丙氨酸氮芥）、巯基嘌呤、米托坦、盐酸丙卡巴肼更生霉素（放线菌素 D）、盐酸柔红霉素、盐酸多柔比星、紫杉醇和其他紫杉烷类、雷帕霉素、手霉素 A、TNP-470、普卡霉素（光辉霉素）、氨鲁米特、雌氮芥磷酸钠、氟他胺、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、柠檬酸他莫昔芬、睾内酯、曲洛司坦、安吖啶 (m-AMSA)、天冬酰胺酶 (L-天冬酰胺酶) 欧文氏菌属天冬酰胺酶、干扰素  $\alpha$ -2a、干扰素  $\alpha$ -2b、替尼泊忒 (VM-26)、硫酸长春碱 (VLB)、硫酸长春新碱、硫酸博来霉素、羟基脲、丙卡巴肼和达卡巴嗪；有丝分裂抑制剂例如依托泊忒、秋水仙碱和长春花生物碱类，放射性药物，例如放射性碘和磷产品，或它们的任意组合。

[0306] 在一些实施方案中，本发明的方法用于治疗性或预防性处理处于升高的感染风险中的动物或人，该风险归因于即将来临的外科手术、创伤、疾病、放射或化学治疗，或其它对免疫系统产生有害影响的情况。在一些实施方案中，本发明的方法用于治疗具有这样的疾病或病症的患者，该疾病或病症导致正常的免疫应答降低或抑制，例如 HIV 感染 (AIDS)，或用于治疗接受免疫抑制治疗的患者（如作为移植候选人或已接受移植物的个体，患自身免疫病的个体等）。在一些实施方案中，本发明的方法用于预防引发经历化学疗法或放射疗法的

患者的免疫应答,或用于预引发处在升高的发展成继发感染或手术后并发症风险中的患者的免疫应答,该风险归因于引起调动机体对感染的正常应答能力降低的疾病、病症或治疗。

[0307] 在一个实施方案中,刺激所述免疫应答包含刺激抗原特异性应答。

[0308] 在一些实施方案中,如本文所述的葡聚糖的应用,以及如本文所述的方法可发挥增强受试者中补体-介导的溶胞作用的功能。在一些实施方案中,这样的增强作用可涉及吞噬细胞应答,例如,增强嗜中性白细胞或巨噬细胞、或其他专职抗原呈递细胞的吞噬作用和细胞毒性应答。在一些实施方案中,这样的增强作用可不依赖于吞噬细胞的参与,例如通过增强攻膜复合体的形成和/或活性。

[0309] 应当理解的是,本发明的方法通过刺激免疫应答从而预防疾病和/或改善疾病和/或改变疾病进展,应被认为是本发明的一部分。

[0310] 在一些实施方案中,术语“接触”或“给予”指直接和间接暴露于所示物质。

[0311] 在一些实施方案中,本发明的方法利用了未灭菌的或无菌载体或多种载体来将期望的试剂给予细胞、组织或生物体,例如适合于个体给予的药理学载体。这样的载体可包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油以及它们的组合。制剂应当适合给予方式。

[0312] 试剂可以任何有效的、便利的方式给予,包括例如通过血管内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、鼻内(i.n.)、皮下(s.c.)、经口、直肠、阴道内递送来给予,或通过葡聚糖/组合物可被递送至组织的任何方式(如针或导管)给予。可选地,局部给药可期望用于插入上皮细胞中。另一种给予方法是通过吸入或气溶胶制剂。在一些实施方案中,该方法包括通过将包含葡聚糖如作为涂层成分的植入物或其他医学或外科手术装置植入或导入受试者体内,给予所述的试剂/葡聚糖。

[0313] 在一个实施方案中,本发明提供了包含 $\beta$ 1-6葡聚糖和/或其他本文描述的试剂的食品补充剂。

[0314] 在一些实施方案中,食品或食物产品是可被生物体代谢以产生能量并构建组织的基本上无毒的任何物质。在一些实施方案中,食品或食物产品指旨在被哺乳动物如人所摄取的具有营养价值的产品。在一些实施方案中,食品或食物产品指被美国食品和药物管理局(FDA)所规定的作为食品或食物产品的产品。在一些实施方案中,食品或食物产品是包装在容器中的产品,带有说明该产品是食品或食物产品的标签。在一些实施方案中,食品或食物产品是包装在容器中的产品,带有提供关于该产品的营养信息例如卡路里、脂肪或蛋白质含量,或一种或更多种维生素或矿物质含量的标签。在一些实施方案中,食品补充剂(也称为“饮食补充剂”)是添加到食品或食物产品中的任何物质。在一些实施方案中,除本发明的葡聚糖之外,食品补充剂包含一种或更多种必需营养素,例如维生素、矿物质和蛋白。在一些实施方案中,食品补充剂是旨在摄食作为饮食补充剂的任何产品,除了本发明的葡聚糖之外还可包含一种或更多种维生素、矿物质、草本、植物和其他植物来源的物质;氨基酸;以及这些物质的浓缩物、代谢物、组分和提取物。在一些实施方案中,食品、食物产品、食品补充剂,或化妆用组合物并不旨在诊断、治愈、减轻、治疗或预防疾病。在一些实施方案中,食品补充剂提供在如根据现行美国法律和/或FDA指南,标记有说明内含物是食品或饮食补充剂的容器或其他包装材料中。在一些实施方案中,食品补充剂或产品包含约0.01-30w/w%的葡聚糖,并且可另外包含维生素、寡糖、膳食成分、蛋白或它们的组合。

[0315] 在一些实施方案中,成分的比例不固定,或在其他实施方案中,这样的比例可为每

100w/w%约 0.01-30w/w%的范围。其中包含本发明前述葡聚糖的食品实例是多种食物、饮料、口香糖、维生素复合物、健康改善食品等。

[0316] 组合物可另外包含一种或多于一种的有机酸,例如柠檬酸、富马酸、己二酸、乳酸、苹果酸;磷酸盐,例如磷酸盐、磷酸钠、硫酸钾、酸式焦磷酸盐、多磷酸盐;天然抗氧化剂,例如多酚、儿茶素、 $\alpha$ -生育酚、迷迭香提取物、维生素 C、甘草提取物、壳聚糖、丹宁酸、植酸等。

[0317] 在一些实施方案中,作为本发明的方法的一部分给予的试剂/葡聚糖被配制为局部用软膏、洗剂、凝胶或乳膏,其包含例如以 0.0001-50% w/w,如 0.075-20% w/w 的量存在的活性成分(包括在 0.1%-20%范围内以 0.1% w/w 增加,例如 0.6% w/w、0.7% w/w 等的活性成分,通常为 0.2-15% w/w 以及最通常为 0.5-10% w/w)。在一些实施方案中,当配制为软膏时,活性成分可与石蜡或水溶性软膏基质一起使用。在一些实施方案中,活性成分可配制为具有水包油乳膏基质的乳膏。

[0318] 在一些实施方案中,乳膏基质的水相可包括例如至少 30% w/w 的多元醇,即具有两个或更多个羟基的醇,例如丙二醇、1,3-丁二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、甘油和聚乙二醇(包括 PEG 400)以及它们的混合物。在一些实施方案中,局部用制剂可包括可增强活性成分透皮或穿透其他的作用区域的吸收或渗透的化合物。这样的皮肤穿透增强剂的实例包括二甲亚砷和相关类似物。

[0319] 在一些实施方案中,作为本发明的方法的一部分给予的试剂/葡聚糖被配制用作滴眼剂,其中活性成分(或多种活性成分)溶解或悬浮于合适的赋形剂(或多种赋形剂)中,例如活性成分水溶剂,其在接近中性的 pH 值如约 pH 6-8 下包含一种或更多种电荷。在一些实施方案中,活性成分(或多种活性成分)以约 0.5-20% w/w、一般约 1-10% w/w、通常约 2-5% w/w 的浓度存在于这样的制剂中。

[0320] 在一些实施方案中,作为本发明方法的一部分给予的试剂/葡聚糖被配制为用于口腔内的局部给予,并可包括在调味基质中含有活性成分的糖锭,其可包含蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶;包含在惰性基料例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶等中含有活性成分的锭剂;或包含在合适的液体赋形剂中含有活性成分的漱口水,或本领域普通技术人员应当意识到的其他形式。

[0321] 用于直肠给药的制剂可以具有包含例如可可油或水杨酸盐的合适基质的栓剂存在。

[0322] 适合于肺内或鼻粘膜给予的制剂具有例如 0.01-500 微米(包括在 0.01-500 微米范围内以 0.1 微米或其他值增加的平均粒度,如以 0.05、0.1、0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6、7、8、9、10、20、25、30、35、50、75、100 等微米增加)的颗粒尺寸,其通过经鼻快速吸入或通过口吸入给予以使其到达肺泡囊。合适的微粒化制剂包括活性成分(或多种活性成分)的水或油溶液或悬浮液。适合于气溶胶、干粉或片剂给药的制剂可根据常规方法制备并可与其他治疗剂如迄今用于治疗或预防如本文所述的病毒或其他感染的化合物一起递送。这样的制剂可例如经口、胃肠外(i.v.、i.m.、s.c.)、局部或通过含服途径给予。

[0323] 适合于阴道给予的制剂可以阴道栓剂、棉球、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂存在,除活性成分之外还应意识到包含本领域已知的这样的赋形剂。

[0324] 适合于胃肠外给药的制剂包括含水的以及非水的灭菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得该制剂与预期受体的血液等渗的溶质;以及含水的和非水的无菌悬浮液,其可包括悬浮剂和增稠剂。

[0325] 制剂存在于单位剂量或多剂量容器例如密封安瓿和管形瓶中,并可贮藏在冷冻干燥的(冻干的)条件中,仅在立即使用前需要添加无菌液体赋形剂例如注射用水。临时配制的注射溶液和悬浮液制备自之前所描述的无菌粉剂、粒剂和片剂类型。单位剂量制剂是包含活性成分的日剂量或如本文所述的单位日亚剂量,或它们的合适部分分的单位剂量制剂。

[0326] 应当理解除了上述特别提及的成分之外,本发明的制剂还可包括本领域关于所述制剂类型常规的其它试剂或赋形剂,例如适合于口服给予的制剂可包括芳香剂。

[0327] 对本领域普通技术人员显而易见的是,可对本发明的组合物、应用和制品进行各种修饰及改变而不偏离本发明的精神或范围。

[0328] 为了给予哺乳动物,特别是人,期望的是在药物治疗的情况下,医师或其它有资格的卫生保健提供者可确定治疗的实际剂量和持续时间,其应当最适于个体并可依具体个体的年龄、体重和应答而改变。应当理解的是,在非处方(如“OTC”)用药、食品、食物产品、食品补充剂、化妆用和个人护理组合物的情况下,用量可由使用者自行确定,任选地依据标签或合适的卫生保健提供者或其他顾问所指导。

## 实施例

[0329] 材料和方法

[0330] 制备 IgG- 耗尽的血清

[0331] 用 PBS 洗涤蛋白 G- 琼脂糖凝胶珠子或未处理的琼脂糖凝胶珠子(对照)三次。将血清在 PBS 中稀释 2 倍并添加到珠子中。在对接(end-to-end)混合器上,在室温下温育珠子 30 分钟。通过离心除去珠子。

[0332] 汇集来自 10 位未免疫的正常健康供体的血清。

[0333] SRBC 测定

[0334] 用明胶佛罗那缓冲溶液(Sigma)洗涤 SRBC(Accurate chemical and scientific corp.)并用兔抗-SRBC 抗体(Accurate chemical and scientific corp.)在室温下调理 30 分钟。将 IgG- 耗尽的血清(来自蛋白 G- 琼脂糖凝胶珠子)或含 IgG 的血清(来自未处理的琼脂糖凝胶珠子)添加到 SRBC 中并在 37C 下温育 1 小时。添加水作为阳性对照(完全裂解),以及添加缓冲液作为阴性对照(无裂解)。通过直接显微镜肉眼观察(图 1C a)或通过 0. D. 414nm(其检测分泌自裂解的 SRBC 的血红素)来检测裂解。

[0335] 制备  $\beta$ -1,6- 葡聚糖- 包被的珠子和 FACS 分析(吞噬作用和 ROS 产生)

[0336] 如 Rubin-Bejerano, I. 等, Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. Cell Host Microbe, 2007. 2(1) :p. 55-67 中所述来进行这些方法。

[0337] 细胞培养

[0338] 在补充有 10% FBS 的 McCoy' s 5A 培养基(Gibco)中培养 SK-BR-3 细胞(ATCC)。

[0339] 缀合

[0340] 在用偏高碘酸钠 (Pierce) 氧化后,将 Herceptin (Genentech, Inc.) 或 IgG 1 同种型对照 (Sigma) 缀合于  $\beta$ -1,6- 葡聚糖。

[0341] 嗜中性白细胞

[0342] 新鲜的人血和血清由 Research Blood Components (Brighton, MA) 提供。通过使用 Histopaque 1077 和 Histopaque 1119 (Sigma), 根据 MIT 人类实验对象使用委员会 (MIT Committee on Use of Humans as Experimental Subjects) 核准的实验方案, 从新鲜的人血中分离出嗜中性白细胞。

[0343] 调理作用

[0344] 在 37°C 下, 将乳腺癌细胞在不含氯化钙和不含氯化镁的磷酸盐缓冲液 (PBS) (Gibco) 中的 40% 血清中调理 15 分钟。然后用补充有 0.04mg/ml 的蛋白酶抑制剂 AEBSF (Sigma) 的冷 PBS 洗涤细胞 3 次。

[0345] 抗体结合和 C3 沉积

[0346] 荧光活化细胞分选 (FACS) 分析用于检测结合乳腺癌细胞的 Herceptin (通过使用抗-人 IgG1 抗体, Sigma) 以及 C3 沉积 (通过使用抗-人 C3 抗体, Accurate Chem.)。

[0347] 细胞毒性

[0348] 通过 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定法 (Promega) 检测在与  $\beta$ -1,6- 葡聚糖-缀合的或未缀合的 Herceptin 和血清温育后对乳腺癌细胞的细胞毒性, 其检测裂解的细胞所释放的乳酸脱氢酶。对于嗜中性白细胞依赖的杀伤作用, 在测定细胞毒性后, 将上述细胞与嗜中性白细胞在 37°C 下培养。

[0349] 实施例 1

[0350]  $\beta$ -1,6- 葡聚糖刺激的补体激活依赖于抗体

[0351] 为了测试抗体是否涉及  $\beta$ -1,6- 葡聚糖引起的补体激活, 通过使用蛋白 G 琼脂糖凝胶珠子对在补体激活测定中使用的血清进行抗体耗竭。这种 IgG- 耗竭的血清用于调理  $\beta$ -1,6- 葡聚糖- 包被的珠子。然后, 在利用人嗜中性白细胞实施的吞噬作用测定中检测该珠子。当用 IgG- 耗竭的血清调理  $\beta$ -1,6- 葡聚糖- 包被的珠子时, 吞噬作用和 ROS 产生减少 (图 1A 和 B), 这表明经典途径在  $\beta$ -1,6- 葡聚糖引起的补体激活中发挥主要作用。

[0352] IgG- 耗竭的血清包含功能性补体因子。在绵羊红细胞 (SRBC) 测定中, 当使用 IgG- 耗竭的血清时, 用抗-SRBC 抗体调理的 SRBC 发生裂解 (图 1C)。

[0353] 实施例 2

[0354] 在正常成人中针对  $\beta$ -1,6- 葡聚糖的抗体普遍存在

[0355] 从 10 位人类供体汇集的血清具有高水平的结合  $\beta$ -1,6- 葡聚糖的 IgG 抗体, 其与低水平的结合-1,3- 葡聚糖的 IgG 形成对比。为了测试在不同的供体中抗- $\beta$ -1,6- 葡聚糖抗体普遍存在的程度, 我们收集了 12 位个体的血清。这些血清用于调理  $\beta$ -1,6- 葡聚糖- 或-1,3- 葡聚糖- 包被的珠子, 并将珠子与人嗜中性白细胞温育。12 份血清中的 11 份具有汇集血清所具有的高应答, 其介导有效的吞入作用和 ROS 产生 (图 2Aa, 高应答者的代表性血清)。一份血清以较低的有效性介导吞入作用和 ROS 产生 (图 2Ab, 低应答者)。

[0356] 实施例 3

[0357]  $\beta$ -1,6- 葡聚糖通过嗜中性白细胞介导有效的吞噬作用及活性氧类别的产生

[0358] 为了评估哪种 IgG 同种型介导  $\beta$ -1,6- 葡聚糖识别, 在暴露于调理的  $\beta$ -1,6- 葡

聚糖-包被的珠子后,特异性针对 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的抗体用于测定具有对  $\beta$ -1,6-葡聚糖高或低应答的供体血清中 IgG 同种型的使用。与低应答者相比,高应答者产生更多的 IgG1、IgG2 和 IgG3,而非 IgG4(图 3)。特别是,在高应答者中 IgG2 水平显著更高,可能是因为多糖倾向于诱导 IgG2 同种型的产生。

[0359] 不同的同种型在它们的补体激活性质上有所差别。IgG3 具有最高的补体激活性质,之后是 IgG1, IgG2 次之,而 IgG4 无法激活补体。IgG2 是经典途径的弱激活剂,但它能通过替代途径来激活补体,并且是经嗜中性白细胞吞噬作用的良好底物。

[0360] 实施例 4

[0361] 缀合于 Herceptin 单克隆抗体的  $\beta$ -1,6-葡聚糖介导针对乳腺癌细胞的补体和嗜中性白细胞的募集

[0362] 为了评估连接靶向部分的缀合的  $\beta$ -1,6-葡聚糖是否能介导补体和嗜中性白细胞募集来裂解并杀死为该靶向部分所结合的靶细胞,在乳腺癌细胞 (SK-BR-3) 体系中测试连接 Herceptin 单克隆抗体 (mAb) 的 1,6-葡聚糖。Herceptin mAb 针对在 SK-BR-3 细胞上过表达的 Her-2/neu 蛋白。 $\beta$ -1,6-葡聚糖与 Herceptin 的缀合并不影响其与乳腺癌细胞的结合(图 4Aa)。此外,该缀合物介导高 C3 沉积(图 4Ab),表明  $\beta$ -1,6-葡聚糖保持功能。缀合于  $\beta$ -1,6-葡聚糖的非特异性同种型对照抗体无法结合乳腺癌细胞(图 4Ba),并因此不能介导补体激活和这些细胞上的 C3 沉积(图 4Bb)。将  $\beta$ -1,6-葡聚糖与未化学缀合的 mAb 混合不能介导这些乳腺癌细胞上的 C3 沉积(图 4C,比较绿色和蓝色)。因此,结论是  $\beta$ -1,6-葡聚糖与靶向部分的缀合是将补体以及由此的嗜中性白细胞引导至靶向细胞所需的。在用缀合于  $\beta$ -1,6-葡聚糖而非  $\beta$ -1,3-葡聚糖的 Herceptin 处理的乳腺癌细胞上检测到 C3 沉积(图 4D,比较蓝色和绿色),表明  $\beta$ -1,6-葡聚糖的确比  $\beta$ -1,3-葡聚糖在吸引补体上更有效。

[0363] 实施例 4

[0364] 缀合于 Herceptin 单克隆抗体的  $\beta$ -1,6-葡聚糖介导经补体和嗜中性白细胞引起的乳腺癌细胞杀伤作用

[0365] 在乳腺癌细胞上补体蛋白 C3 的沉积导致这些癌细胞裂解。Herceptin- $\beta$ -1,6-葡聚糖缀合物对乳腺癌细胞显示剂量依赖的细胞毒效应,而未缀合的 Herceptin 则缺乏任何效应(图 5A)。此外,Herceptin- $\beta$ -1,6-葡聚糖缀合物显示嗜中性白细胞对癌细胞增加的杀伤作用(图 5B)。

[0366] VIII. 等同和范围

[0367] 本领域普通技术人员应当理解可在其中进行形式和细节上的各种改变,而不背离如所附权利要求所示的本发明的精神和范围。仅使用常规试验,本领域普通技术人员就应当认识到或能确定许多本文所述的本发明的具体实施方案的等同方案。这样的等同方案意图是被包含在权利要求的范围内。

[0368] 在权利要求书各项中,除非有相反说明或上下文另有明确指出,例如“一”(“a”、“an”)和“其”(“the”)意味着一个或更多个。除非有相反说明或上下文另有明确指出,如果一个、多于一个或所有的组成员存在于给定产品或方法中、被用于给定产品或方法或与给定产品或方法相关,则在组成员之间包括“或”或“和/或”的权利要求或说明书被认为是满足要求的。本发明包括了其中恰好一个组成员存在于给定产品或方法中、被用于给

定产品或方法与给定产品或方法相关的实施方案。本发明还包括了其中多于一个的组成或所有的组成存在于给定产品或方法中、被用于给定产品或方法与给定产品或方法相关的实施方案。此外,除非另有说明或除非本领域普通技术人员明显地认识到会有矛盾或不一致出现,应当理解本发明在多个实施方案中提供了所有改变、组合以及排列,其中来自于一项或更项所列权利要求的一个或更多个限制、要素、分句、描述性术语等被引入另一项从属于相同的基础权利要求的权利要求中。当要素以列表如以马库什组形式等存在时,应当理解该要素的每个亚组均被公开,并且可从该组中除去任何要素(或多个要素)。应当理解通常在本发明或本发明的方面中被称为包含特定要素、特征等时,本发明的某些实施方案或本发明的方面由这样的要素、特征等组成、或基本上由这样的要素、特征等组成。为了简要起见,那些实施方案没有在每一种情况下都明确地用这些语言在本文中陈述。为方便起见,某些权利要求以从属形式存在,但申请人保留将任何从属权利要求改写为独立权利要求形式以包括该权利要求所从属的独立权利要求以及任何其他权利要求的要素或限制的权利,并且这样改写的权利要求应当被认为在各个方面均等同于该从属权利要求,而与其在改写为独立权利要求形式之前所存在的形式无关(修改或未修改的)。

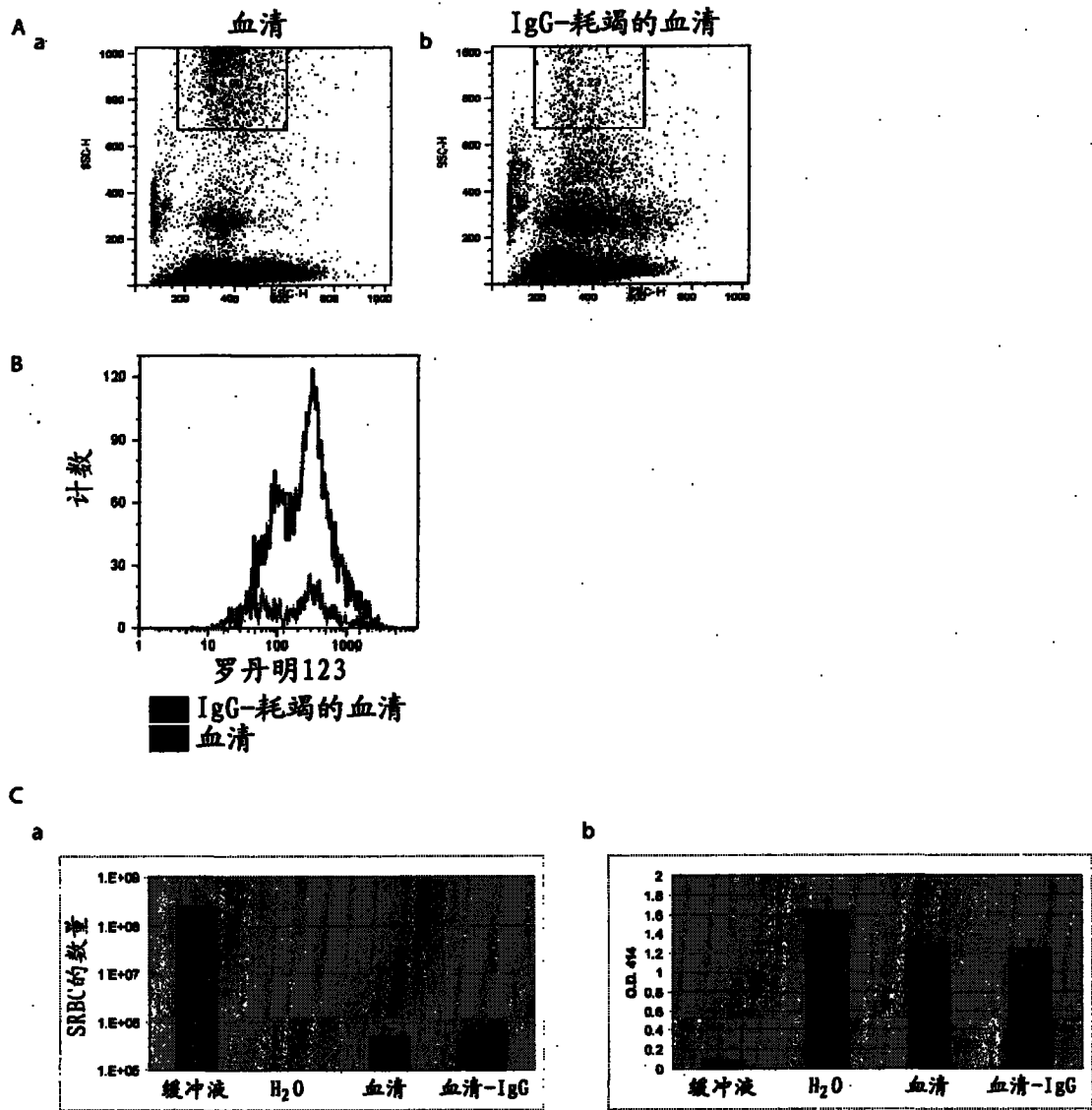


图 1

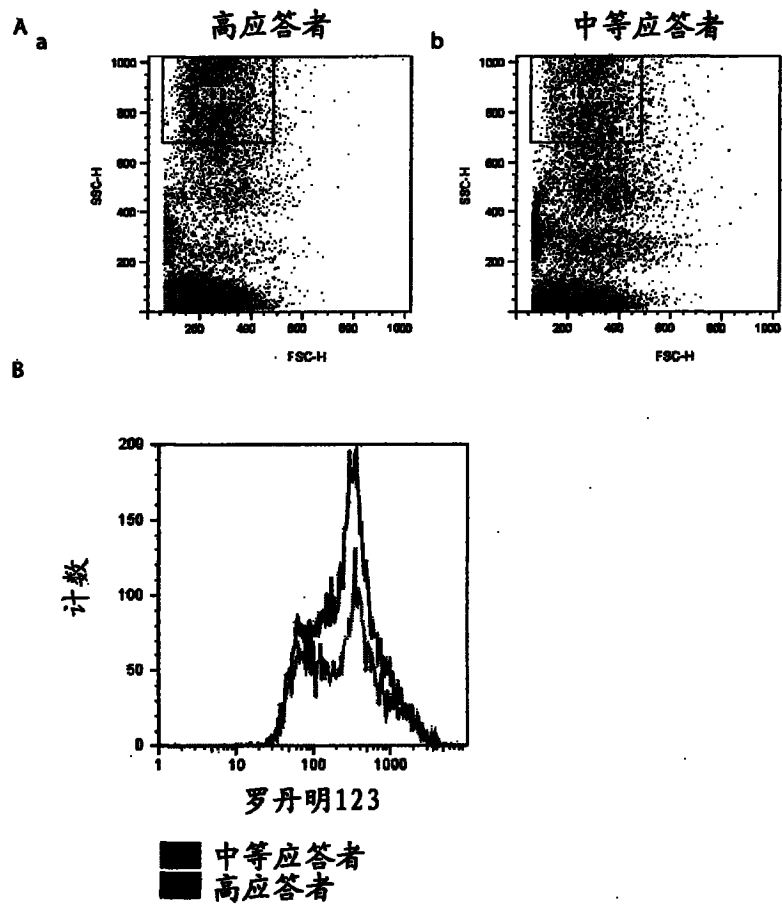


图 2

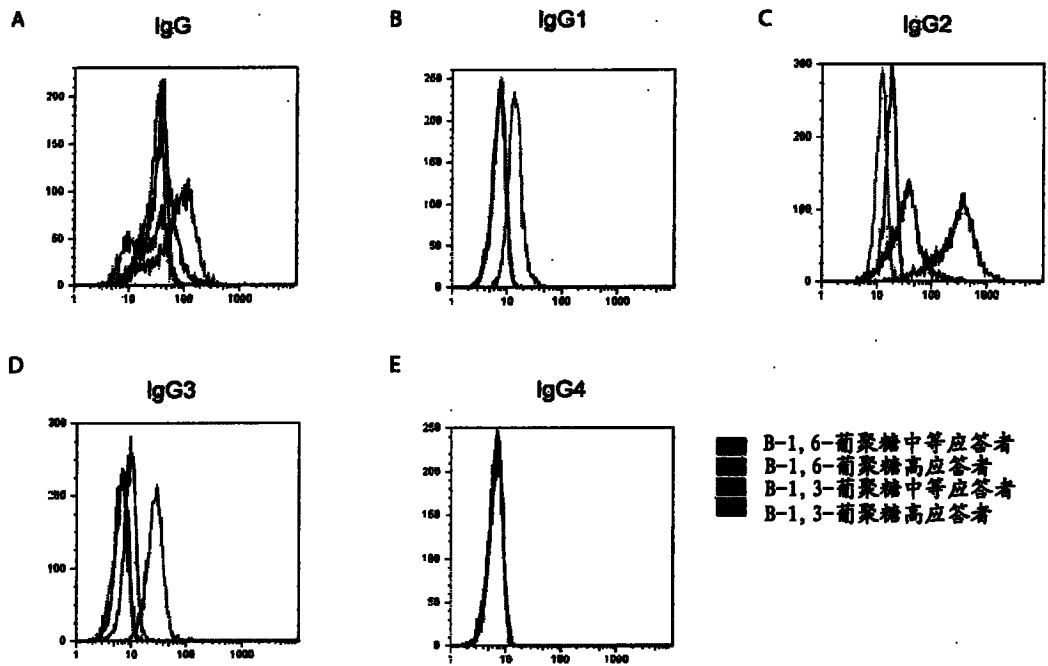


图 3

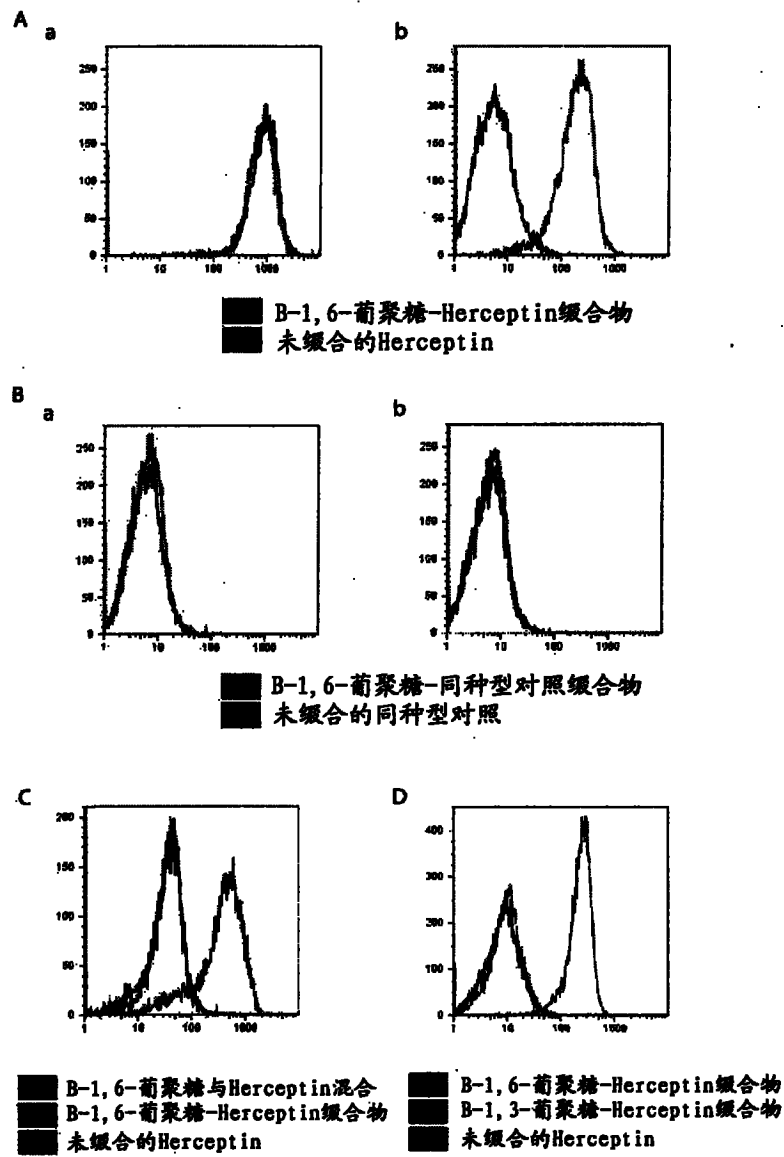
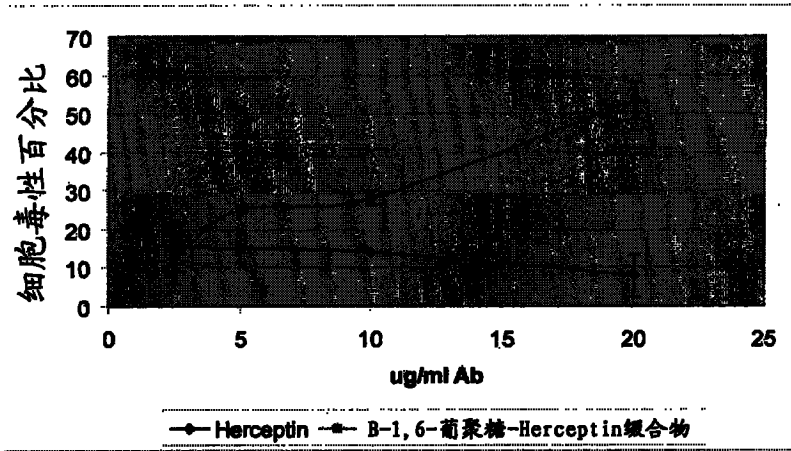


图 4

A



B



图 5

专利名称(译)	免疫调节组合物及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102119332A</a>	公开(公告)日	2011-07-06
申请号	CN200980124834.0	申请日	2009-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	免疫刺激公司		
申请(专利权)人(译)	免疫刺激公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫刺激公司		
[标]发明人	GR芬克		
发明人	I·鲁宾-贝耶拉诺 G·R·芬克		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/563 C07K16/18		
CPC分类号	A61K2039/55583 G01N2400/02 G01N33/6854 A61K47/48561 A61K47/4823 G01N2333/415 C07K16/44 A61K39/39 A61K45/06 A61K47/61 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61K47/6849		
代理人(译)	谭明胜 刘健		
优先权	61/071437 2008-04-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及β1-6葡聚糖、组合物、诊断试剂盒和包含上述物质的装置，及其在免疫应答的调节和癌症、感染、炎症及自身免疫病的治疗、延迟进展、降低发病率或严重程度中的使用方法。本发明某些实施方案的β1-6葡聚糖富含O-乙酰基和/或缀合于固相支持物或连接靶向部分。本发明某些实施方案的β1-6葡聚糖募集免疫球蛋白G抗体以介导补体和嗜中性白细胞杀伤作用。本发明某些实施方案的缀合的β1-6葡聚糖靶向细胞以通过激活补体-介导的溶胞作用及募集嗜中性白细胞从而在靶位置刺激免疫应答。

