



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106170698 A

(43)申请公布日 2016. 11. 30

(21)申请号 201480074875.4

M.E.丹尼尔森 P.梅莫尼斯

(22)申请日 2014.12.01

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(30)优先权数据

代理人 梁谋 李炳爱

61/912,275 2013.12.05 US

62/005,335 2014.05.30 US

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.08.04

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/067944 2014.12.01

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/084732 EN 2015.06.11

(71)申请人 生物治疗公司  
地址 美国明尼苏达州

(72)发明人 N.波斯 M.A.安东尼奥萨米  
K.B.戈登 R.沃尔什

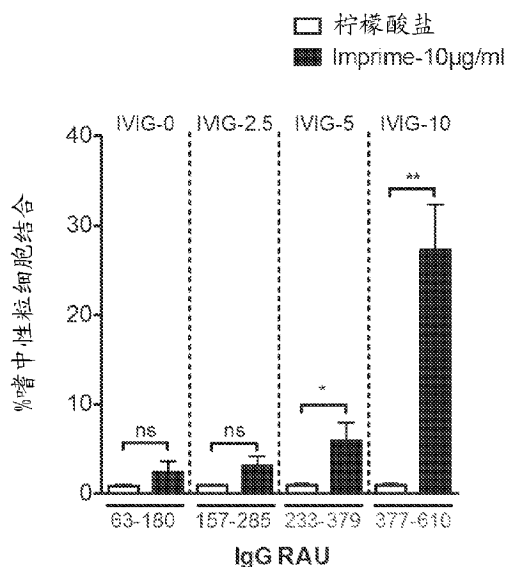
权利要求书1页 说明书21页 附图26页

(54)发明名称

β-葡聚糖测定方法

(57)摘要

在一个方面,本公开内容提供了用于就生物标记物分析来自受试者的样品的方法,所述生物标记物指示受试者对β-葡聚糖的免疫应答。一般地,该方法包括从受试者中获得生物样品,与参考标准相比较就生物标记物抗β-葡聚糖抗体分析样品,计算样品中关于抗β-葡聚糖抗体的相对抗体单位(RAU)值,并且如果RAU值大于关于生物标记物抗β-葡聚糖抗体的预定RAU值,则将受试者鉴定为生物标记物阳性的。



1. 一种方法,其包括:  
从受试者中获得生物样品;  
与参考标准相比较就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析所述样品;  
计算所述样品中关于抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的相对抗体单位(RAU)值;和  
如果所述RAU值大于关于所述生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的预定RAU值,则将所述受试者鉴定为生物标记物阳性的。
2. 一种方法,其包括:  
从受试者中获得生物样品;  
与参考标准相比较就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析所述样品;和  
如果所述样品含有的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的量大于关于生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的预定截断值(其将生物标记物阳性受试者与生物标记物阴性受试者分开),则将所述受试者鉴定为生物标记物阳性的。
3. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体包含IgG。
4. 权利要求1的方法,其中所述生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体包含IgG,并且所述预定RAU值是200。
5. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体包含IgM。
6. 权利要求1的方法,其中所述生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体包含IgM,并且所述预定RAU值是300。
7. 任何前述权利要求的方法,其进一步包括给鉴定为生物标记物阳性的受试者施用包含 $\beta$ -葡聚糖的组合物。
8. 任何前述权利要求的方法,其中所述 $\beta$ -葡聚糖衍生自酵母。
9. 任何前述权利要求的方法,其中所述 $\beta$ -葡聚糖包含 $\beta$ -1,3/1,6葡聚糖。
10. 任何前述权利要求的方法,其中所述 $\beta$ -葡聚糖包含 $\beta$ (1,6)-[聚(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚 $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。
11. 任何前述权利要求的方法,其中使用酶联免疫吸附测定(ELISA),就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析所述样品。
12. 任何前述权利要求的方法,其中所述方法进一步包括给所述受试者施用包含抗 $\beta$ -葡聚糖IgG<sub>2</sub>的组合物。

## $\beta$ -葡聚糖测定方法

### [0001] 与相关申请的交叉参考

本申请要求于2013年12月5日提交的美国临时专利申请序列号61/912,275,以及于2014年5月30日提交的美国临时专利申请序列号62/005,335的优先权,所述美国临时专利申请各自通过引用并入本文。

### [0002] 概述

本公开内容提供了用于就生物标记物分析来自受试者的样品的方法,所述生物标记物指示受试者对 $\beta$ -葡聚糖的免疫应答。

[0003] 在一些实施方案中,该方法一般包括从受试者中获得生物样品,与参考标准相比较就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析样品,计算样品中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或关于抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的相对抗体单位(RAU)值,并且如果抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或RAU值大于预定的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或关于生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的RAU值,则将受试者鉴定为生物标记物阳性的。

[0004] 在其他实施方案中,该方法一般包括从受试者获得生物样品,与参考标准相比较就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析样品,并且如果样品含有的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的量大于关于生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的预定截断值(其将生物标记物阳性受试者与生物标记物阴性受试者分开),则将受试者鉴定为生物标记物阳性的。

[0005] 在一些实施方案中,生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体可以是IgG。在这些实施方案的一些中,预定的RAU值可以是200。

[0006] 在一些实施方案中,生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体可以是IgM。在这些实施方案的一些中,预定的RAU值可以是300。

[0007] 在一些实施方案中,该方法可以进一步包括给鉴定为生物标记物阳性的受试者施用包括 $\beta$ -葡聚糖的组合物。

[0008] 在一些实施方案中,该方法可以进一步包括给鉴定为生物标记物阳性的受试者施用包括抗 $\beta$ -葡聚糖IgG<sub>2</sub>的组合物。

[0009] 在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖衍生自酵母,例如 $\beta$ -1,3/1,6葡聚糖。在某些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖可以包括 $\beta(1,6)$ -[聚(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚 $\beta(1,3)$ -D-吡喃葡萄糖。

[0010] 在一些实施方案中,就生物标记物抗 $\beta$ -葡聚糖抗体分析样品可以涉及使用酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0011] 本发明的上述概括并不意图描述本发明的每个公开的实施方案或每一种实现。下述说明书更具体地示例了说明性实施方案。在整个申请的几个地方,通过实施例列表提供了指导,所述实施例可以以各种组合使用。在每种情况下,所述列表仅充当代表性组,并且不应解释为详尽列表。

### [0012] 附图简述

图1A. 对参考血清指定160的任意值(即160相对抗体单位[RAU]/mL)。因此,在校准曲线上的最高点1:400稀释度导致400 mRAU/mL的值,并且在校准曲线上的最低点1:51200稀释度导致3.125 mRAU/mL的值。平均RAU/mL = 365。

- [0013] 图1B. IgG抗β-葡聚糖抗体浓度工作标准曲线。
- [0014] 图1C. IgM抗β-葡聚糖抗体浓度工作标准曲线。
- [0015] 图2. 来自具有低水平IgG(RAU <200)和IgM(RAU <100)抗β-葡聚糖抗体的八个健康志愿者的全血掺料有浓度增加的IVIG(0、2.5、5和10 mg/ml)。去除血浆并且对于每个样品确定RAU值。
- [0016] 图3. 来自具有低水平IgG(RAU <200)和IgM(RAU <100)抗β-葡聚糖抗体的四个健康志愿者的血液样品掺料有浓度增加的IVIG(0、2.5、5和10 mg/ml)。全血细胞用以10μg/ml的IMPRIME PGG进行处理,并且在37℃下温育30分钟,并且分析嗜中性粒细胞结合。
- [0017] 图4. 来自具有低水平IgG(RAU <200)和IgM(RAU <100)抗β-葡聚糖抗体的八个健康志愿者的全血细胞与IMPRIME PGG(10 mg/ml)和IVIG(0、2.5、5和10 mg/ml)一起培养,并且就IMPRIME PGG结合和功能进行评估(30分钟温育用于补体分析;2小时温育用于结合和受体调节分析;过夜培养用于细胞因子分析)。
- [0018] 图5. 来自具有低水平IgG(RAU <200)和IgM(RAU <100)抗β-葡聚糖抗体的八个健康志愿者的全血细胞与IMPRIME PGG(10 mg/ml)和IVIG(0、2.5、5和10 mg/ml)一起培养,并且就IMPRIME PGG诱导的SC5b-9释放进行评估。
- [0019] 图6. 来自具有低水平IgG(RAU <200)和IgM(RAU <100)抗β-葡聚糖抗体的八个健康志愿者的全血细胞与IMPRIME PGG(10 mg/ml)和IVIG(0、2.5、5和10 mg/ml)一起温育,并且就IMPRIME PGG诱导的嗜中性粒细胞上的CD62L脱落(流式细胞术)和IL-8生产(ELISA)进行评估。
- [0020] 图7. 关于结合和功能所需的RAU根据个体而改变。因此,生物标记物截断的目的是鉴定RAU水平,所述RAU水平排除将不响应IMPRIME PGG的个体,并且富集具有更高的响应概率的生物标记物阳性受试者。结合和功能数据指示大多数活性在 $\geq$  IVIG-5组(RAU 233-610)中发生,并且因此关于IgG截断的进一步分析应集中于高于200的RAU范围。
- [0021] 图8. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。
- [0022] 图9. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。带圆圈的受试者是具有低IgG RAU的高嗜中性粒细胞结合者,但具有高IgM RAU,因此,可以从IgG RAU分析中去除。
- [0023] 图10. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。在235的IgG RAU截断将其RAU足以促进结合(生物标记物阳性)的志愿者相对于其RAU不足以促进结合(生物标记物阴性)的志愿者分离。
- [0024] 图11. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。带圆圈的个体是IgG生物标记物阴性但高IgM RAU的。
- [0025] 图12. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。绿色圆圈中的非蓝色志愿者基于高IgG RAU已经是生物标记物阳性的,并且因此,可以从IgM RAU分析中去除。
- [0026] 图13. 通过IgG RAU水平标绘的IMPRIME PGG的健康志愿者嗜中性粒细胞结合。在330的IgM RAU截断将其RAU足以促进结合(生物标记物阳性)的志愿者相对于其RAU不足以促进结合(生物标记物阴性)的志愿者分离。
- [0027] 图14. 来自健康供体的全血中的抗β-葡聚糖抗体水平和C4a生产的关联。用来自

各个健康供体的IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )刺激30分钟的WB培养物中的C4a量在Y轴中作为超过柠檬酸盐对照的倍数变化而呈现。在X轴呈现了关于每个组的平均倍数变化 $\pm$  SEM。具有IgG RAU  $\geq 235$ 的8/10个体(80%)和具有IgG RAU  $< 235$ 的0/7个体证实对于IMPRIME PGG  $\geq 1.5$ 倍的C4a生产,支持高RAU和更大的补体活化之间的显著关联(\*\* $p=0.0069$ )。

[0028] 图15. 来自健康供体的全血中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平和C5a生产的关联。用来自各个健康供体的IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )刺激30分钟的WB培养物中的C5a量在Y轴中作为超过柠檬酸盐对照的倍数变化而呈现。在X轴呈现了关于每个组的平均倍数变化 $\pm$  SEM。具有IgG RAU  $\geq 235$ 的10/10个体和具有IgG RAU  $< 235$ 的1/7个体(14%)证实对于IMPRIME PGG  $\geq 1.5$ 倍的C5a生产,支持高RAU和更大的补体活化之间的显著关联(\* $p=0.0381$ )。

[0029] 图16. 来自健康供体的全血中的抗 $\beta$ -葡聚糖RAU水平和SC5b-9生产的关联。与IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )一起温育30分钟的健康个体全血培养物中的SC5b-9量。作为超过柠檬酸盐对照的倍数变化而呈现的SC5b-9水平(Y轴)通过IgG RAU状态(X轴)分层。具有IgG RAU  $\geq 235$ 的11/11(即100%)个体相对于具有IgG RAU  $< 235$ 的0/9(即0%)个体证实 $\geq 2$ 倍的SC5b-9生产,支持高RAU和更大的补体活化之间的显著关联(\*\* $p=0.0082$ )。

[0030] 图17. 来自健康供体的全血的PMN中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平和CR3的表面表达增加的关联。在用来自各个健康供体的IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )刺激30分钟的WB培养物中的CD15+嗜中性粒细胞上的CR3表面表达在Y轴中作为超过柠檬酸盐对照的MFI百分比变化而呈现。在X轴呈现了关于每个组的平均MFI百分比变化 $\pm$  SEM。与具有IgG RAU  $< 235$ 的个体(N = 7)相比较,来自具有IgG RAU  $\geq 235$ 的个体(N = 11)的嗜中性粒细胞证实表面CR3水平中的显著增加(\* $p=0.0211$ )。

[0031] 图18. 来自健康供体的全血的PMN中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平和CD88表达降低的关联。在用来自各个健康供体的IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )刺激30分钟的WB培养物中的CD15+嗜中性粒细胞上的CD88表面表达在Y轴中作为超过柠檬酸盐对照的MFI百分比变化而呈现。在X轴呈现了关于每个组的平均MFI百分比变化 $\pm$  SEM。与具有IgG RAU  $< 235$ 的个体(N = 8)相比较,来自具有IgG RAU  $\geq 235$ 的个体(N = 13)的嗜中性粒细胞证实表面CD88水平中的显著降低(\* $p=0.0197$ )。

[0032] 图19. 健康供体全血与IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )一起温育,并且测定在CD15+嗜中性粒细胞上的CD62L表面表达。CD15<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>细胞百分比(各个和平均值 $\pm$  SEM)通过X轴上的RAU状态分层而存在于Y轴上。来自具有IgG RAU  $\geq 235$ 的个体的嗜中性粒细胞证实CD62L表达的显著丧失(\*\* $p=0.005$ )。

[0033] 图20. 健康供体全血与IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )一起温过夜育,随后测量血浆IL-8水平。作为超过柠檬酸盐对照的倍数变化而呈现的IL-8水平(Y轴)通过IgG RAU状态(X轴)分层。具有IgG RAU  $\geq 235$ 的12/13(即92%)个体相对于具有IgG RAU  $< 235$ 的仅3/13(即23%)个体证实对于IMPRIME PGG  $\geq 2$ 倍的IL-8生产,支持高RAU和更大的IL-8生产之间的显著关联(\*\* $p=0.0028$ )。

[0034] 图21. 来自健康供体的全血中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平和SC5b-9生产的关联。在用来自各个健康供体的IMPRIME PGG(10  $\mu\text{g}/\text{mI}$ )刺激30分钟的WB培养物中的SC5b-9量在Y轴中作为超过柠檬酸盐对照的倍数变化而呈现。在X轴呈现了关于每个组的平均倍数变化 $\pm$  SEM。与具有IgM RAU  $< 235$ 的个体(N = 9)相比较,来自具有IgM RAU  $\geq 330$ 的个体(N = 3)的

嗜中性粒细胞证实SC5b-9生产中的显著增加(\*\*\*p=0.0003)。

[0035] 图22. 用考马斯蓝染色的纯化的“黄金参考”IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的SDS-PAGE(在还原条件下4-20%)。其分子量(MW)以千道尔顿(kDa)表示的蛋白质标准品显示于泳道3中。

[0036] 图23.(A)健康受试者的全血中的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞结合的关联;(B)健康受试者的全血中的IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞结合的关联。

[0037] 图24.(A)健康受试者的全血中的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的单核细胞结合的关联;(B)健康受试者的全血中的IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的单核细胞结合的关联。

[0038] 图25.(A)基于高相对于低结合者状态,IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞结合的关联;(B)基于高相对于低结合者状态,IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞结合的关联。

[0039] 图26.(A)基于高相对于低结合者状态,IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的单核细胞结合的关联;(B)基于高相对于低结合者状态,IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度与IMPRIME PGG的单核细胞结合的关联。

[0040] 图27.(A)基于嗜中性粒细胞结合的IgG ROC曲线分析;(B)基于嗜中性粒细胞结合的IgM ROC曲线分析。

[0041] 图28.(A)基于单核细胞结合的IgG ROC曲线分析;(B)基于单核细胞结合的IgM ROC曲线分析。

[0042] 图29. 基于高相对于低结合者状态的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体亚类嗜中性粒细胞结合。

[0043] 图30. IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体亚类嗜中性粒细胞结合。

[0044] 图31. 静脉内免疫球蛋白的体内输注以增加抗 $\beta$ -葡聚糖抗体用于低结合者患者的IMPRIME PGG治疗的结果。(A)IgG RAU;(B)PMN结合和单核细胞结合;(C)C5a增加倍数。

[0045] 举例说明性实施方案的详述

$\beta$ -葡聚糖是衍生自各种微生物和植物来源的葡萄糖聚合物,所述来源包括例如酵母、细菌、藻类、海藻、蘑菇、燕麦和大麦。当然,酵母 $\beta$ -葡聚糖已就其免疫调节特性进行广泛评估。酵母 $\beta$ -葡聚糖可以作为各种形式存在,例如完整的酵母、酵母聚糖、纯化的全葡聚糖颗粒、溶解的酵母聚糖多糖、或不同分子量的高度纯化的可溶性 $\beta$ 葡聚糖。在结构上,酵母 $\beta$ -葡聚糖由葡萄糖单体组成,所述葡萄糖单体作为具有经由 $\beta$ -(1,6)糖苷键与主链连接的循环 $\beta$ -(1,3)吡喃葡萄糖分支的 $\beta$ -(1,3)-连接的吡喃葡萄糖主链组构。不同形式的酵母 $\beta$ -葡聚糖可以彼此不同起作用。酵母 $\beta$ -葡聚糖通过其发挥其免疫调节作用的机制可以受不同形式的 $\beta$ -葡聚糖之间的结构差异影响,所述结构差异例如其微粒或可溶性质、三级构象、主链的长度、侧链的长度和侧链的频率。酵母 $\beta$ -葡聚糖的免疫刺激功能也依赖于在不同物种中的不同细胞类型中接合的受体,其再次可以依赖于 $\beta$ -葡聚糖的结构特性。

[0046] 一般而言, $\beta$ -葡聚糖免疫疗法可以包括给受试者施用任何合适形式的 $\beta$ -葡聚糖或者两种或更多种形式的 $\beta$ -葡聚糖的任何组合。合适的 $\beta$ -葡聚糖和由其天然来源制备合适的 $\beta$ -葡聚糖在例如美国专利申请公开号US2008/0103112 A1中描述。在一些情况下, $\beta$ -葡聚糖

可以衍生自酵母例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在某些情况下,β-葡聚糖可以是或衍生自β(1,6)-[聚(1,3)-D-吡喃葡糖基]-聚β(1,3)-D-吡喃葡萄糖,在本文中也称为PGG(IMPRIME PGG,Biothera,Eagan,MN),高度纯化且充分表征形式的可溶性酵母衍生β-葡聚糖。此外,基于β-葡聚糖的免疫疗法可以涉及例如经修饰的和/或衍生化的β-葡聚糖例如国际专利申请号PCT/US12/36795中描述的那些的使用。在其他情况下,β-葡聚糖免疫疗法可以涉及施用例如微粒-可溶性β-葡聚糖或微粒-可溶性β-葡聚糖制剂,其各自在例如美国专利号7,981,447中描述。

[0047] 生物标记物研究证实在受试者中在其嗜中性粒细胞和单核细胞结合Imprime PGG的能力中的差异。IMPRIME PGG与这些细胞的结合与受试者对IMPRIME PGG的免疫调节应答关联。此外,与嗜中性粒细胞和单核细胞的IMPRIME PGG结合涉及特异性水平的天然抗β-葡聚糖抗体的存在。

[0048] 本公开内容提供了定量测量患者血清样品中的抗β-葡聚糖IgG和IgM抗体的简单ELISA方法。ELISA方法可以用作生物标记物测定。用于生物标记物测定的截断水平鉴定健康志愿者的生物标记物阳性和生物标记物阴性亚组,并且这些截断点与结合、功能和临床结果关联。

[0049] 评估IMPRIME PGG与来自健康志愿者的嗜中性粒细胞结合的早期研究揭示具有不同结合能力的受试者。IMPRIME PGG的高嗜中性粒细胞结合(例如与>20%嗜中性粒细胞结合的IMPRIME PGG)在~40%的健康志愿者中发现。IMPRIME PGG的单核细胞结合与健康志愿者中的嗜中性粒细胞的结合潜力平行。在体外,高嗜中性粒细胞结合者和高单核细胞结合者产生比低结合者更多的IL-8。

[0050] 更高的天然抗β-葡聚糖抗体水平与IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞结合对应。高结合者血清/血浆可以增加与来自低结合者的嗜中性粒细胞的IMPRIME PGG结合。高结合者血清中的抗β-葡聚糖抗体可以增加在非允许结合条件下在低结合者中的嗜中性粒细胞IMPRIME PGG结合。例如,含有高天然抗β-葡聚糖抗体滴度的静脉内免疫球蛋白(IVIG)可以增加与来自低结合者的嗜中性粒细胞的IMPRIME PGG结合。天然抗β-葡聚糖IgG和/或IgM抗体涉及与嗜中性粒细胞和单核细胞结合。不希望受任何特定理论束缚,天然抗β-葡聚糖抗体(例如IgG和IgM)与IMPRIME PGG结合。IMPRIME PGG经由补体活化的经典途径受调理作用。受调理作用的IMPRIME PGG与嗜中性粒细胞和单核细胞上的CR3受体的凝集素样结构域结合。IMPRIME PGG的调理作用(即iC3b沉积)由于在抗体结合后的补体活化的经典途径而发生。几种功能标记物在IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞和/或单核细胞结合过程期间得到调节,例如C4a、C5a和SC5b-9。

[0051] 与全血样品中的嗜中性粒细胞和/或单核细胞的IMPRIME PGG结合可以使用测定进行重现性测量,例如流式细胞术。然而,全血对于此类测定的使用存在某些挑战。例如,它需要活的健康细胞,使得血样需要在收集24小时内接受且加工。因此,运送条件和环境因素可以损害血细胞。此类测定还需要来自已知高结合者和低结合者受试者的对照血样。最后,尽管是概念上简单的测定,但流式细胞术技术在许多临床实验室中并不常见。因此,基于流式细胞术的测定不是用于临床开发的实际测定。

[0052] 本公开内容提供了涉及测量人血清样品中的内源抗β-葡聚糖抗体水平的简单定量ELISA的方法。该方法克服了由用于开发实际临床测试的基于流式细胞术的测定存在的

挑战。基于血清的ELISA测定是常见的临床测定,并且可以由大多数临床实验室执行。此外,血清样品可以进行冷冻,导致更容易的贮存、运送和测定表现中的一致性。

[0053] 在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖可以衍生自酵母例如酿酒酵母。在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖可以包括 $\beta$ -1,3/1,6葡聚糖,例如 $\beta(1,6)$ -[聚(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚 $\beta(1,3)$ -D-吡喃葡萄糖。

[0054] 在一些实施方案中,与免疫细胞结合的 $\beta$ -葡聚糖可以通过使样品与单克隆抗体接触进行检测,所述单克隆抗体与 $\beta$ -葡聚糖特异性结合。单克隆抗体可以是与 $\beta$ -葡聚糖特异性结合的任何单克隆抗体。如本文使用的,“特异性”及其变化指对于特定靶具有差异或非一般(即非特异性)亲和力,至任何程度。特异性结合 $\beta$ -葡聚糖的示例性单克隆抗体包括例如鉴定为BfD I、BfD II、BfD III和/或BfD IV(Biothera,Eagan,MN)的单克隆抗体,其各自在美国专利号6,294,321中描述。

[0055] 测量血清中的抗体量的传统方法通常涉及在将样品系列稀释的测定背景下使用ELISA。对ELISA测定实施系列稀释,并且基于生成阳性测定应答的血清样品的最大稀释度估计血清样品中的抗体量。所得到的滴度值是在稀释范围内的估计值,而不是抗体量的确切测量。系列稀释方法频繁用于血清学中,以确定血清中的抗体量(滴度水平)。确定滴度水平频繁用于评估对疫苗的抗体应答。然而,在系列稀释方法中,不能直接测量产生的抗体的确切量。相反,仅能够估计在稀释范围内产生的抗体量。滴度水平因此不顺应以直接方式而无需数据修饰和/或统计分析技术的标准统计分析。

[0056] 相比之下,本公开内容提供了基于ELISA的方法,其测量人血清中针对IMPRIME PGG的天然抗 $\beta$ -葡聚糖抗体。该方法涉及定量测量作为相对抗体单位(RAU)或在统计要求内的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度的天然抗 $\beta$ -葡聚糖抗体量。这通过在相同测定中生成滴度并且关联RAU数据或抗体浓度数据(两者均由校准曲线确定)来完成。因此,本文描述的方法涉及由具有确定水平的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的血清生成内部标准曲线。此外,该方法提供了定量测量相对或实际抗 $\beta$ -葡聚糖抗体而不是测量滴度的更佳方法。

[0057] 该方法可以用于测量抗 $\beta$ -葡聚糖IgG和/或抗 $\beta$ -葡聚糖IgM。关于IgG和/或IgM的RAU计算显示于表7中。关于IgG和/或IgM的抗体浓度的计算分别显示于表8和表9中。该方法提供了测定内精确度-即板之间的重现性。该方法还提供了测定间精确度-即测定和/或测定日之间关于对照和测试血清样品的重现性。该方法允许通过单个操作者评估在不同测试板上分析的多重样品。因此,该方法提供了无论是在单日内分析多重样品的单个操作者的手中还是经过多日过程多个操作者的手中的可靠、重现性结果。

[0058] 结合和功能所需的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平可以根据个体而改变。图2显示了对于IVIG在抗 $\beta$ -葡聚糖IgG RAU水平中的剂量依赖性增加。该方法涉及使用生物标记物截断来鉴定RAU水平,所述RAU水平排除将不响应Imprime PGG的个体,并且富集具有更高的响应概率的生物标记物阳性受试者。结合和功能数据指示大多数活性在 $\geq$  IVIG-5组(RAU 233-610)中发生,并且因此关于IgG截断的进一步分析应集中于高于200的RAU范围(图7)。

[0059] 执行在32个健康志愿者中的初始研究,以确定在嗜中性粒细胞或单核细胞中的IMPRIME PGG结合和功能必需的天然抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的特异性最低水平(IgG和/或IgM的RAU)。定量为IgG和/或IgM的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度的最低水平使用健康受试者的更大队列(n=143)进一步优化,并且证实就IMPRIME PGG与嗜中性粒细胞和单核细胞结合而言的升高

的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平、IMPRIME PGG诱导的功能变化和临床结果的显著性。具有有助于IMPRIME PGG与嗜中性粒细胞和单核细胞结合的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平的受试者视为“生物标记物阳性的”。生物测定可以允许鉴定在临床背景下具有抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平的受试者，所述抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平对于IMPRIME PGG与嗜中性粒细胞和单核细胞结合太低(“生物标记物阴性”)，使得他们可以接受替代治疗或接受抗 $\beta$ -葡聚糖抗体治疗，使得他们可以更好地响应涉及IMPRIME PGG的疗法。可替代地，生物标记物阳性个体可以比生物标记物阴性个体更免疫活性，并且因此可以更好地响应免疫疗法药物。

[0060] 当使用RAU方法时，通过具有至少最低IgG RAU预定值的IgG RAU和/或具有至少最低IgM RAU预定值的IgM RAU，个体可以是生物标记物阳性的。在一些实施方案中，IgG RAU预定值可以是至少200，例如至少205、至少210、至少215、至少220、至少225、至少230、至少235、至少240、至少245、至少250、至少255、至少260、至少265、至少270或至少275。在一些实施方案中，IgM RAU预定值可以是至少300，例如至少305、至少310、至少315、至少320、至少325、至少330、至少335、至少340、至少345、至少350、至少355、至少360、至少365、至少370或至少375。即，例如至少200的IgG RAU或例如至少300的IgM RAU合理地与个体关联，所述个体显示出至少5%的嗜中性粒细胞结合 $\beta$ -葡聚糖，以及与 $\beta$ -葡聚糖“高结合者”状态相关的嗜中性粒细胞和单核细胞功能调节。

[0061] 例如，图8显示了根据计算的IgG RAU关于32个健康志愿者各自的嗜中性粒细胞结合百分比曲线。在5%嗜中性粒细胞结合处的水平线描绘“高结合者”与“低结合者”。为了区分其IgG RAU太低不能结合超过5%的嗜中性粒细胞的那些志愿者与其IgG RAU足以显示出至少5%的其嗜中性粒细胞结合 $\beta$ -葡聚糖的那些志愿者，我们确定了在235的IgG RAU处的截断线(图10)，在显示高于5%的嗜中性粒细胞结合 $\beta$ -葡聚糖的最低IgG RAU值(239)下的最接近值。我们随后估计三个个体的水平，所述个体具有大于5%的嗜中性粒细胞结合 $\beta$ -葡聚糖，但是IgG生物标记物阴性的(图9，带圆圈的)。这三个个体是IgG生物标记物阴性的-即小于235的IgG RAU-然而，显示出至少5%的其嗜中性粒细胞结合 $\beta$ -葡聚糖。当嗜中性粒细胞结合根据IgM RAU进行标绘时，确定了330的IgM RAU截断值(图13)。

[0062] 当使用进一步优化的抗体浓度方法时，通过具有至少最低IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度预定值的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度和/或具有至少最低IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度预定值的IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度，个体可以是生物标记物阳性的。来自衍生自相同全血抽取的血清的IMPRIME PGG结合和抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度测量在健康志愿者N=143中进行评估。对于N=143个体确定的IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度范围分别为1.13-209.8  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (7.8-1447.8 RAU/mI)和5.3-2032.7  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (12.8-4878.4 RAU/mI)。嗜中性粒细胞和单核细胞均证实分别在大约14  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (100 RAU/mI)和42  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (100 RAU/mI) IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平时更频繁的大于5%结合。

[0063] 因此，在一些实施方案中，IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度预定值可以是至少14  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (100 RAU)，例如至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75或至少80  $\mu\text{g}/\text{mI}$ (100 RAU)。在一些实施方案中，IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度预定值可以是至少42  $\mu\text{g}/\text{mI}$ ，例如至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少110、至少120、至少130、至少140、至少150、至少160、至少170、至少180、至少190、至少200、至少210、至少220、至少230、至少240、至少250、至少260、至少270、至少280、

至少290、至少300、至少310、至少320、至少330、至少340、至少350、至少360、至少370、至少380、至少390、至少400、至少410、至少420、至少430、至少440、至少450、至少460、至少470、至少480、至少490、至少500、至少510、至少520、至少530、至少540或至少550  $\mu\text{g}/\text{mI}$  (100 RAU)。即,例如至少14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或例如至少42  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度合理地与个体关联,所述个体显示出至少5%的嗜中性粒细胞或单核细胞结合 $\beta$ -葡聚糖,以及与 $\beta$ -葡聚糖“高结合者”状态相关的嗜中性粒细胞和单核细胞功能调节。

[0064] 图23和图24显示根据计算的(A)IgG和(B)IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度,关于每个健康志愿者的嗜中性粒细胞和单核细胞结合百分比曲线。如所示的,与嗜中性粒细胞和单核细胞的IMPRIME PGG结合随着IgG和/或IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度增加而增加。

[0065] 如图25和图26中所示,在IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度以及在5%结合水平下的嗜中性粒细胞和单核细胞结合两者之间存在强关联,区分高和低IMPRIME PGG结合者。在抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度以及年龄、性别或总免疫球蛋白之间不存在关联(数据未示出)。

[0066] 接下来,在143个健康志愿者中研究抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的探索性截断。使用关于IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞和单核细胞结合两者的5%水平,使用ROC曲线分析测定抗 $\beta$ -葡聚糖浓度的灵敏度和特异性之间的关联(图27和图28)。在关于结合的95%的初始探索性特异性时,确定抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度截断,并且用于计算健康群体中的生物标记物的流行及其用于确定结合状态的灵敏度。结果显示于表1中。

[0067] 表1

参数	基于嗜中性粒细胞结合		基于单核细胞结合	
	IgG	IgM	IgG	IgM
截断 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	51	118	40	126
流行 (生物标记物阳性)	36%	28%	41%	15%
	总体 46%		总体 48%	
灵敏度 (生物标记物阳性)	64%	33%	62%	22%
	总体 75%		总体 66%	

[0068] 阳性IgG抗 $\beta$ -葡聚糖生物标记物状态与使用任一组截断的体外IMPRIME PGG生物活性高度关联。然而,如由ROC曲线分析指示的,在不同截断下的相似灵敏度指示与IMPRIME PGG的生物活性关联的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度范围。

[0069] 因此,研究各种抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度截断,并且功能终点用于确定截断是否合理地将个体分离成高结合者和低结合者(生物标记物阳性和生物标记物阴性)状态。IL-8生产用作功能终点,以探究IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度截断范围。结果显示于表2中。

[0070] 表2

截断(RAU/ $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	与嗜中性粒细胞结合	与单核细胞结合	IL-8生产	近似特异性/灵敏度
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

[0071] 同样地, C4a/SC5b9生产用作功能终点, 以探究IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度截断范围。结果显示于表3中。

[0072] 表3

截断(RAU/ $\mu$ g/ml)	与嗜中性粒细胞结合	与单核细胞结合	C4a生产	近似特异性/灵敏度
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

[0073] 如由数据显而易见的, 取决于视为使用ROC曲线分析在临床试验中的患者分层或选择必需的特异性和灵敏度组合, 可以选择特异性IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或RAU截断。例如, 基于健康志愿者中的IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞和单核细胞结合的ROC曲线分析, 276 RAU/mI或40  $\mu$ g/mI的截断将具有大约98%的特异性和61%的灵敏度。

[0074] 基于功能分析例如此处使用的C4a生产的IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或RAU截断的合理范围可以是200-350 RAU/mI或83-146  $\mu$ g/mI。如上文, 取决于视为在特定临床试验中的患者分层或选择必需的特异性和灵敏度组合, 可以选择特异性IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度或RAU截断。例如, 基于健康志愿者中的IMPRIME PGG的嗜中性粒细胞和单核细胞结合的ROC曲线分析, 250 RAU/mI或104 $\mu$ g/mI的截断将具有大约94%的特异性和31%的灵敏度。

[0075] 作为另外的支持, 使用表1中所示的截断, 生物标记物状态与由IMPRIME PGG诱导的功能变化关联, 包括补体组分C3a、C5a、SC5b9的活化, 嗜中性粒细胞CR1、CR3、CD88和CD62L表面标记物表达的调节, 以及IL-8诱导。结果显示于表4中。

[0076] 表4

功能	通过总体生物标记物状态的比较 <sup>1</sup>	
	嗜中性粒细胞衍生的截断 <sup>2</sup>	单核细胞衍生的截断 <sup>3</sup>
C4a 增加倍数 (n=32)	0.0002	0.0002
C5a 增加倍数 (n=32)	0.0037	0.0037
SC5b9 增加倍数 (n=32)	<0.0001	<0.0001
IL-8 增加倍数 (n=129)	0.0006	0.0008
嗜中性粒细胞结合 (n=143)	<0.0001	<0.0001
嗜中性粒细胞 CR1 增加倍数 (n=32)	0.2585	0.2085
嗜中性粒细胞 CR3 增加倍数 (n=40)	0.0249	0.0249
嗜中性粒细胞 CD88 减少倍数 (n=32)	0.0074	0.0074
嗜中性粒细胞 CD62L 减少倍数 (n=32)	0.0058	0.0058
单核细胞结合 (n=143)	<0.0001	<0.0001
单核细胞 CR1 增加倍数 (n=36)	0.0023	0.0028
单核细胞 CR3 增加倍数 (n=37)	0.0007	0.0007
单核细胞 CD88 减少倍数 (n=37)	0.0801	0.0801

<sup>1</sup>p值

<sup>2</sup> 51 µg/ml的嗜中性粒细胞IgG抗β-葡聚糖抗体浓度截断和118 µg/ml的IgM截断

<sup>3</sup> 40 µg/ml的单核细胞IgG抗β-葡聚糖抗体浓度截断和126 µg/ml的IgM截断。

[0077] 生物标记物截断随后应用于两个临床试验中的患者,所述临床试验研究包括IMPRIME PGG的肺癌治疗。在第一个随机化、2期研究中,对于前4-6个周期,在每个3周治疗周期的第1、8和15天时,59个IV期NSCLC患者接受西妥昔单抗、卡铂和紫杉醇,不连同(对照)或连同IMPRIME PGG 4 mg/kg。用单独或与IMPRIME PGG组合的西妥昔单抗的维持治疗继续直至疾病进展时。研究在通过上文健康志愿者数据和功能数据确定的范围内的各个点处的截断。结果显示于表5中。

[0078] 表5

IgG/IgM 截断	生物标记物数目+	中值总体存活 (月)		存活差异
		生物标记物+	生物标记物-	
IgG: 51 $\mu\text{g/ml}$ IgM: 118 $\mu\text{g/ml}$	25	429	261	168
IgG: 30 $\mu\text{g/ml}$ IgM: 60 $\mu\text{g/ml}$	41	289	162	127
IgG: 40 $\mu\text{g/ml}$ IgM: 80 $\mu\text{g/ml}$	32	373	217.5	155.5
IgG: 60 $\mu\text{g/ml}$ IgM: 130 $\mu\text{g/ml}$	23	378	244	134

[0079] 中值总体存活(OS)通过研究者在临床试验场所进行确定。对于一些患者,生物标记物状态在治疗过程期间改变。因此,生物标记物阳性状态给予在第一个或第二个周期时测量高于截断的患者。

[0080] 例如,使用51  $\mu\text{g/ml}$  IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度、118 $\mu\text{g/ml}$  IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度的截断,25个患者是生物标记物阳性的。与生物标记物阴性患者的261天相比较,生物标记物阳性患者具有429天的中值总体存活。因此,两个组之间的存活差异是168天,其是显著差异。在此处给出的例子中,该截断产生该临床试验中的最佳分离。剩余示例截断产生在两个组之间较小的中值总体存活差异。然而,在一些情况下,通过降低截断具有更多患者被治疗可能是理想的。并且如上文讨论的,使用ROC曲线分析,特异性和灵敏度可根据需要改变用于定制患者分离。

[0081] 在第二个随机化、2期研究中,在与上文研究相似的治疗周期中,58个IV期NSCLC患者接受贝伐珠单抗、卡铂和紫杉醇,不连同(对照)或连同IMPRIME PGG 4 mg/kg。用单独或与IMPRIME PGG组合的贝伐珠单抗的维持治疗继续直至疾病进展时。研究在通过上文健康志愿者数据和功能数据确定的范围内的各个点处的截断。结果显示于表6中。

[0082] 表6

IgG/IgM 截断	生物标记物数目+	中值总体存活 (月)		存活差异
		生物标记物+	生物标记物-	
IgG: 60 µg/ml IgM: 100 µg/ml	18	553	357	196
IgG: 38 µg/ml IgM: 60 µg/ml	26	474	437.5	36.5
IgG: 80 µg/ml IgM: 120 µg/ml	16	419	483	-64
IgG: 50 µg/ml IgM: 80 µg/ml	25	474	437.5	36.6

[0083] 对于该临床试验,最佳截断在60 µg/ml IgG抗β-葡聚糖抗体浓度和100 µg/ml IgM抗β-葡聚糖抗体浓度时出现。如由剩余例子所示,在该截断任一侧上的截断快速崩溃,并且不提供实际差异。

[0084] 再次,取决于所需特异性和灵敏度(通过ROC曲线分析计算的),可以选择适当截断以实现响应IMPRIME PGG治疗,而无需补充抗β-葡聚糖抗体的患者的分层。

[0085] 基于生物标记物状态的患者分离(高结合者相对于低结合者)可以使用在上文阐述范围内的截断来实现。因此,生物标记物状态可以用作成功的β-葡聚糖免疫疗法的预测物。

[0086] 如上所述,一些患者的生物标记物状态可以在疗法过程期间改变。我们因此评估相对于在任何疗法周期后-在C1/C2/C3的任何一个后显示出生物标记物阳性状态的患者,关于在一个疗法周期后显示出生物标记物阳性状态的患者截断值。

[0087] 表7 在一个化学疗法周期后显示出生物标记物阳性状态的生物标记物阳性患者的总体存活

IgG/IgM 截断 ( $\mu\text{g/ml}$ )	中值 OS (贝伐珠单抗)		中值 OS (西妥昔单抗)	
	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

[0088] 例如,使用60  $\mu\text{g/ml}$  IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度、100  $\mu\text{g/ml}$  IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度的截断来分离生物标记物阳性与生物标记物阴性患者,接受贝伐珠单抗疗法的生物标记物阳性患者具有超过使用相同截断值的生物标记物阴性患者多于200天的中值总体存活。类似地,使用45  $\mu\text{g/ml}$  IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度、110  $\mu\text{g/ml}$  IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度的截断,接受西妥昔单抗疗法的生物标记物阳性患者具有超过使用相同截断值的生物标记物阴性患者多于130天的中值总体存活。如上文就表5和表6中呈现的数据所述,使用ROC曲线分析,根据定制患者分离的需要,可以选择关于所需特异性和灵敏度组合的适当截断值。

[0089] 表8在任何化学疗法周期后显示出生物标记物阳性状态的生物标记物阳性患者的总体存活

IgG/IgM 截断 (µg/ml)	中值 OS (贝伐珠单抗)		中值 OS (西妥昔单抗)	
	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	378.5	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

[0090] 此处再次,可以选择适当的IgG和IgM截断值,以使生物标记物阳性患者的存活达到最大。例如,使用60 µg/ml IgG抗β-葡聚糖抗体浓度、100 µg/ml IgM抗β-葡聚糖抗体浓度的截断,接受贝伐珠单抗疗法的生物标记物阳性患者具有超过使用相同截断值的生物标记物阴性患者多于150天的中值总体存活。使用45 µg/ml或50 µg/ml IgG抗β-葡聚糖抗体浓度、以及110 µg/ml或120 µg/ml IgM抗β-葡聚糖抗体浓度的截断,接受贝伐珠单抗疗法的生物标记物阳性患者具有超过使用相同截断值的生物标记物阴性患者多于150天的中值总体存活。

[0091] 然而,在一些临床情况下,总体存活可能不一定是最有关的临床终点。在一些情况下,总体应答率(ORR)可能是更有关的。如本文使用的,“总体应答率”指在治疗后显示出癌症大小和/或增殖中的可测量降低的患者百分比。表9中的数据证实IgG和IgM截断值可以使用ORR作为临床终点进行确定。表9报告了来自上文描述的贝伐珠单抗和西妥昔单抗的合并数据,反映作为终点的中值总体存活和总体存活率。

[0092] 表9

IgG/IgM 截断 ( $\mu\text{g/ml}$ )	中值 OS			%ORR		
	生物 标记物+	生物 标记物-	差异	生物 标记物+	生物 标记物-	差异
35/100	368.5	294	74.5	57.14%	48.38%	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%	48.38%	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%	48.74%	16.71%
40/120	387.5	292	95.5	59.09%	48.35%	18.74%
45/120	438	289	149	63.16%	39.68%	23.48%
50/120	418	292	126	62.16%	48.63%	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%

[0093] 表9显示取决于使用总体存活还是总体应答率作为用于作出分离的临床终点,对于分离生物标记物阳性与生物标记物阴性患者最有效的IgG/IgM截断值可以有几分不同。因此,与对于给定生物标记物阳性患者的治疗最有关的临床终点无关,本文描述的方法可以提供用于鉴定生物标记物阳性患者的IgG/IgM截断值。

[0094] 一旦我们确定生物标记物状态可以用作成功 $\beta$ -葡聚糖免疫疗法的预测物,我们随后就察看IgG亚类是否起作用。IMPRIME PGG是碳水化合物,并且针对碳水化合物抗原的人IgG应答主要局限于IgG<sub>2</sub>亚类。IgG<sub>2</sub>是弱补体激活物,并且仅在抗原-抗体等价时或当抗体过量时活化补体活化的经典途径。IMPRIME PGG已显示活化补体(C4a、C5a、SC5b9),但它不引起由于在细胞表面上的MAC形成的细胞裂解。另外,IMPRIME PGG在大多数供体中显示出钟形浓度应答曲线。结合、补体活化和IL-8生产在10或25  $\mu\text{g/ml}$ 时是最佳的,但在100  $\mu\text{g/ml}$ 时较低。在一些情况下,这可能是由于在10  $\mu\text{g/ml}$ 或25  $\mu\text{g/ml}$ 时抗原-抗体是等价的或抗体是过量的,而在100  $\mu\text{g/ml}$ 时抗原是过量的。

[0095] 为了理解IgG亚类,因为它们涉及IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体,使用对于IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的每个亚类特异性的二抗执行嗜中性粒细胞结合。首先,来自高结合者和低结合者血清的IgG亚类对于与嗜中性粒细胞的结合进行测试。结果显示于图29中。如由结果显而易见的,IgG<sub>2</sub>亚类显示出与生物标记物状态的最佳关联。该发现在图30中生成的曲线中加以验证。来自高结合者血清的IgG<sub>2</sub>抗 $\beta$ -葡聚糖抗体的嗜中性粒细胞结合产生比IgG<sub>1</sub>强得多的关联。

[0096] 因此,在另一个实施方案中,IgG<sub>2</sub>抗 $\beta$ -葡聚糖抗体可以用作IMPRIME PGG免疫疗法的预测性生物标记物。另外,对于其为低结合者的患者,IgG<sub>2</sub>抗 $\beta$ -葡聚糖的施用可以用于改

善其对IMPRIME PGG免疫疗法的应答。

[0097] 最后,显示静脉内免疫球蛋白(IVIG)的体内输注增加抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平且改善对IMPRIME PGG治疗的应答。经历用于结肠直肠癌的西妥昔单抗和IMPRIME PGG每周输注的组合治疗的54岁患者具有在治疗其血清样品中测量的低抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平。为了增加患者的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平,在28天治疗周期的第一天时输注IVIG(1g/kg),在周期7开始且继续直到周期12。如图31A中所示,治疗后血清样品通过ELISA就以RAU/mI表示的IgG抗 $\beta$ -葡聚糖抗体水平进行分析。IVIG的添加增加每个周期的第1天样品中的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度,并且随后在每个周期的剩余周期期间下降至基线水平。在图31B中,通过FACS分析IMPRIME PGG与PMN和单核细胞结合的体内结合,并且通过与剂量前样品相比较,IMPRIME PGG剂量后的全血样品中的IMPRIME PGG+ PMN或单核细胞增加进行计算。结合随着测量的抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度水平而改变,对于在其中患者接受IVIG输注的当天时的PMN和单核细胞两者具有最高结合。在图31C中,如与剂量前样品相比较,在IMPRIME PGG剂量后血清中通过ELISA测量的C5a的增加倍数测量补体活化。仅在对应于IVIG输注的患者样品中观察到C5a水平中的2倍增加。

[0098] 本文描述的方法可以鉴定其最可能获益于治疗方案的个体,所述治疗方案包括 $\beta$ -葡聚糖例如IMPRIME PGG的施用。因此,测定可以允许医务人员更好地定制对个体的治疗处理,至少部分基于受试者响应包括 $\beta$ -葡聚糖的疗法的可能性。测定可以用于筛选用于包括在临床研究中的个体,以更好地限定各个受试者群体。

[0099] 术语“和/或”意指所列出元件中的一个或全部或者所列出元件中的任何两个或更多的组合;当这些术语在说明书和权利要求中出现时,术语“包括”及其变化不具有限制性含义;除非另有说明,否则“一个”、“一种”、“该/所述”和“至少一个/种”可互换使用,并且意指一个/种或多于一个/种;并且通过终点的数目范围叙述包括在该范围内的包含的所有数目(例如1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0100] 在前述说明书中,为清楚起见,特定实施方案可以单独描述。除非另有明确说明特定实施方案的特点与另一个实施方案的特点不相容,否则某些实施方案可以包括与一个或多个实施方案结合的本文描述的相容性特点的组合。

[0101] 对于包括不连续步骤的本文公开的任何方法,步骤可以以任何可行次序进行。并且,适当时,两个或更多个步骤的任何组合可以同时进行。

[0102] 本发明通过下述实施例进行举例说明。应当理解特定实施例、材料、量和程序根据如本文阐述的本发明的范围和精神广泛加以说明。

## 实施例

### [0103] 实施例1

Costar通用结合板用在纯净水中以1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IMPRIME PGG(Biothera,Eagan,MN)以每孔50  $\mu\text{L}$ 进行包被,并且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。包被的板随后在室温下暴露在 $>1500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 的高强度紫外线共5分钟,并且在室温下第二次暴露于紫外线五分钟之前,置于50 $^{\circ}\text{C}$ 强制通风烘箱中直至干燥。板在用牛血清白蛋白(BSA)的0.5%溶液封闭大于30分钟之后,用洗涤缓冲液(具有0.05% Tween-20的磷酸盐缓冲盐水[PBS])洗涤。每个测定运行包括两块测定板。每块板包括通过系列稀释参考人血清制备的校准曲线。板还包括与参考血清同样稀释的四

个测试血清样品。用于校准曲线和血清样品的稀释系列以1:400稀释度开始,并且以系列1:2稀释继续至1:51,200的最低稀释度。稀释在洗涤缓冲液中进行。参考血清的1:50稀释度用作曲线上的最高锚定点。参考和血清样品的每个稀释度在两块板各自的重复孔中进行评估。

[0104] 样品在测定板上在室温下温育90分钟,以允许人IgG与板结合的IMPRIME PGG结合。在温育后,孔用洗涤缓冲液进行洗涤,并且酶标记的二抗(辣根过氧化物酶缀合的亲和力纯化的山羊抗人IgG、Fc $\gamma$ 特异性抗体)在孔中进行温育,以与IMPRIME PGG抗原结合的人IgG结合。在用洗涤缓冲液洗涤之前,允许二抗温育90分钟。在从孔中去除洗涤缓冲液之后,使过氧化物酶底物在孔中进行温育,并且在5分钟显色时用~1M磷酸猝灭显色。使用微量滴定板阅读器测量在450 nm处的光密度,并且计算来自重复孔的平均值。

[0105] 结果以两种方式进行计算:

1)滴度:滴度测定为其光密度读数大于或等于0.1 OD的样品的最大稀释因子。

[0106] 2)RAU - 160的任意值指定至参考血清(160相对抗体单位(RAU/mL))。因此,测定方法中的1:400稀释度导致400 mRAU/mL的值作为校准曲线上的最高点。稀释值和相应的RAU值在表10中陈述。

[0107] 表10

稀释度	平均OD	计算的浓度(mRAU/ml)	计算的浓度 $\times$ 稀释度	除以1000 = 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		

[0108] 关于样品和对照的RAU值用4参数拟合进行计算,使用参考人血清稀释系列作为校准曲线。通过由校准曲线内插,随后校准稀释度,来计算对于落入校准曲线的线性部分内的每个样品稀释度以mRAU表示的浓度。随后,由那些回复计算的多个稀释度获得每个样品的平均浓度。

[0109] 结果显示于图1A中。

[0110] 实施例2

IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体“黄金参考标准品”由商购可得的95%纯的总IgG和IgM级分进行纯化,所述总IgG和IgM级分衍生自合并的正常人血浆(Athens Research and Technology, Athens, GA)。使IgG和IgM级分经过IMPRIME PGG亲和柱,浓缩且使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)就纯度进行表征。参见图22。“黄金参考标准品”的系列稀释通过下文描述的用于生成标准曲线的方法用于生成校准曲线。

[0111] 用通过针对“黄金参考标准品”校准测定的抗 $\beta$ -葡聚糖浓度,由合并的正常人血清制备测定工作参考标准品。测定对照由来自所选择的各个受试者的正常人血清进行制备,所述受试者具有接近工作标准曲线上的限定位置的抗 $\beta$ -葡聚糖浓度。

[0112] Maxisorp平底96孔板(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)用在D-PBS (Corning Inc., Tewksbury, MA)中以3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IMPRIME PGG以每孔100  $\mu\text{L}$ 进行包被。将板覆盖,置于紧密密封的拉链封口塑料袋中,并且在4°C下温育最少15小时且最多24小时。包被的板随后取出用于冷藏,抽吸且用洗涤缓冲液(在PBS中的0.05%聚山梨醇酯20(Alfa Aesar, Ward Hill, MA))洗涤三次。在最终抽吸后,每块包被的板完全包裹在纸巾中,并且在纸巾垫上用力拍打三次,以去除剩余液体。板随后在工作台上用250  $\mu\text{l}$ /孔的StabilCoat Immunoassay Stabilizer(SurModics, Inc., Eden Prairie, MN)封闭1至3小时。在封闭后,将板抽吸以去除内容物且包裹在纸巾中。重复如上所述的去除剩余液体的拍打程序。将板打开且允许在工作台上干燥最少45分钟且最高达三小时。

[0113] 每个测定包括通过系列稀释工作参考样品制备的工作标准曲线。工作参考样品的稀释系列显示于表11和12中。测定还包括1:20、1:400和1:1600稀释的对照和测试样品。稀释在洗涤缓冲液中进行。参考和血清样品的每个稀释度一式三份进行评估。

[0114] 样品在测定板上在室温下温育45分钟在设为310 rpm的轨道直径2 mm的定轨振荡器上进行温育,以允许人IgG和/或IgM与板结合的IMPRIME PGG结合。在温育后,孔用洗涤缓冲液进行洗涤,并且酶标记的二级抗体(辣根过氧化物酶缀合的亲和力纯化的山羊抗人IgG或IgM、Fc  $\gamma$  特异性抗体)在孔中进行温育,以与IMPRIME PGG抗原结合的人IgG或IgM结合。在用洗涤缓冲液洗涤之前,允许二级抗体温育45分钟。在从孔中去除洗涤缓冲液之后,使过氧化物酶底物在孔中进行温育,并且在五分钟显色时用~1M磷酸猝灭显色。使用微量滴定板阅读器测量在450 nm处的光密度,并且计算来自重复孔的平均值。

[0115] 通过针对由工作参考样品稀释生成的工作标准曲线校准样品吸光度,来确定IgG和IgM抗 $\beta$ -葡聚糖抗体浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。关于校准曲线的稀释度值和相应的浓度在表11和12中陈述。

[0116] 表11. 用于标准曲线的IgG稀释度

稀释度	平均OD	平均计算的浓度( $\text{ng}/\text{ml}$ )
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

[0117] 表12. 用于标准曲线的IgM稀释度

稀释度	平均OD	平均计算的浓度( $\text{ng}/\text{ml}$ )
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
---------	-------	-----

[0118] 衍生自表11和12的数据的标准曲线分别显示于图1B和1C中。一旦通过标准曲线确定测试样品的抗体浓度,浓度就可以通过将平均计算的浓度乘以稀释因子并且随后除以1000而转换为 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

#### [0119] 实施例3

在含有肝素的管(BD Vacutainer sodium heparin tubes, Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ)中收集来自健康志愿者的全血(WB)。在研究中使用的IVIG是Privigen, 以100 mg/mL的人多价免疫球蛋白的10%溶液(CSL Behring, King of Prussia, PA)。样品掺料有在PBS中至2.5 mg/mL、5 mg/mL和10 mg/mL的最终浓度的IVIG稀释物,连同仅PBS对照。随后制备IVIG掺料血液的等分试样用于IgG RAU测定、以及补体途径活化的IMPRIME PGG诱导、嗜中性粒细胞结合(下文实施例4中所述)、活化标记物表达和IL-8生产测定。

[0120] IVIG掺料的WB的等分试样在37°C下与以10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IMPRIME PGG、或作为对照的等体积的柠檬酸盐缓冲液(11 mM NaCitrate, 140 mM NaCl, pH 6.3)一起温育30分钟。在温育后,在加入5 $\mu\text{L}$  BfD IV小鼠抗 $\beta$ -葡聚糖IgM抗体/100  $\mu\text{L}$  WB,并且在室温下温育15分钟之前,将细胞用PBS洗涤两次。样品随后再次用PBS洗涤两次,并且用含有用于表面标记物的抗体以及用于检测BfD IV结合的抗小鼠IgM的抗体混合物染色。使细胞在室温下温育30分钟,随后加入2 mL FACS/Lyse(eBiosciences, San Diego, CA),并且在室温下温育15分钟。细胞用PBS洗涤两次,之后用1%多聚甲醛固定且在LSRII流式细胞仪上分析。FACS数据通过FlowJo软件进行分析。

[0121] 结果显示于图2-7中。

#### [0122] 实施例4

在WB中的IMPRIME PGG结合和细胞表面上的葡聚糖结合的检测基本上如上文实施例2中所述执行。

[0123] 结果显示于图8-13、23-30、31A和31B中。

#### [0124] 实施例5

如实施例3中所述,在含有肝素的管中收集来自健康志愿者的全血(WB)。将管充分混合且贮存于冰上,直至准备使用时。WB的等分试样与以10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 最终浓度的IMPRIME PGG、或者与等体积的PBS或柠檬酸盐缓冲液一起温育。以10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的完整葡聚糖颗粒(WGP)用作阳性对照。经处理的WB在37°C下在加湿5% CO<sub>2</sub>温箱中温育30分钟或120分钟。在每个时间点结束时立即将WB在4°C下以2000  $\times$  rpm(或1150  $\times$  g)离心10分钟。收集上清液(血浆),并且转移至1.5 mL eppendorf管且保持在冰上。血浆如下述部分中所述在补体调节研究的相同日使用,或在-70°C下冷冻直至准备使用时。

[0125] 补体C4a调节研究。MicroVue C4a EIA试剂盒(Quidel Corp., San Diego, CA)根据厂商说明书用于血浆中的C4a定量。简言之,将标准品、对照和1:20稀释的测试样本(未处理的或各种处理的血浆制剂)加入用特异性抗C4a单克隆抗体预包被的微量测定孔中。在室温下温育60分钟后,将板洗涤一个洗涤循环。将辣根过氧化物酶(HRP)缀合的鼠抗人C4a单克隆抗体加入每个测试孔中,并且在室温下温育另外60分钟。在温育后,在加入生色酶底物TMB以起始酶促反应之前,将板洗涤一个洗涤循环。使板在室温下温育60分钟,并且随后用所提供的终止溶液猝灭酶反应。颜色强度在450 nm处进行分光光度法测量。由用所提供的

标准品生成的标准曲线计算测试样本中存在的C4a浓度,并且使用4参数回归分析进行分析。

[0126] 结果显示于图14中。

[0127] *补体C5a调节研究*。MicroVue C5a EIA试剂盒(Quidel Corp., San Diego, CA)根据厂商说明书用于血浆中的C5a定量。简言之,将标准品、对照和1:60稀释的测试样本(未处理的或各种处理的血浆制剂)加入用特异性抗C5a单克隆抗体预包被的微量测定孔中。在室温下温育60分钟后,将板洗涤一个洗涤循环。将辣根过氧化物酶(HRP)缀合的鼠抗人C5a单克隆抗体加入每个测试孔中,并且在室温下温育另外60分钟。在温育后,在加入生色酶底物TMB以起始酶促反应之前,将板洗涤一个洗涤循环。使板在室温下温育60分钟,并且随后用所提供的终止溶液猝灭酶反应。颜色强度在450 nm处进行分光光度法测量。由用所提供的标准品生成的标准曲线计算测试样本中存在的C5a浓度,并且使用4参数回归分析进行分析。

[0128] 结果显示于图15和图31C中。

[0129] *补体Sc5b-9调节研究*。MicroVue Sc5b-9 Plus EIA试剂盒(Quidel Corp., San Diego, CA)根据厂商说明书用于测量血浆样本中存在的Sc5b-9复合物的量。简言之,将标准品、对照和1:20稀释的测试样本(未处理的或各种处理的血浆制剂)加入用特异性抗Sc5b-9单克隆抗体预包被的微量测定孔中。使板在室温下温育60分钟,随后为五次洗涤。随后使板在室温下与所提供的SC5b-9 Plus Conjugate一起温育30分钟,所述SC5b-9 Plus Conjugate含有对于SC5b-9特异性的辣根过氧化物酶缀合的鼠抗人Ab。随后将板洗涤五次,在室温下与生色酶底物TMB一起温育60分钟,以起始酶促反应,并且随后用终止溶液猝灭。测量OD<sub>450</sub>。使用线性回归分析由所生成的标准曲线计算结果。

[0130] 结果显示于图16中。

[0131] *细胞表面补体受体的调节*。IMPRIME PGG与WB的结合以10 µg/mL和100 µg/mL以及在30分钟和120分钟时进行研究。在结合后,细胞用PBS洗涤两次,并且随后在室温下与CD88-APC、CD35-PE和CD11b-PB(BioLegend)一起温育30分钟。通过在室温下与2 mL FACS/Lyse(eBiosciences, San Diego, CA)一起温育15分钟来裂解RBC。细胞用PBS洗涤两次,用1%多聚甲醛固定且在LSRII流式细胞仪上进行分析。FACS数据通过FlowJo软件进行分析。

[0132] 结果显示于图17和图18中。

[0133] 实施例6

IMPRIME PGG与WB的结合以10 µg/mL和100 µg/mL以及在30分钟和120分钟时进行研究。在结合后,细胞用PBS洗涤两次,并且随后在室温下与CD62L-PB(BioLegend)一起温育30分钟。通过在室温下与2 mL FACS/Lyse(eBiosciences, San Diego, CA)一起温育15分钟来裂解RBC。细胞用PBS洗涤两次,用1%多聚甲醛固定且在LSRII流式细胞仪上进行分析。FACS数据通过FlowJo软件进行分析。

[0134] 结果显示于图19中。

[0135] 实施例7

如实施例3中所述,在含有肝素的管中收集来自健康志愿者的全血(WB)。WB的等分试样与以10 µg/mL或100 µg/mL最终浓度的IMPRIME PGG一起温育,或者用作为基线对照的PBS或柠檬酸盐缓冲液、或者作为阳性对照的100 ng/mL TLR4激动剂LPS(大肠杆菌(*E. coli*))

菌株0127:B8, Sigma, St. Louis, MO)进行处理。培养物在37°C下在加湿5% CO<sub>2</sub>温箱中进行温育。在20-24小时后,将WB以1600 *x rpm*离心10分钟,并且收集血浆上清液。将样品贮存于-80°C下的96孔Matrix贮存板(Matrix Technologies, Hudson, NH)中,直至准备使用时。通过根据制造商的说明书执行Human CXCL8/IL-8 ELISA(R&D Systems, Catalog# D8000C, Minneapolis, MN),来确定IMPRIME PGG或对照处理的WB的血浆样品中IL-8的存在。

[0136] 结果显示于图20中。

#### [0137] 实施例8

*Sc5b-9*调节研究。根据厂商说明书使用MicroVue Sc5b-9 Plus EIA试剂盒(Quidel Corp., San Diego, CA)测量血浆样本中存在的Sc5b-9复合物的量。简言之,将标准品、对照和1:20稀释的测试样本(未处理的或各种处理的血浆制剂)加入用特异性抗Sc5b-9单克隆抗体预包被的微量测定孔中。使板在室温下温育60分钟,随后为五次洗涤。随后使板在室温下与所提供的SC5b-9 Plus Conjugate一起温育30分钟,所述SC5b-9 Plus Conjugate含有对于SC5b-9特异性的辣根过氧化物酶缀合的鼠抗人Ab。随后将板洗涤五次,在室温下与生色酶底物TMB一起温育60分钟,以起始酶促反应,并且随后用终止溶液猝灭。测量OD<sub>450</sub>。

[0138] 使用线性回归分析由所生成的标准曲线计算结果。结果显示于图21中。

#### [0139] 实施例9

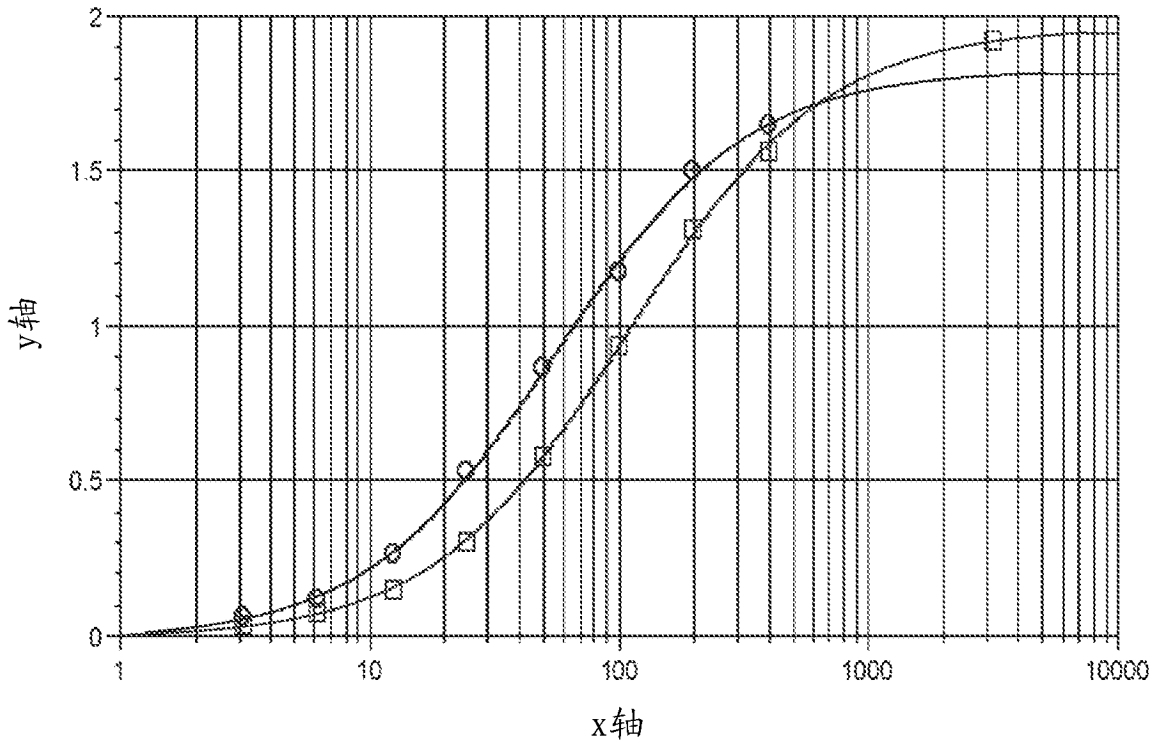
使用GraphPad Prism软件进行ROC曲线分析。结果显示于图27和28中。

[0140] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物,和可电子获得的材料(包括例如GenBank和RefSeq中的核苷酸序列提交,以及例如SwissProt、PIR、PRF、PDB中的氨基酸序列提交,以及来自GenBank和RefSeq中的注释编码区的翻译)的完全公开内容以其整体通过引入本文。在本申请的公开内容和引入本文作为参考的任何文件的公开内容之间存在任何不一致的情况下,以本申请的公开内容为准。前述详述和实施例仅为了清楚理解而给出。由其不应理解不必要的限制。本发明并不限于所示和所述的确切细节,因为对于本领域技术人员显而易见的变化将包括在由权利要求限定的本发明内。

[0141] 除非另有说明,否则表示说明书和权利要求中使用的组分数量、分子量等等的数目均应理解为在所有情况下由术语“约”进行修饰。相应地,除非另有相反说明,否则在说明书和权利要求中阐述的数目产生是近似值,其可以根据寻求通过本发明获得的所需特性而改变。最低限度以及并非作为限制权利要求范围的等价原则的尝试,每个数目参数应至少根据所报告的有效数字且通过应用普通四舍五入技术加以解释。

[0142] 虽然阐述本发明的广泛范围的数目范围和参数是近似值,但具体实施例中阐述的数值尽可能精确地报告。然而,所有数值固有地含有必然起因于在其各自的测试测量中发现的标准差范围。

[0143] 所有标题均为了读者方便,并且不应用于限制标题下的正文的含义,除非如此指明。



4参数拟合:  $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R <sup>2</sup>
○ 曲线#2 (样品1: 浓度相对于平均值)	-0.0168	1.14	55.4	1.82	0.999
□ 曲线#1 (标准品: 浓度相对于平均值)	-0.0118	1.11	109	1.96	1

加权: 固定的

图 1A

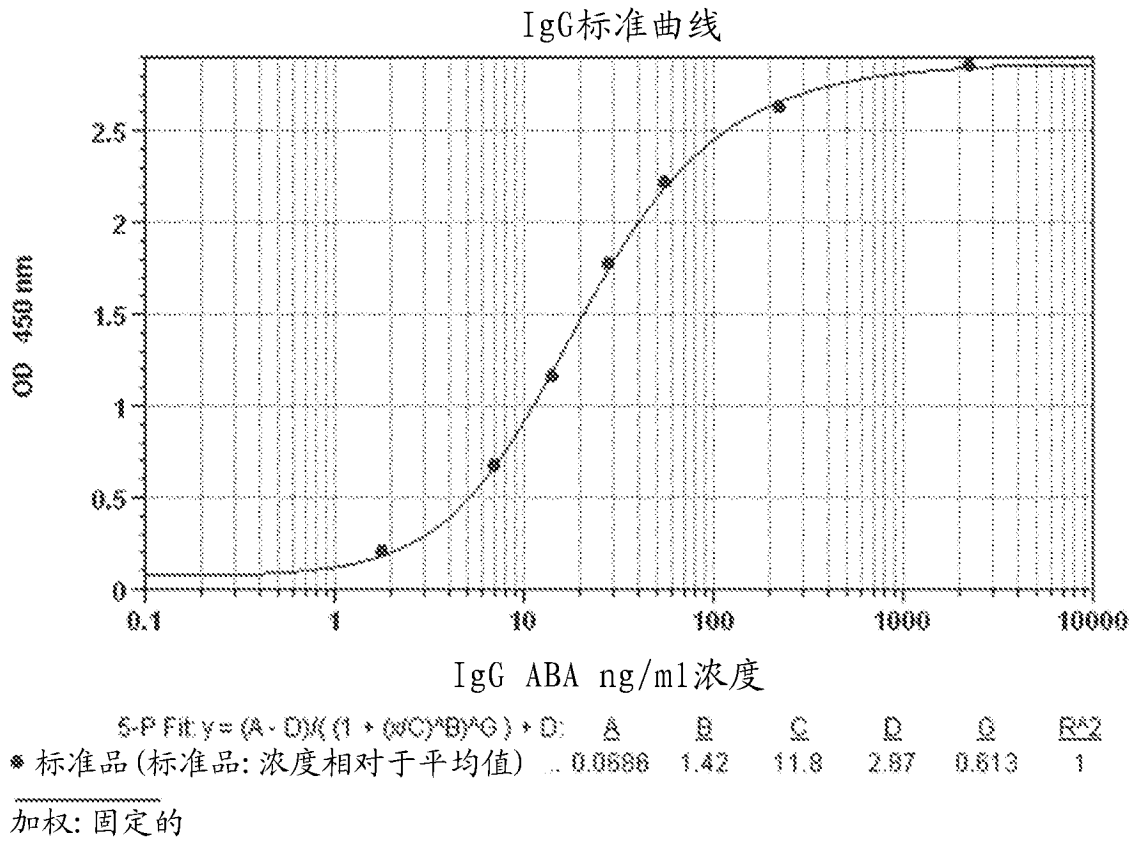
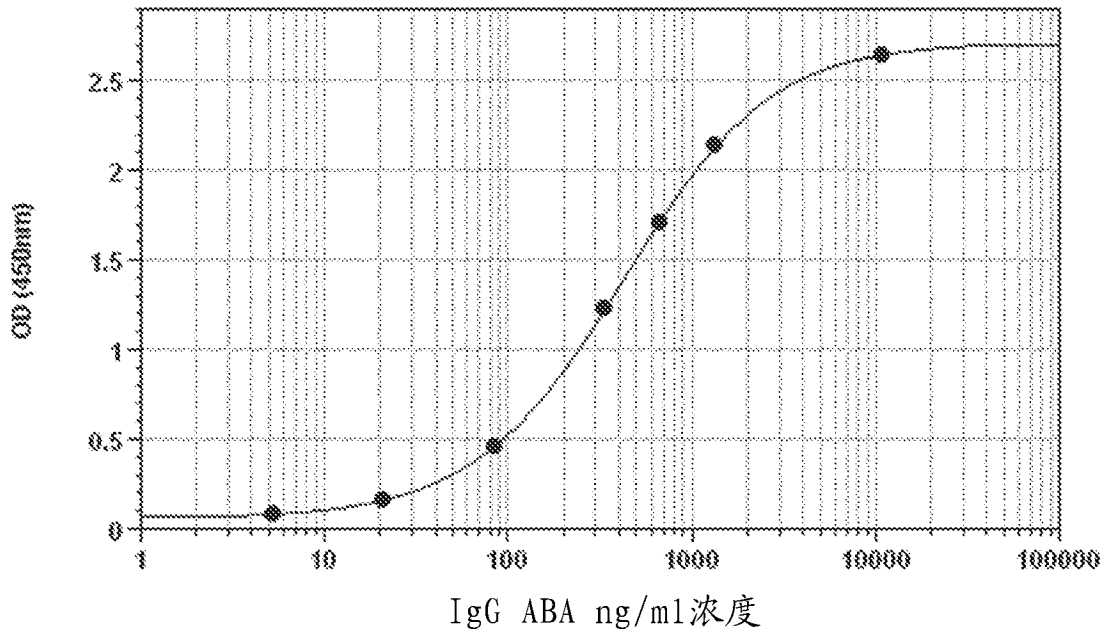


图 1B

IgG标准曲线



5-P Fit:  $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B)^G + D$ ; A: 2.6 B: 1.06 C: 479 D: 2.71 E: 1.09 R<sup>2</sup>: 1

● 标准品 (标准品: 浓度相对于平均值) ...

加权: 固定的

图 1C

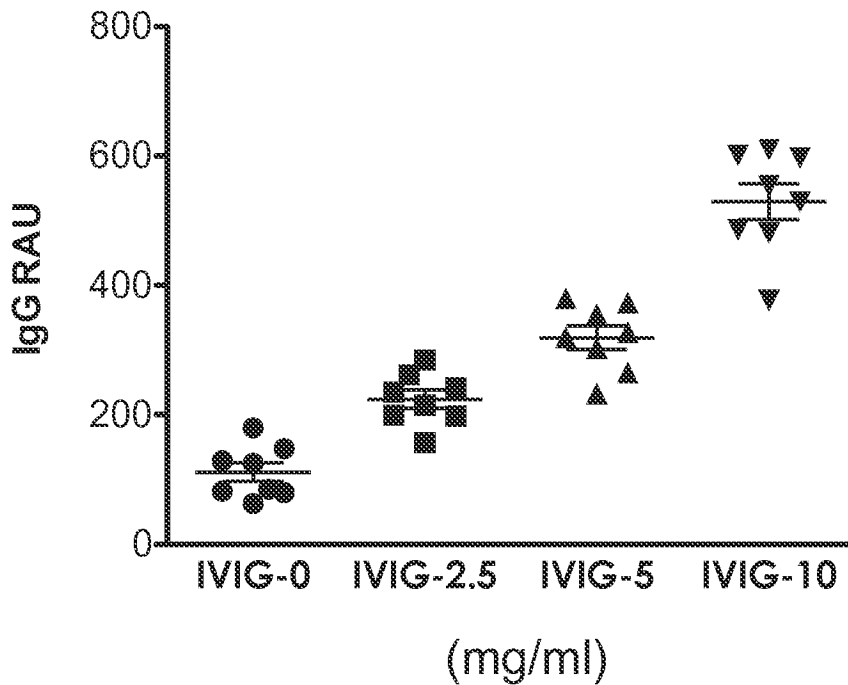


图 2

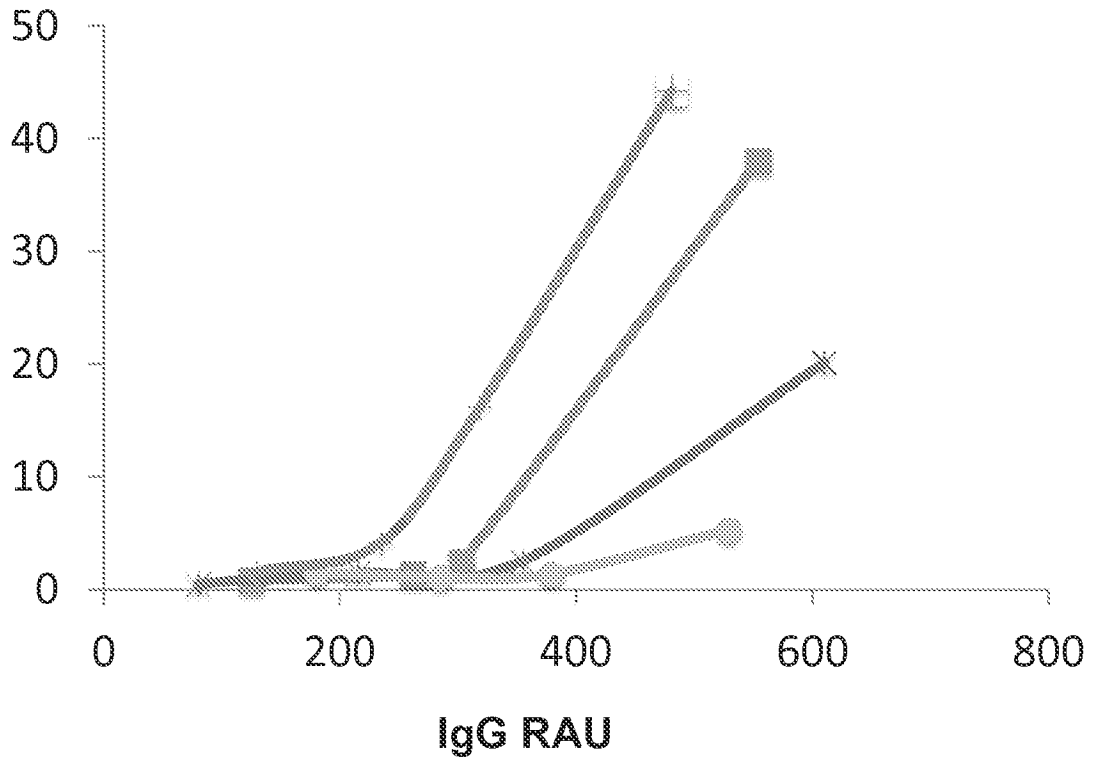


图 3

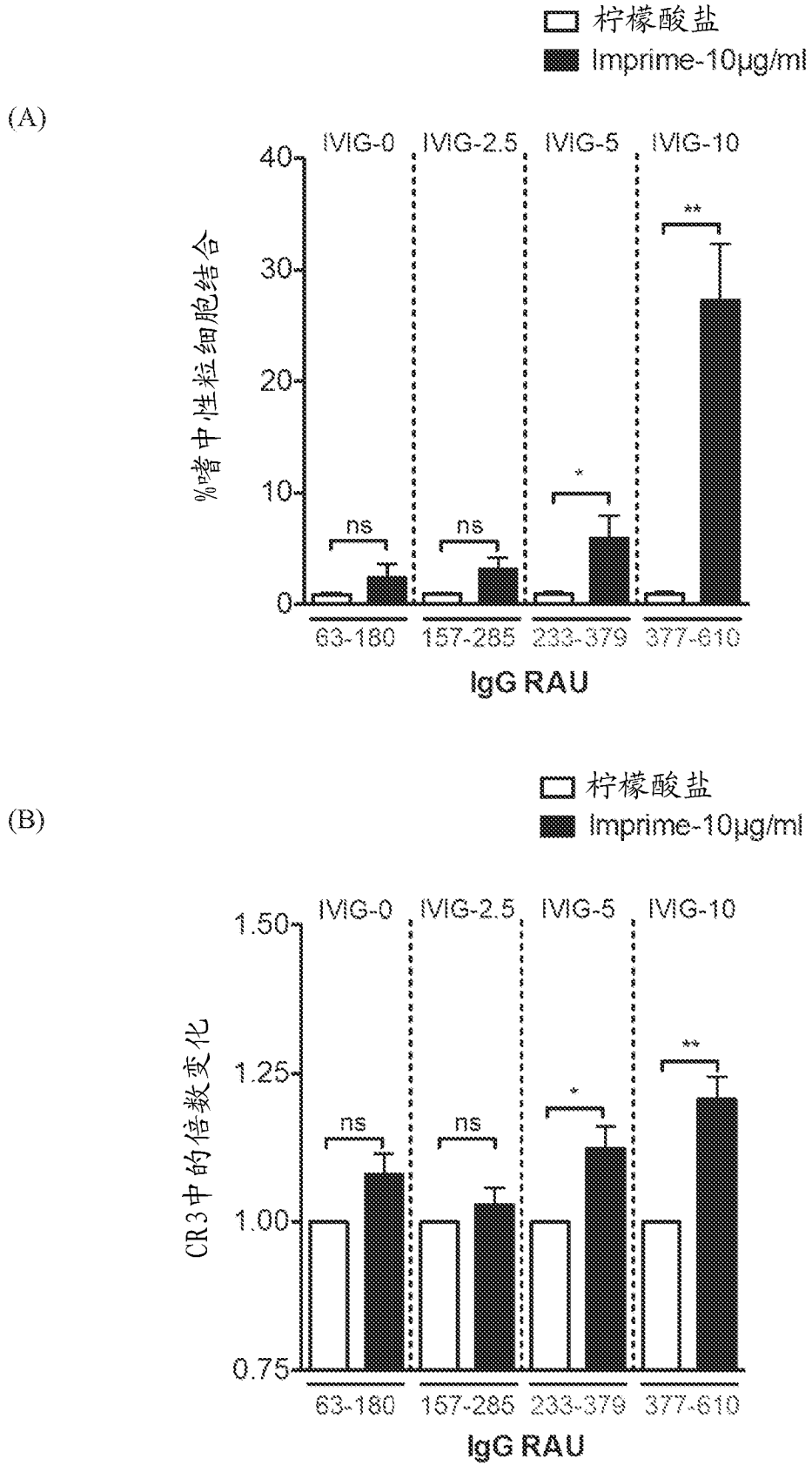


图 4

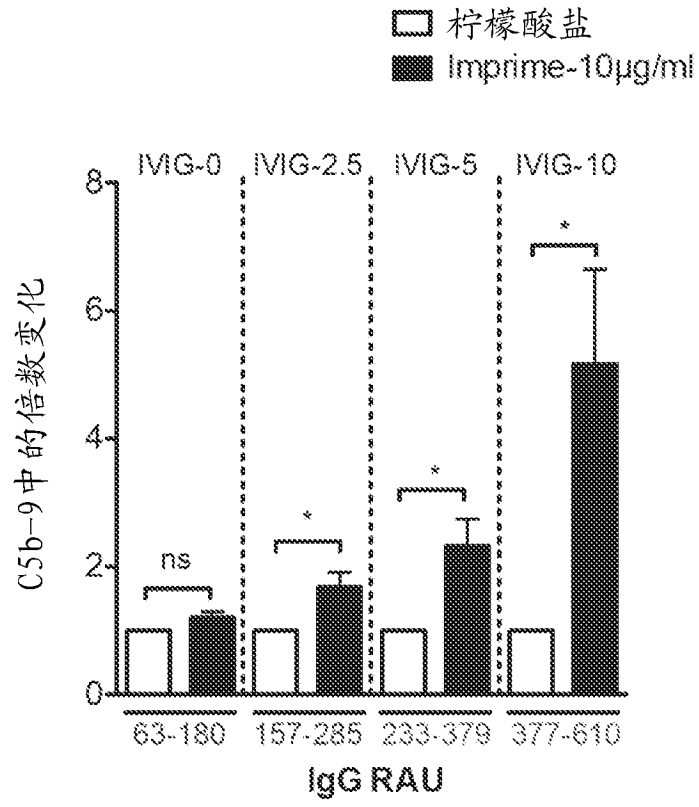


图 5

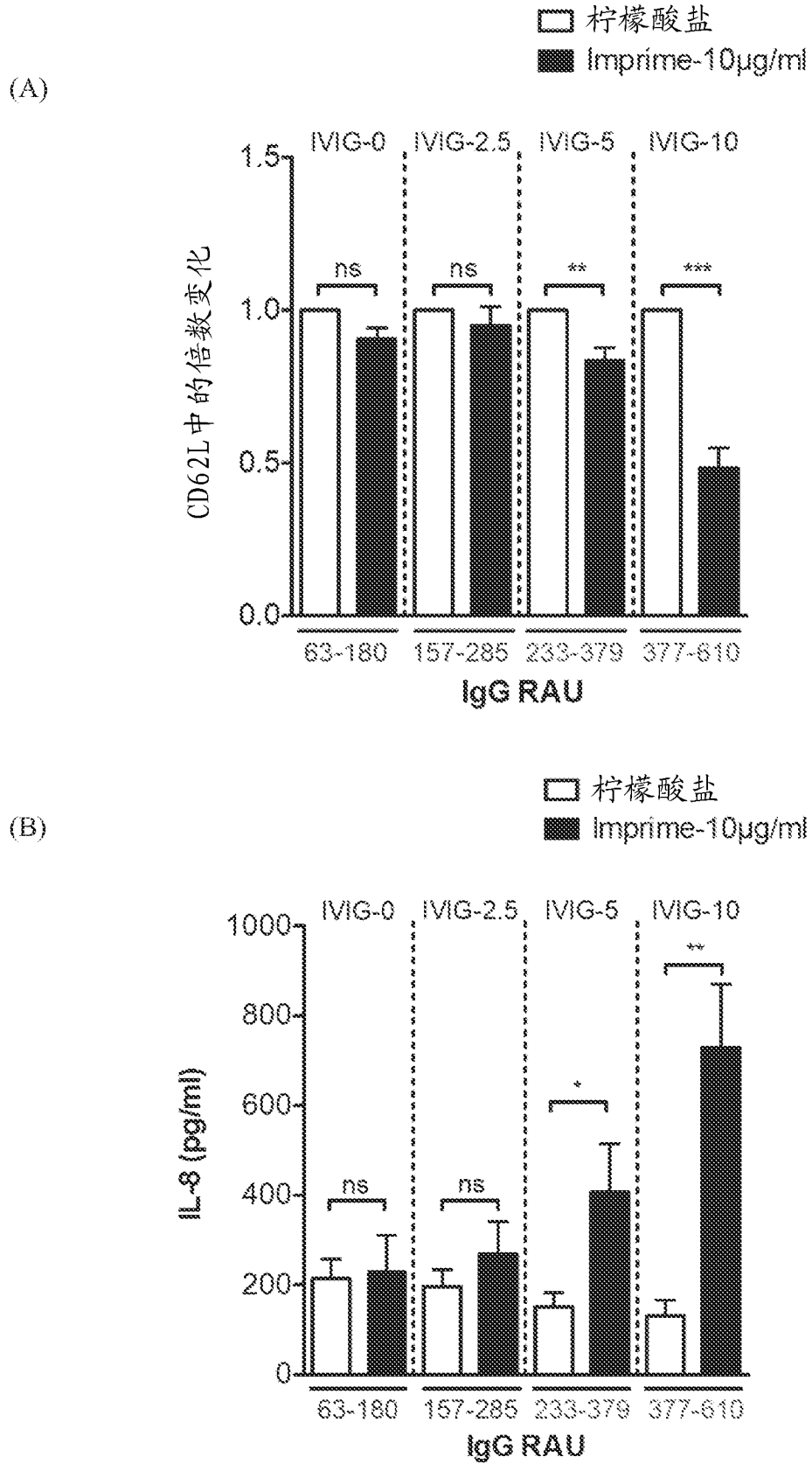


图 6

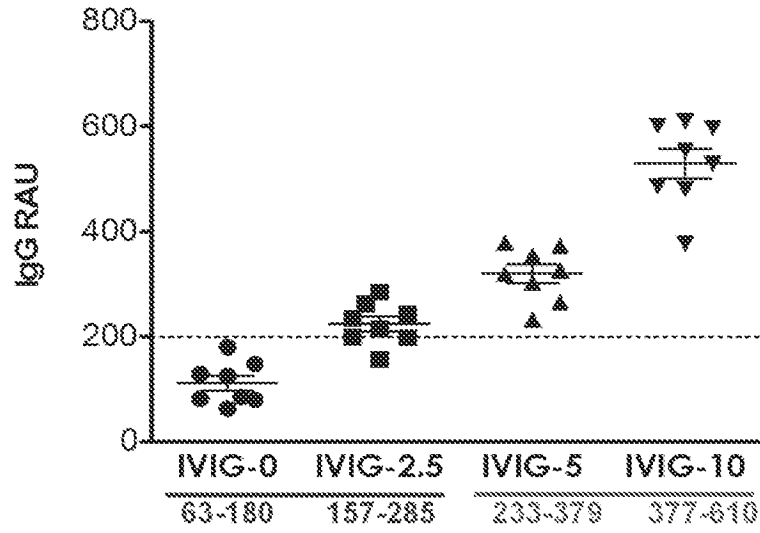


图 7

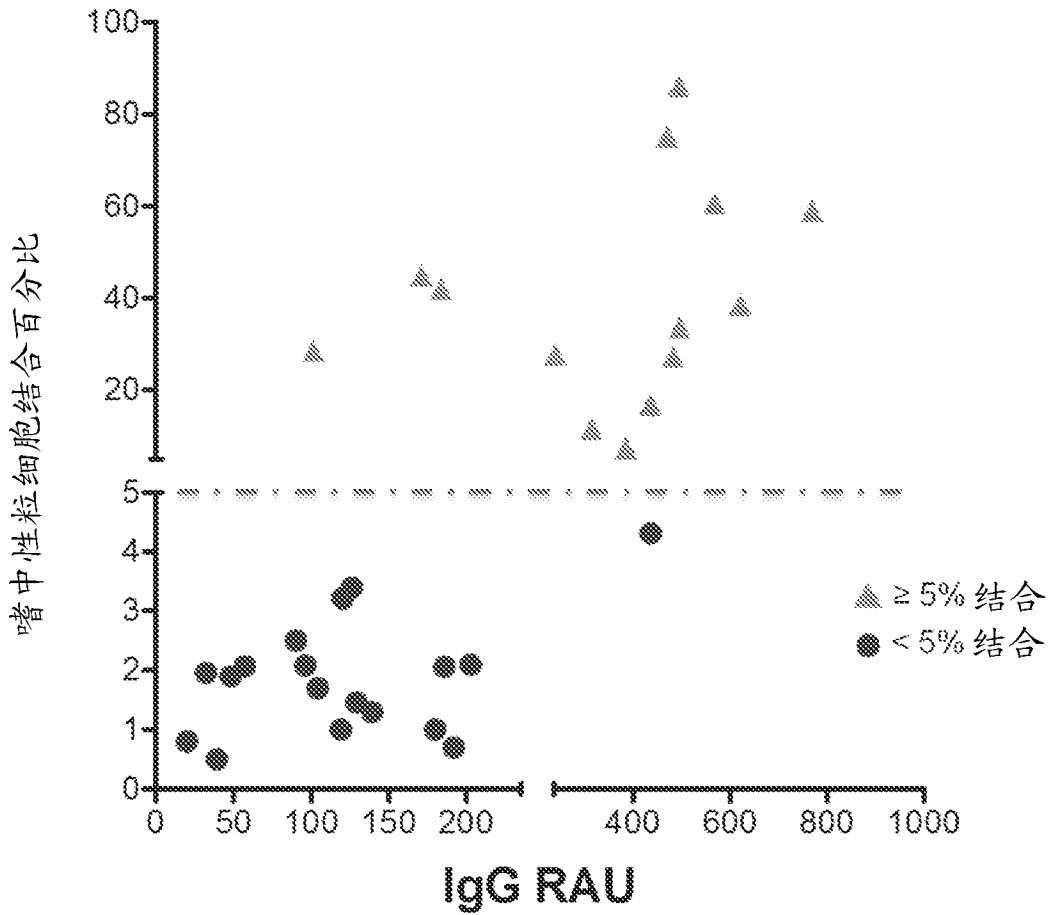


图 8

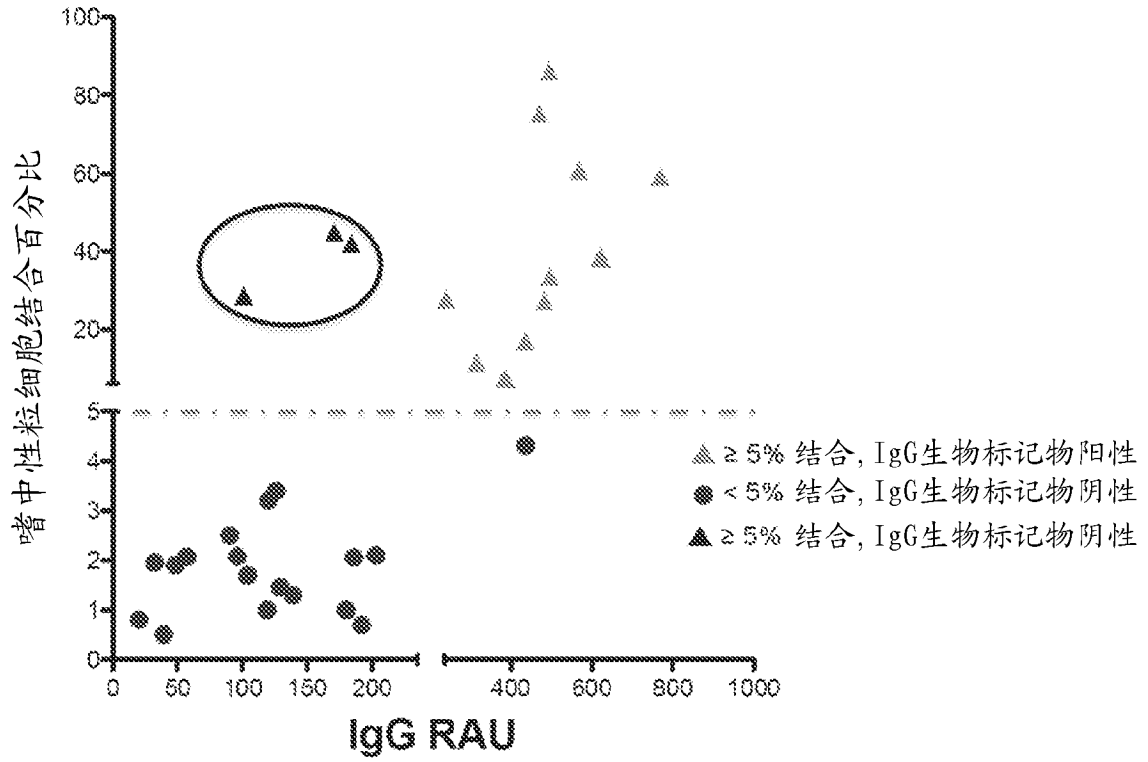


图 9

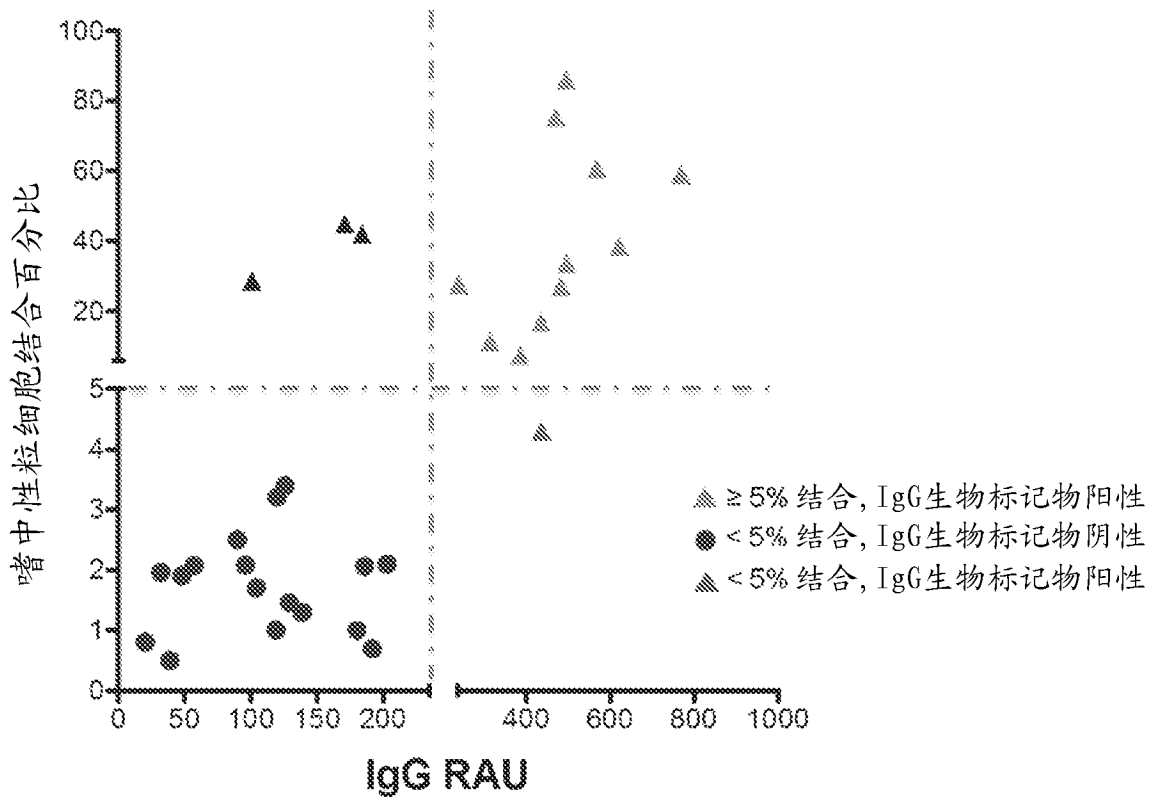


图 10

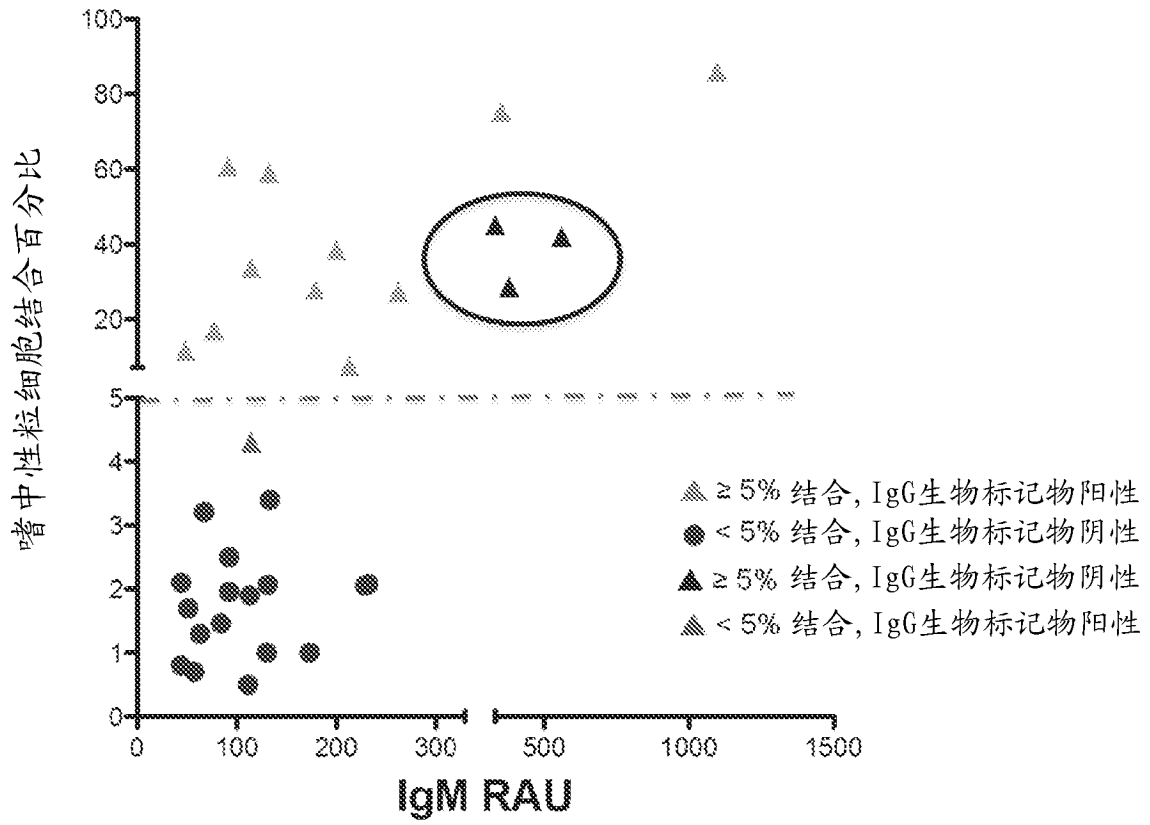


图 11

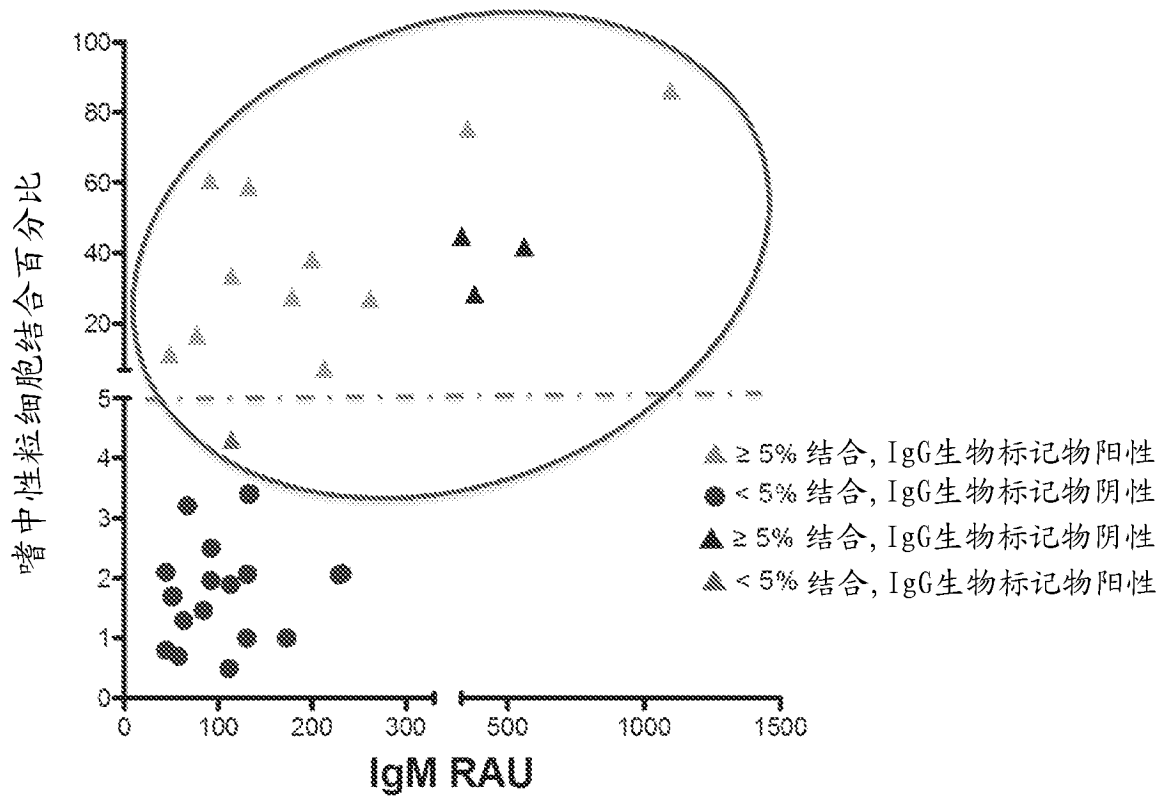


图 12

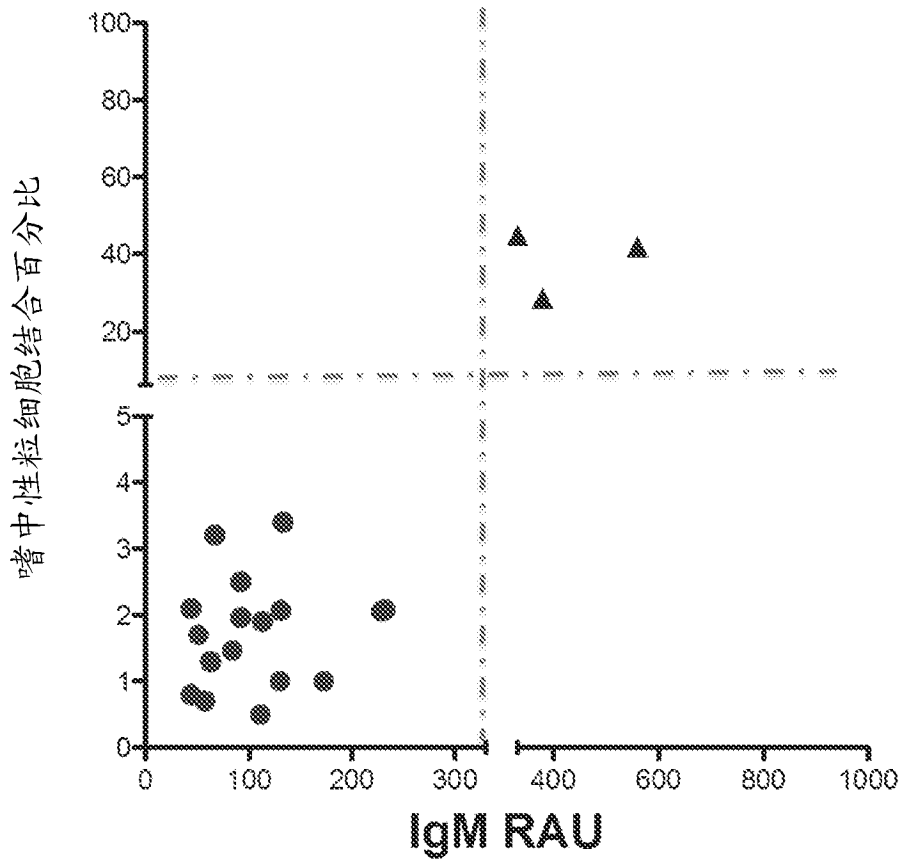


图 13

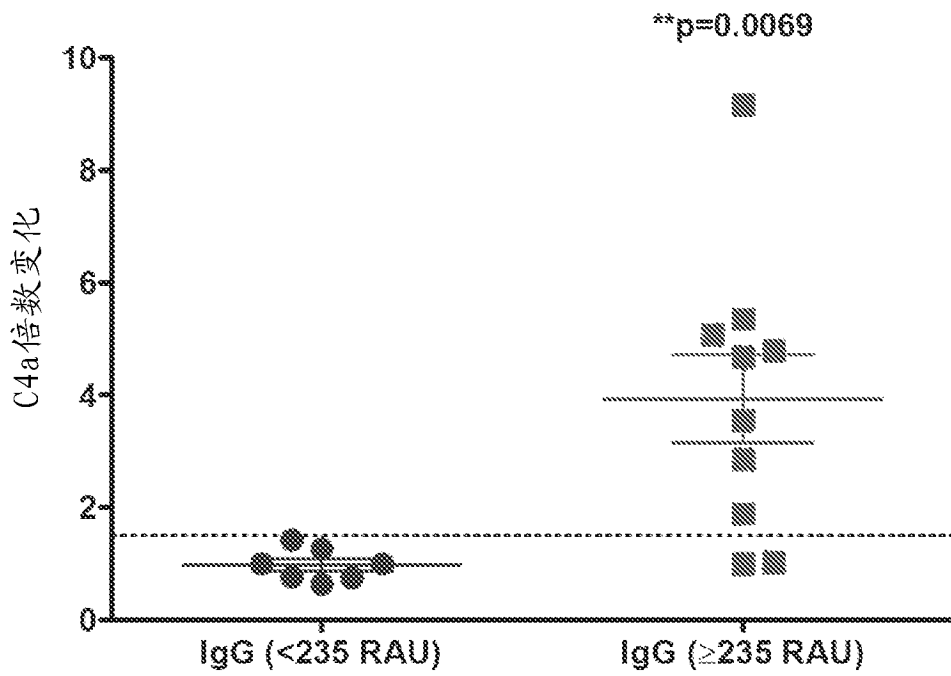


图 14



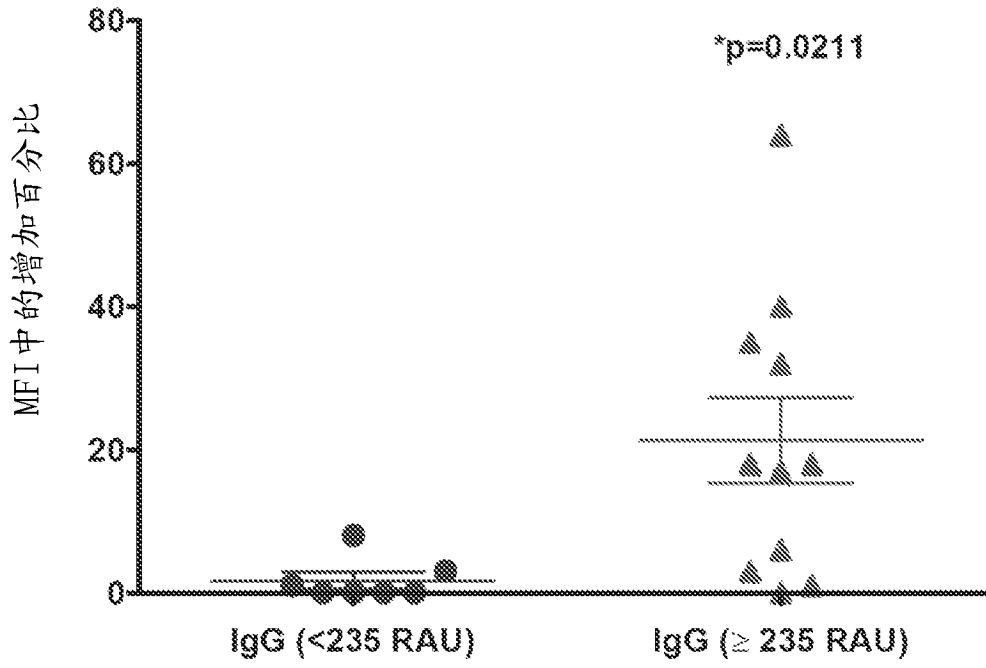


图 17

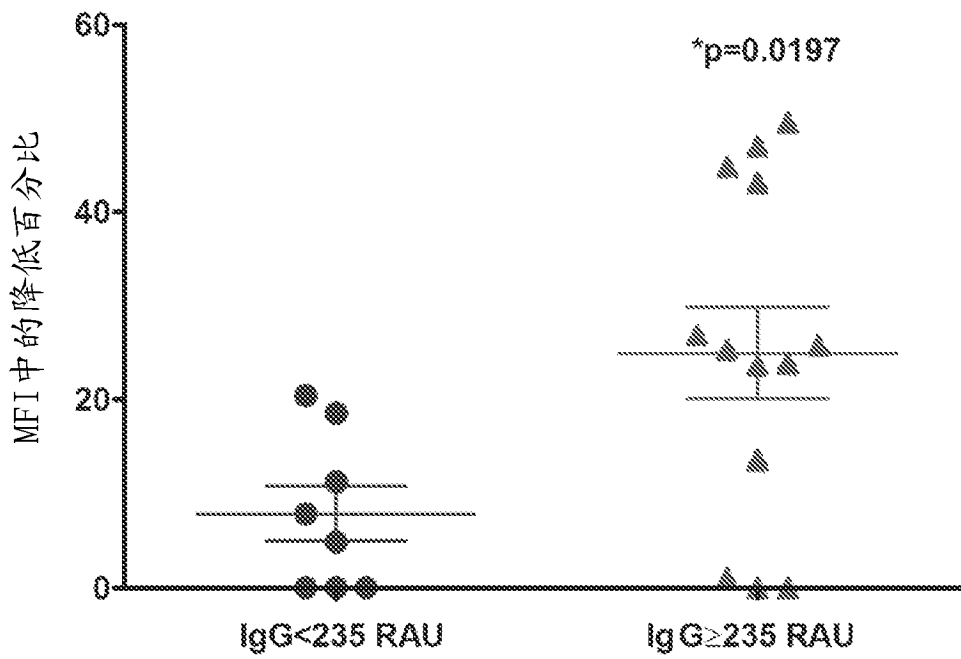


图 18



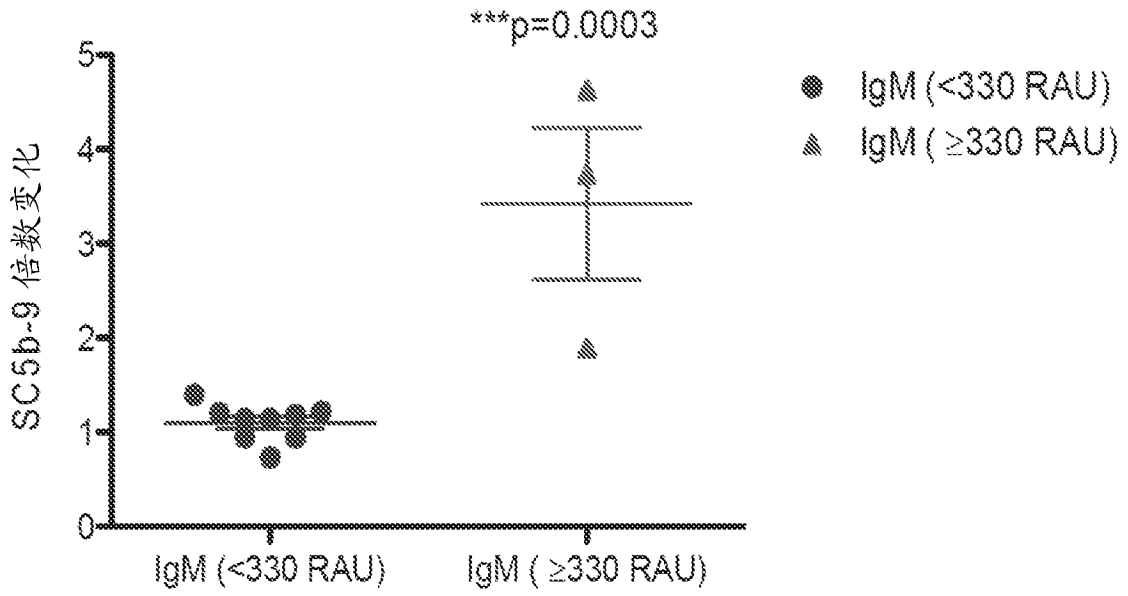


图 21

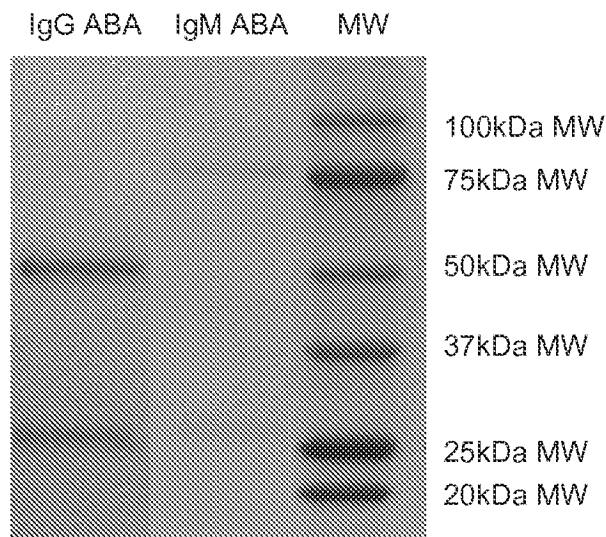


图 22

嗜中性粒细胞结合

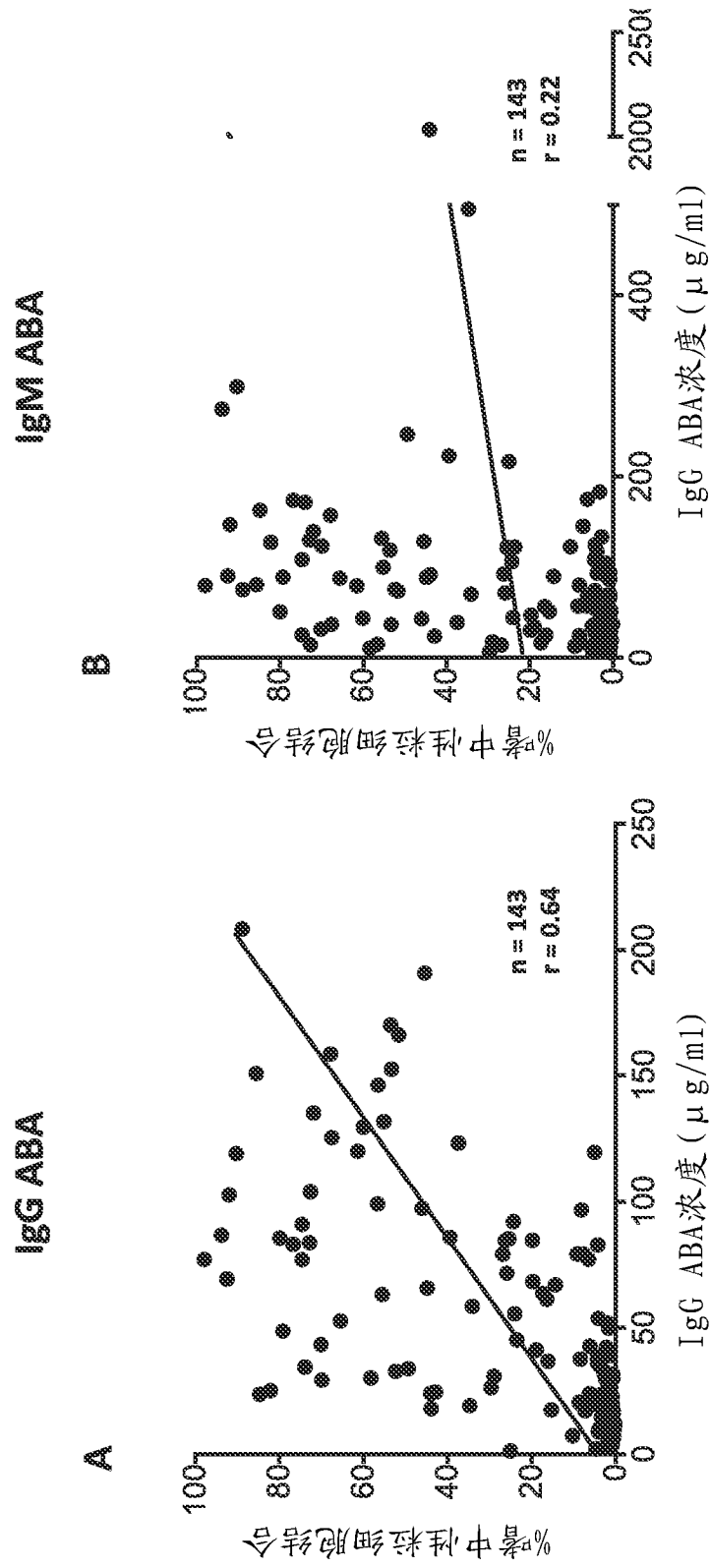


图 23

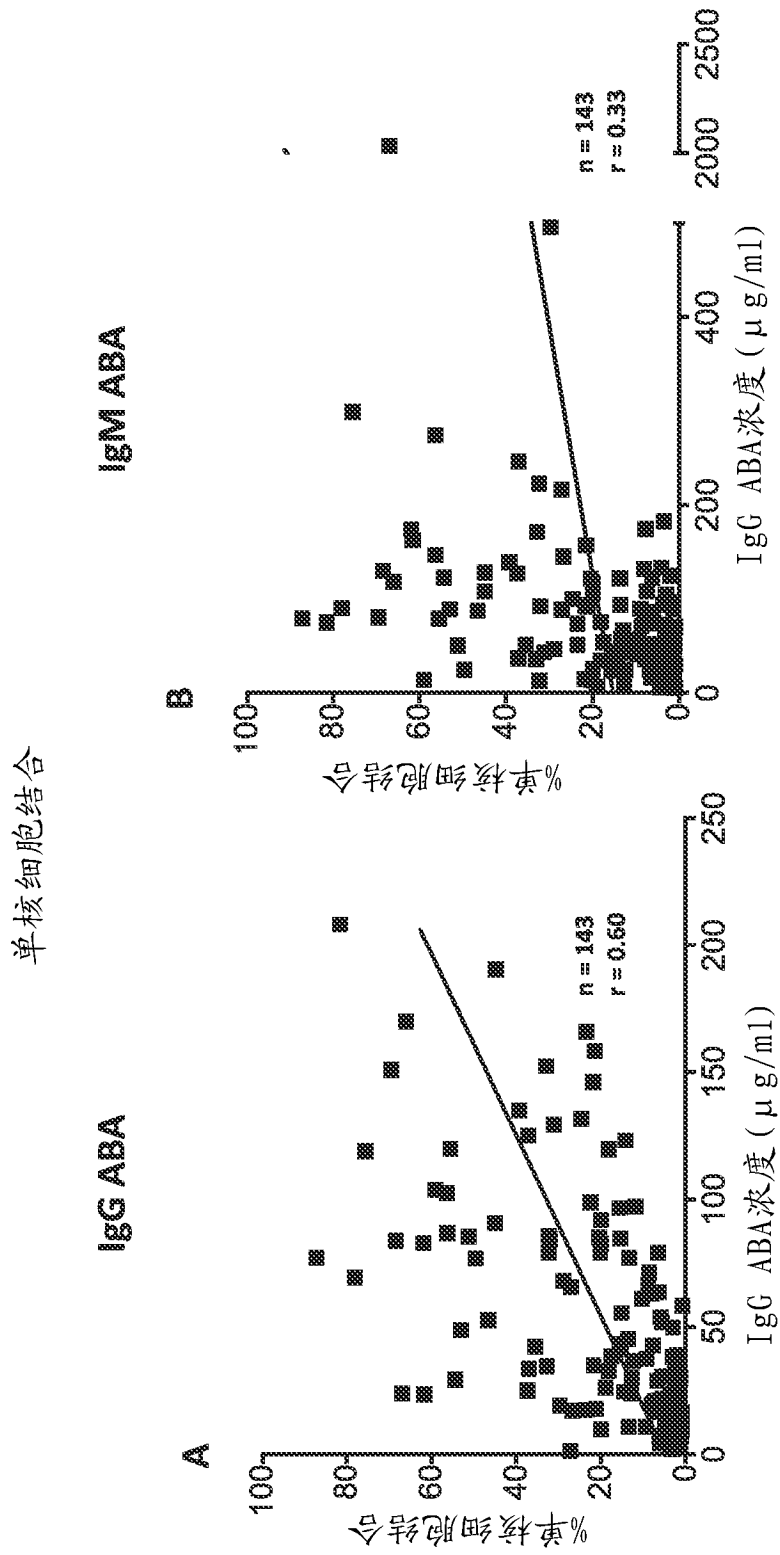


图 24

嗜中性粒细胞细胞结合

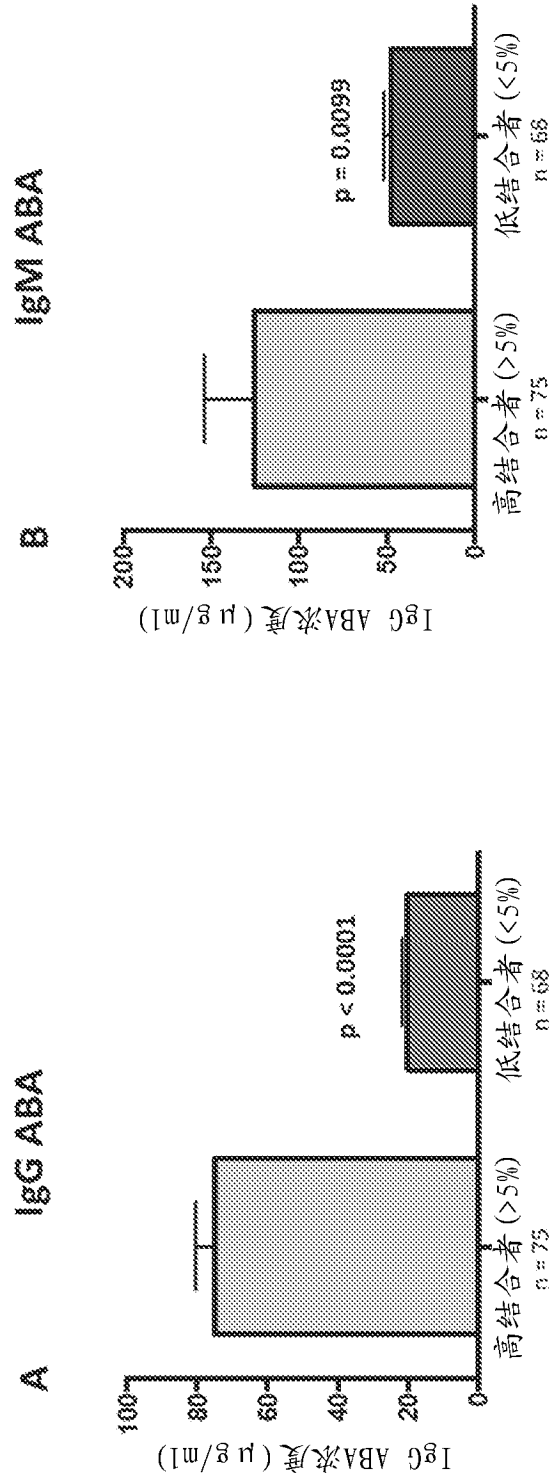


图 25

单核细胞结合

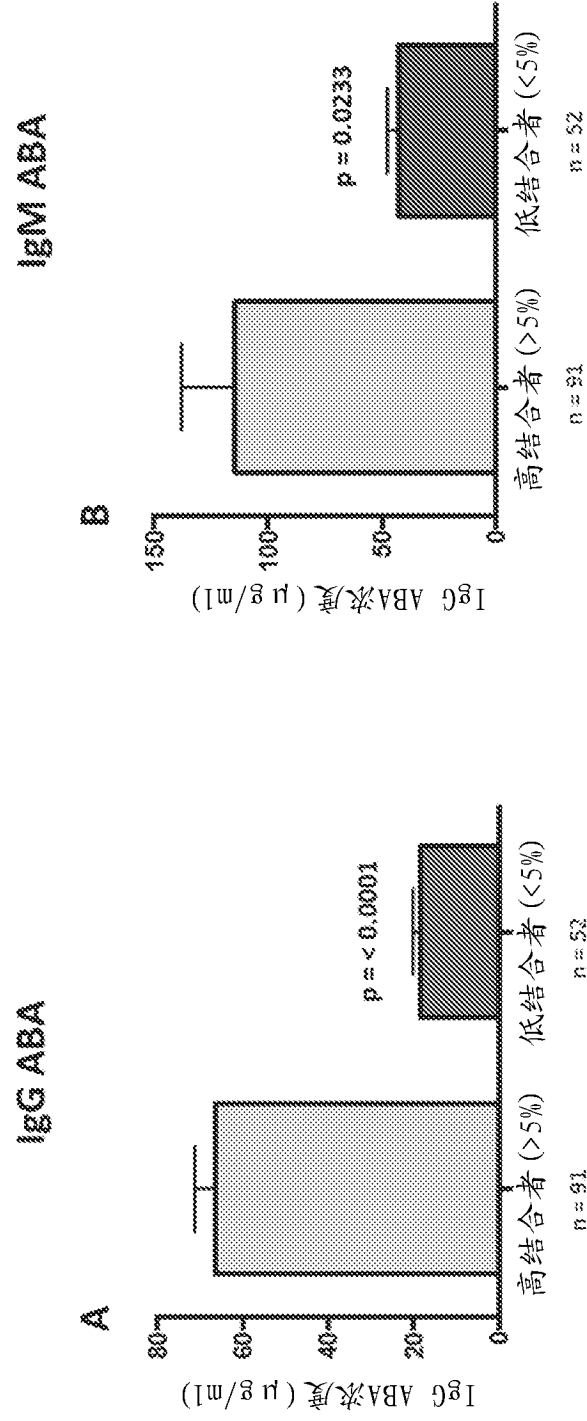


图 26

嗜中性粒细胞结合

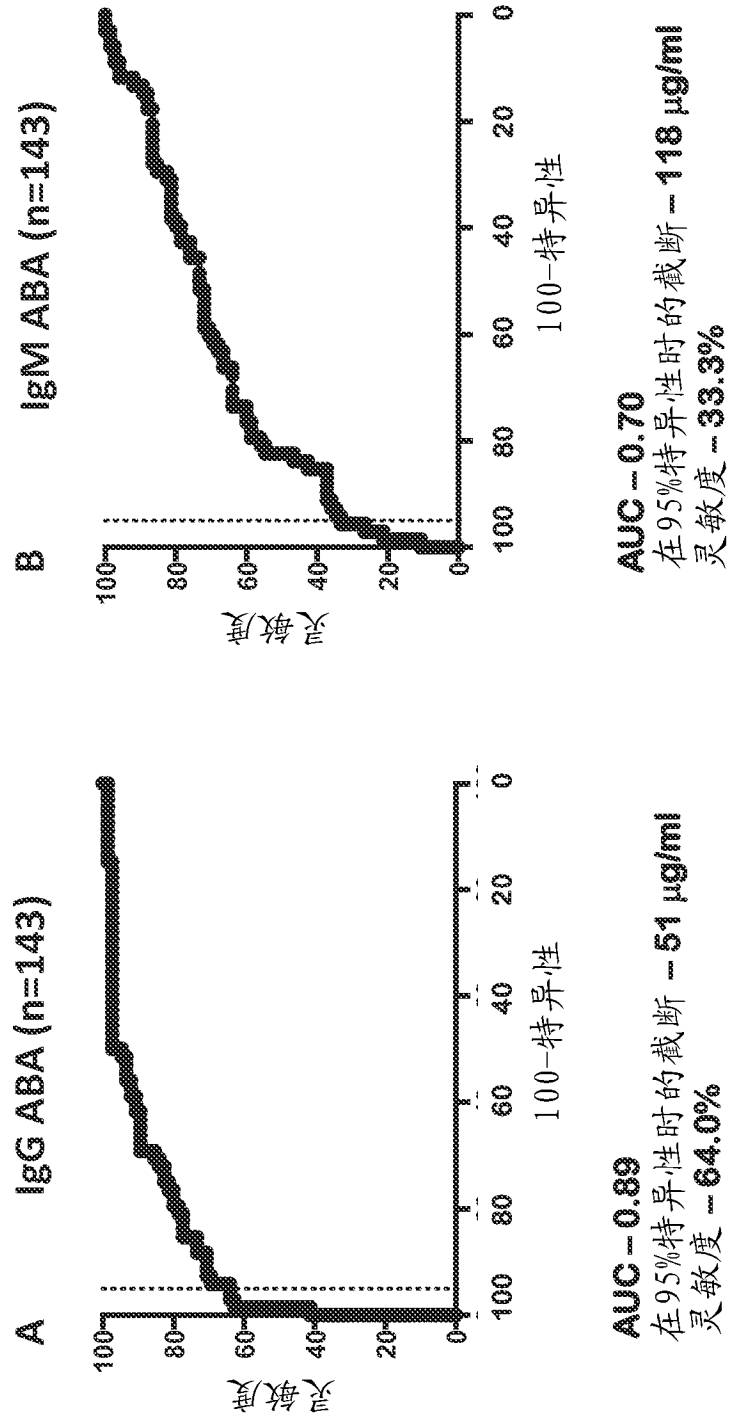


图 27

单核细胞结合

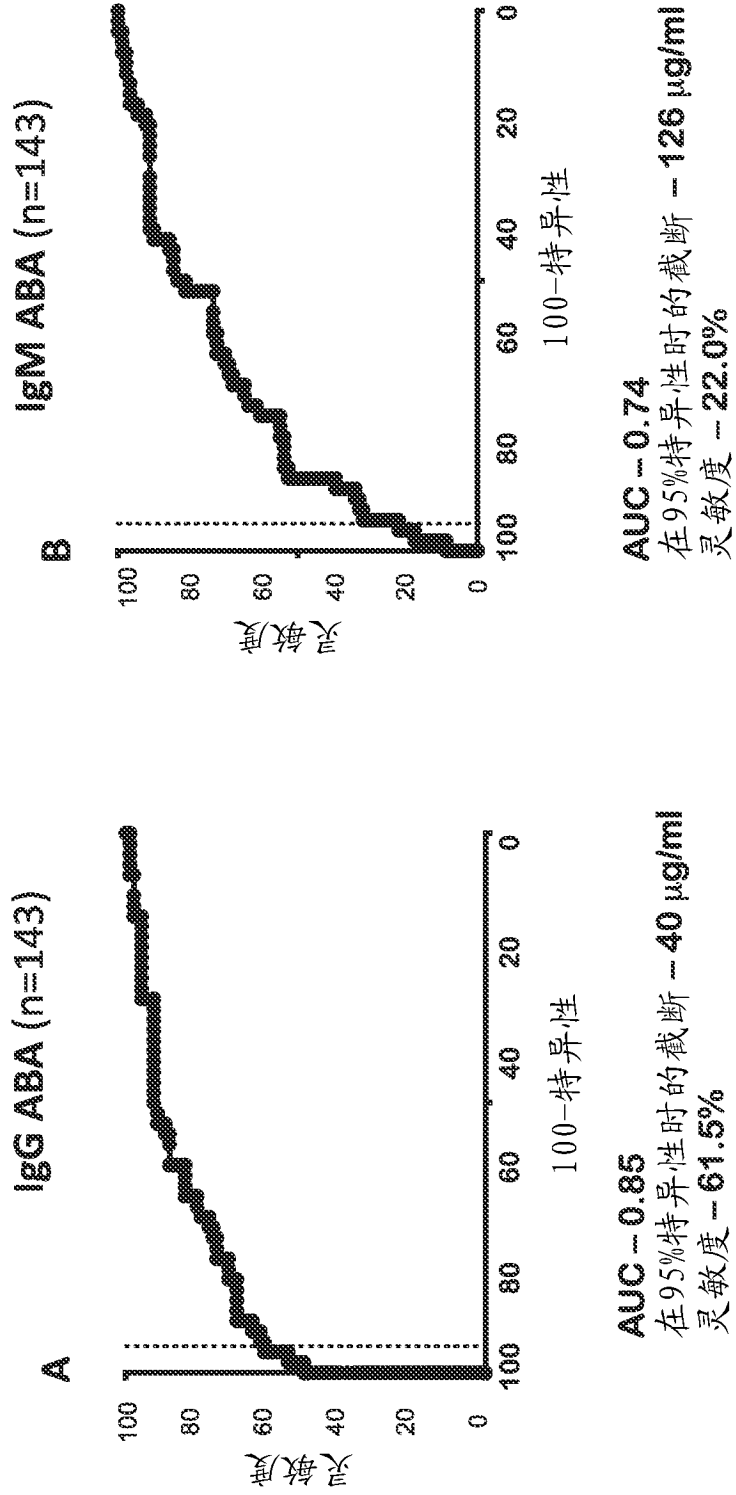


图 28

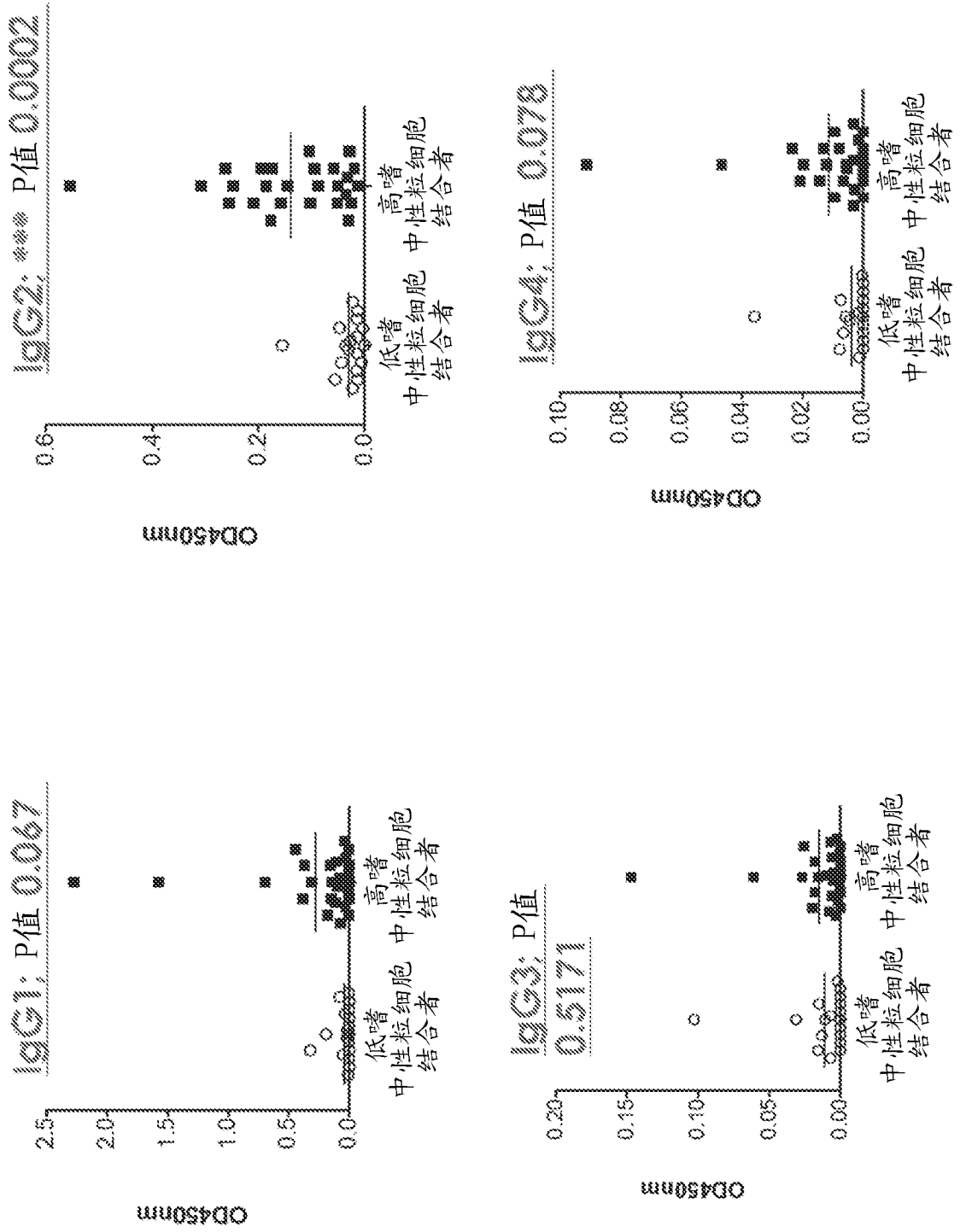


图 29

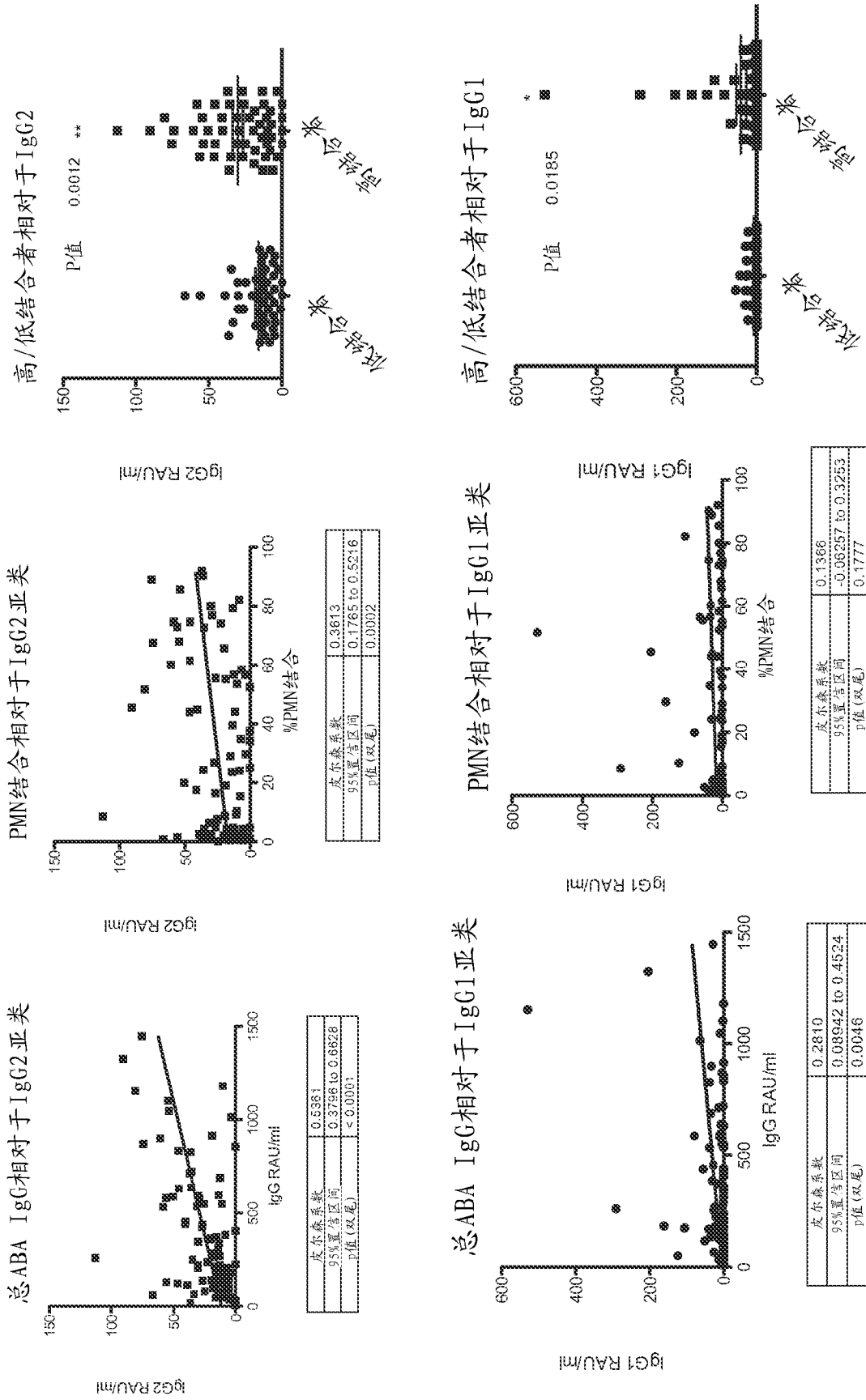
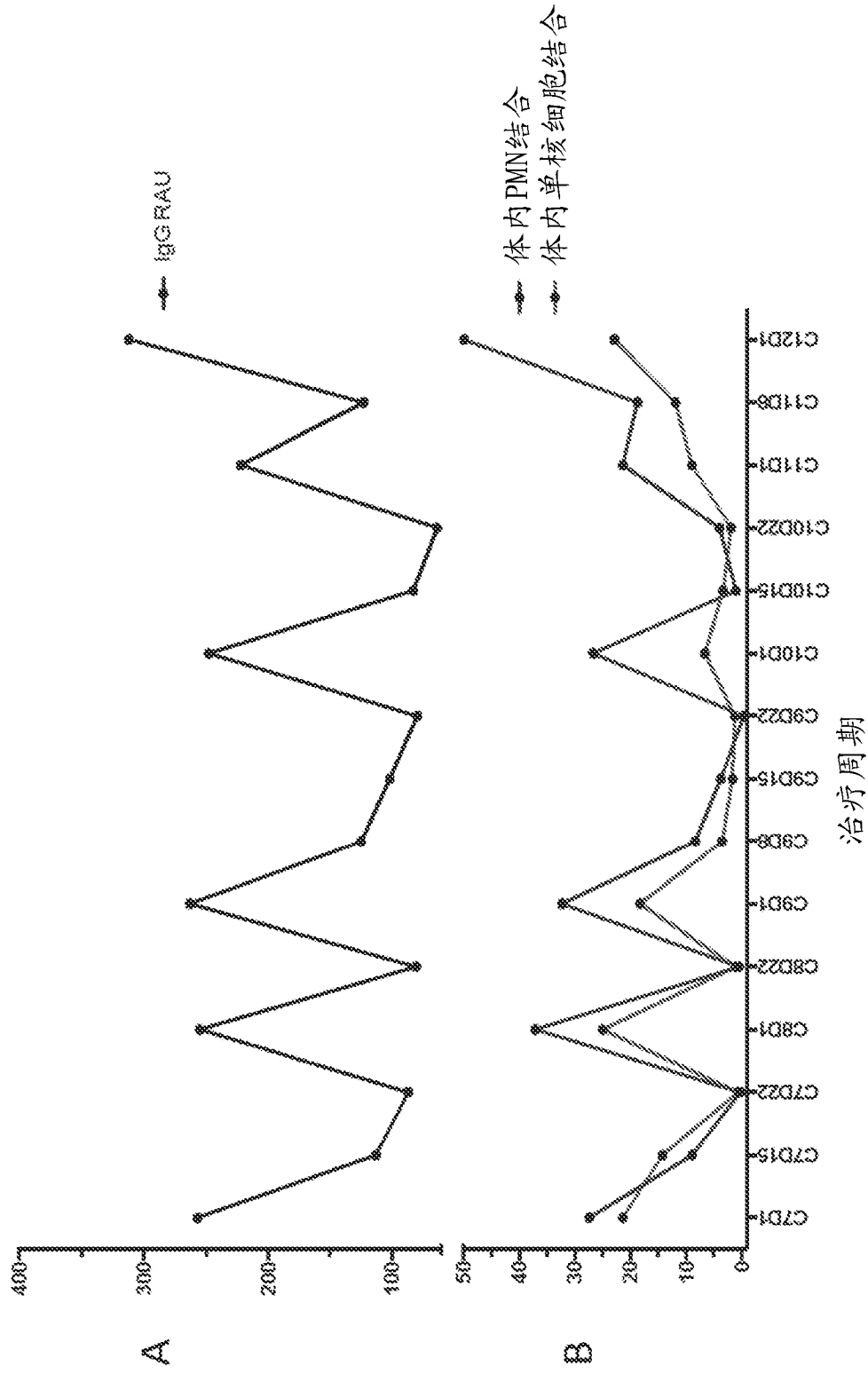
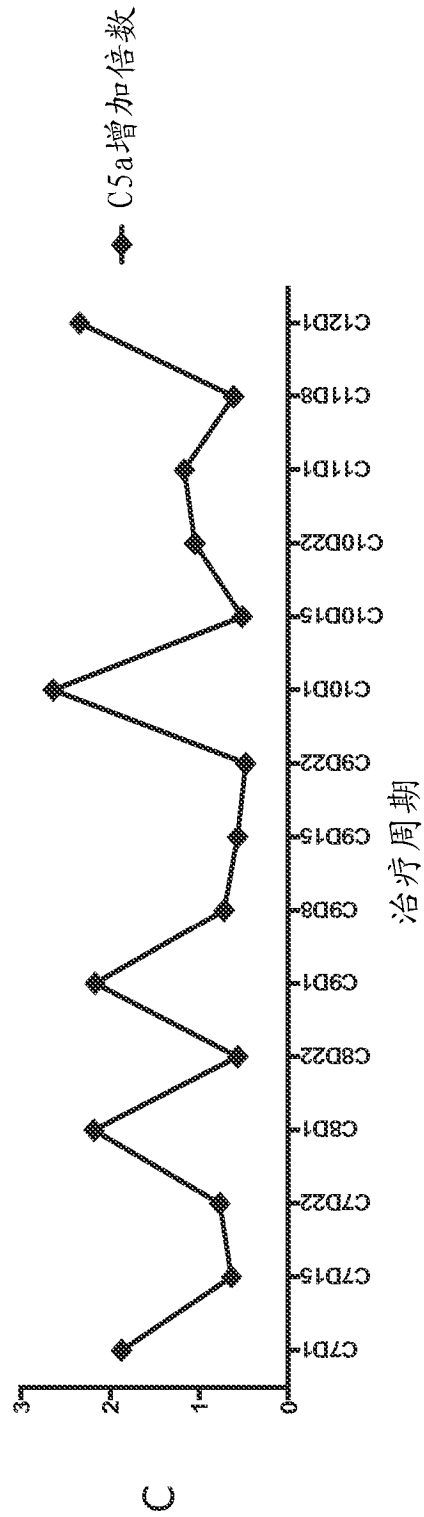


图 30





C

图 31

专利名称(译)	β-葡聚糖测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106170698A</a>	公开(公告)日	2016-11-30
申请号	CN201480074875.4	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)	生物治疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物治疗公司		
[标]发明人	N 波斯 M A 安东尼萨米 K B 戈登 R 沃尔什 M E 丹尼尔森 P 梅莫尼斯		
发明人	N.波斯 M.A.安东尼萨米 K.B.戈登 R.沃尔什 M.E.丹尼尔森 P.梅莫尼斯		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	A61P37/02 C07K16/16 G01N33/53 G01N33/56961 G01N2400/24 G01N2800/24 A61K39/0002 C07K16/14 G01N33/6854		
代理人(译)	梁谋		
优先权	61/912275 2013-12-05 US 62/005335 2014-05-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

在一个方面，本公开内容提供了用于就生物标记物分析来自受试者的样品的方法，所述生物标记物指示受试者对β-葡聚糖的免疫应答。一般地，该方法包括从受试者中获得生物样品，与参考标准相比较就生物标记物抗β-葡聚糖抗体分析样品，计算样品中关于抗β-葡聚糖抗体的相对抗体单位 (RAU) 值，并且如果RAU值大于关于生物标记物抗β-葡聚糖抗体的预定RAU值，则将受试者鉴定为生物标记物阳性的。

