



(21) 申請案號：109107479

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 06 日

(51) Int. Cl. : G01N33/50 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(30) 優先權：2019/03/08 美國

62/815,863

(71) 申請人：美商建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

(72) 發明人：顧塔 薇妮妲 GUPTA, VINITA (US)；布雷迪 安 T BRADY, ANN T. (US)；

柯柏 詹姆士 湯瑪斯 KOERBER, JAMES THOMAS (US)；王 香丹 WANG,

XIANGDAN (US)；凡 敏 麥寇 奴 PHAN, MINH MICHAEL NHU (US)；孫

永蓮 SUN, YONGLIAN (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：36 項 圖式數：10 共 83 頁

(54) 名稱

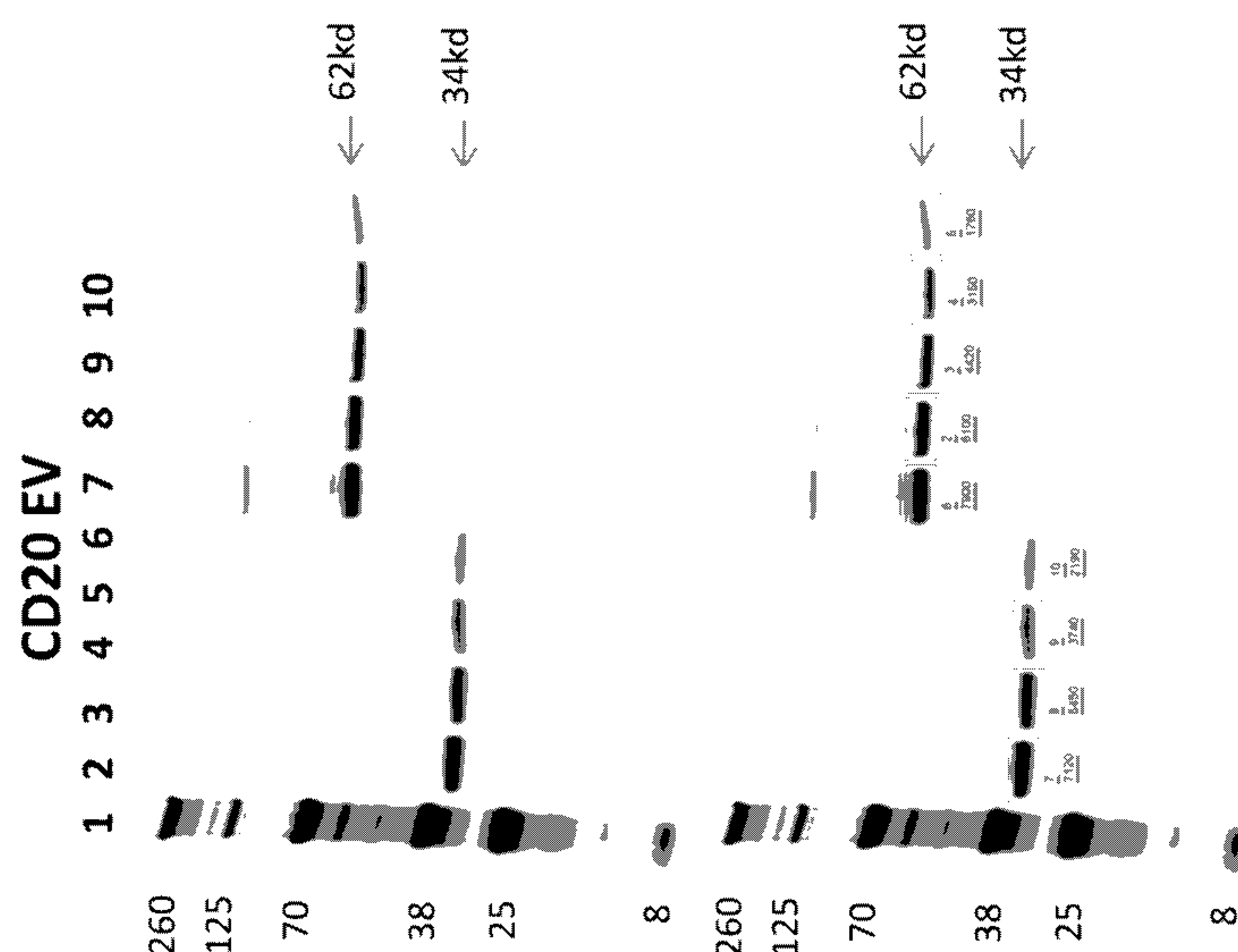
用於偵測且量化膜相關蛋白之方法

(57) 摘要

本揭露提供用於偵測及/或量化膜相關蛋白例如循環 CD20 (cCD20) 之檢定以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病變方面之用途，該等檢定併入包含膜相關腫瘤抗原之基於胞外囊泡的校準物。

The present disclosure provides assays for the detection and/or quantification of membrane-associated proteins, e.g., circulating CD20 (cCD20), incorporating an extracellular vesicle-based calibrator comprising the membrane-associated tumor antigen as well as the use of such assays in the detection and treatment of hyperproliferative disorders.

指定代表圖：



【圖 2】



202101000

【發明摘要】

【中文發明名稱】用於偵測且量化膜相關蛋白之方法

【英文發明名稱】METHODS FOR DETECTING AND QUANTIFYING

MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS

【中文】

本揭露提供用於偵測及/或量化膜相關蛋白例如循環 CD20 (cCD20)之檢定以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病徵方面之用途，該等檢定併入包含膜相關腫瘤抗原之基於胞外囊泡的校準物。

【英文】

The present disclosure provides assays for the detection and/or quantification of membrane-associated proteins, e.g., circulating CD20 (cCD20), incorporating an extracellular vesicle-based calibrator comprising the membrane-associated tumor antigen as well as the use of such assays in the detection and treatment of hyperproliferative disorders.

【指定代表圖】圖 2B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於偵測且量化膜相關蛋白之方法

【英文發明名稱】METHODS FOR DETECTING AND QUANTIFYING
MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS

【技術領域】

【0001】 本揭露提供用於偵測及/或量化膜相關蛋白例如循環 CD20 (cCD20) 之檢定以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病徵方面之用途，該等檢定併入包含膜相關蛋白之基於胞外囊泡的校準物。

【先前技術】

【0002】 B-淋巴球抗原 CD20 (亦稱為人類 B 淋巴球限制性分化抗原，Bp35) 是分子量為約 35 kD 之疏水性跨膜蛋白。CD20 可在前 B 淋巴球及成熟 B 淋巴球之表面上偵測。CD20 調控 B 細胞循環起始、細胞分化及細胞增殖之活化過程的一或多個早期步驟。CD20 亦已知充當鈣離子通道。

【0003】 CD20 為具有在細胞表面及位於細胞質中之 N 端及 C 端形成大胞外環之四個跨膜區的膜蛋白。由於其 C 端及 N 端位於細胞質中，在結合抗體上，CD20 已被認為不可能從細胞表面脫落或裂解。CD20 當易位至脂膜筏時可形成二聚體或寡聚體。假設 CD20 在 B 細胞淋巴瘤中表現，該抗原如其他膜相關腫瘤抗原可充當「靶向」此類淋巴瘤之候選物。舉例而言，已向患者投與對 B 細胞的 CD20 表面抗原具有特異性且結合到胞外環之抗體以便於破壞且耗盡贅生性 B 細胞。另外，具有破壞腫瘤之可能的化學劑或放射性標籤可經結合至抗 CD20 抗體，使得該劑特別「遞送」至贅生性 B 細胞。鑒於先前內容，CD20 抗體在患有淋巴增生性病徵之患者，包括患有慢性淋巴球性白血病、非霍奇金淋巴瘤、或霍奇金病之彼等患者的療法中起到逐漸增加的作用。

【0004】 膜相關蛋白與其他蛋白以細胞膜片段或大膜複合物形式循環。舉例而言，循環 CD20 蛋白可在膜相關粒子之背景下以全長蛋白形式存在於循環中。因此，當存在於循環中時，該等膜相關蛋白藥物標靶諸如 CD20 可結合且螯合治療性抗體且因此充當意欲靶向腫瘤之抗 CD20 抗體之藥池(drug sink)。此螯合可降低治療性抗體之治療效率。膜相關蛋白例如循環 CD20 亦可充當淋巴增生性病變諸如慢性淋巴球性白血病、非霍奇金淋巴瘤、或霍奇金病之生物標記物以及與對依賴於特定腫瘤抗原之存在的治療的反應的可能性相關的標記物。假設膜相關蛋白例如循環 CD20 關於過度增生性病變偵測及治療的重要作用，此項技術中仍需要用於確定存在於個體中之膜相關腫瘤抗原例如循環 CD20 之量的檢定。

【發明內容】

【0005】 本發明揭示之主題涉及用於偵測及/或量化膜蛋白例如循環 CD20 (cCD20)之檢定及方法以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病變方面之用途，該等檢定及方法併入包含膜相關蛋白之基於胞外囊泡的校準物。

【0006】 在某些實施例中，本揭露涉及用於偵測樣品中之膜相關蛋白的檢定，該檢定包含：a)捕捉抗體，其結合到樣品中之包含膜相關蛋白之胞外囊泡，從而生成捕捉抗體-胞外囊泡複合物；及 b)偵測抗體，其結合到該捕捉抗體-胞外囊泡複合物以形成可偵測結合複合物，其中來自該可偵測結合複合物之信號係針對自包含該蛋白之胞外囊泡偵測之一或多個已知值來校準。

【0007】 在某些實施例中，本揭露之檢定進一步包含胞外囊泡校準物。

【0008】 在某些實施例中，本揭露之檢定包含不與偵測抗體競爭結合之捕捉抗體。在某些實施例中，捕捉抗體所結合之抗原決定基與偵測抗體所結合抗原決定基不同。在某些實施例中，捕捉抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗(rituximab)、奧瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧法珠單抗(ofatumumab)、奧濱尤妥珠單

抗(obinutuzumab)、及其組合。在某些實施例中，偵測抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、及其組合。

【0009】 在某些實施例中，本揭露涉及利用樣品中之膜相關蛋白的檢定。在某些實施例中，樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。在某些實施例中，膜相關蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0010】 在某些實施例中，本揭露涉及用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：a)確定樣品之胞外囊泡中之標靶蛋白的水準；及 b)比較樣品之胞外囊泡中之蛋白的水準與使用包含標靶蛋白之胞外囊泡生成之校準曲線。

【0011】 在某些實施例中，本揭露涉及用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：a)使用包含該蛋白之胞外囊泡生成校準曲線；及 b)比較樣品之胞外囊泡中之標靶蛋白的水準與該校準曲線以確定樣品之胞外囊泡中之該蛋白的量。

【0012】 在某些實施例中，本揭露涉及用於確定患有 B 細胞淋巴瘤之環狀是否可能表現出對抗 CD20 療法之反應的方法，其包含以下步驟：a)自患者獲得樣品；b)確定樣品之胞外囊泡中之循環 CD20 的量；c)比較樣品之胞外囊泡中之 CD20 的水準與使用包含 CD20 之胞外囊泡生成的校準曲線；及 d)基於樣品中確定之胞外囊泡中之循環 CD20 的量，確定該患者是否可能表現出對 CD20 療法的反應。在某些實施例中，抗 CD20 療法包含投與抗 CD20 抗體。

【0013】 在某些實施例中，本揭露涉及用於確定抗標靶蛋白抗體例如抗 CD20 抗體之親和力的方法，其包含使該抗體經歷表面電漿子共振(SPR)分析，其中該 SPR 分析包含使用表現標靶蛋白例如 CD20 之胞外囊泡作為配體及使用抗體例如抗 CD20 抗體作為分析物。在某些實施例中，如本文所述採用 SPR 分析以區分二或更多種抗標靶抗體。在某些實施例中，SPR 分析允許對抗標靶抗體進行分級。在某些實施例中，特定抗標靶抗體之選擇藉由經 SPR 分析對二或更多種抗標靶抗體進行分級且選擇最高分級之抗標靶抗體或藉由選擇表現出所要親和力之抗標靶抗體來進行。

【0014】 在某些實施例中，本揭露涉及用於確定自患者獲得之 T 細胞之活化的方法，其包含 a)將表現 CD20 之胞外囊泡與 T 細胞及 CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體一起溫育；及 b)確定 T 細胞之活化。

【0015】 在某些實施例中，本揭露涉及治療有需要之受試者之腫瘤的方法，其包含：a)自受試者獲得樣品；b)使用包含腫瘤抗原之胞外囊泡生成校準曲線；c)比較樣品之胞外囊泡中之腫瘤抗原的水準與校準曲線以確定樣品之胞外囊泡中之標靶腫瘤抗原的量；d)基於樣品之胞外囊泡中之腫瘤抗原的水準，確定該受試者是否可能表現出對抗體療法之反應；及 e)回應於 d)中之確定投與治療劑。

【0016】 在某些實施例中，本揭露之方法進一步包含使用胞外標記物偵測胞外囊泡之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0017】 在某些實施例中，本揭露涉及使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定膜相關蛋白之濃度及校準曲線的方法。在某些實施例中，樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。在某些實施例中，腫瘤抗原選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗

原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、及食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0018】 在某些實施例中，本揭露涉及利用抗 CD 20 抗體之方法，其中抗 CD20 抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T-細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【圖式簡單說明】

【0019】 圖 1A 描繪作為膜相關粒子以全長蛋白形式存在於循環中之示範性 cCD20 結構。圖 1B 描繪 I 型 CD20 抗體之示範性四聚物間結合機制。

【0020】 圖 2 描繪藉由西方墨點法對膜相關囊泡進行之示範性表徵，其中第 1 列表示標記物，第 2 列表示 EV 2 ug，第 3 列表示 EV 1 ug，第 4 列表示 EV 0.5 ug，第 5 列表示 EV 0.25 ug，第 6 列表示 rhCD20 250 ng，第 7 列表示 rCD20 100 ng，第 8 列表示 rCD20 40 ng，第 9 列表示 rCD20 16 ng，且第 10 列表示 rCD20 6.4 ng。

【0021】 圖 3 描繪膜及/或胞外囊泡中之 CD20 的示範性表徵。

【0022】 圖 4 描繪使用(作圖)兩種抗 CD20 抗體進行捕捉及偵測；或使用(右圖)抗 CD20 抗體進行捕捉且使用抗 CD9、抗 CD63、及抗 CD81 抗體進行偵測之結果。

【0023】 圖 5A 描繪示範性 3 日連續檢定格式。圖 5B 描繪示範性橋式檢定格式。

【0024】 圖 6 描繪示範性替代性免疫檢定格式。

【0025】 圖 7 描繪清潔劑對 CD20 偵測之影響的示範性分析。

【0026】 圖 8 描繪示範性耐藥性分析。

【0027】 圖 9A 描繪用於表徵胞外囊泡上表現之 CD20 的抗 CD20 TDB 之示範性檢定格式。圖 9B 描繪抗 CD20 TDB 與 CD20 EV 之示範性結合親和力，如藉由動力學分析及 Biacore 感應圖所確定。

【0028】 圖 10 描繪示範性標準曲線。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0029】 本申請案主張 2019 年 3 月 8 日申請之美國臨時專利申請案第 62/815,863 號之優先權，該案之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0030】 本揭露提供用於偵測及/或量化膜相關蛋白例如循環 CD20 之檢定以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病徵方面之用途，該等檢定併入包含膜相關蛋白之基於胞外囊泡的校準物。在某些實施例中，本揭露之檢定包含藉由確定存在於樣品之胞外囊泡中之 CD20 的水準且比較樣品中之 CD20 的水準與使用包含 CD20 之胞外囊泡生成的校準曲線來量化膜性格蛋白(例如胞外囊泡相關蛋白，例如循環 CD20)之濃度。在某些實施例中，採用一或多種抗體之免疫檢定例如 ELISA 或西方墨點法用於確定樣品中之膜相關蛋白之濃度或與校準曲線之製備相結合。

【0031】 為了清楚起見，但不作為限制，本發明揭示之主題的實施方式分成以下子章節：

I. 定義；

II. 免疫檢定；

III. 抗體；

IV. 套組；及

V. 示範性實施例。

I. 定義

【0032】 除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語皆具有本發明所屬之技術中之一般技藝人士通常所理解之含義。以下參考文獻向一般技藝人士提供本發明所用之許多術語的一般定義：Singleton 等人，*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (第 2 版, 1994)；*The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker 編，1988)；*The Glossary of Genetics*, 第 5 版, R. Rieger 等人(編), Springer Verlag (1991)；及 Hale 及 Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991)。除非另有規定，否則如本文所用，以下術語具有下文歸屬於其之含義。

【0033】 如本文所用，術語「約」或「大致」可意謂處於如藉由一般技藝人士所測定之特定值的可接受之誤差範圍內，其部分地取決於該值係如何量測或測定(例如，量測系統之限制)。例如，根據給定值之實踐，「約」可意謂 1 內或大於 1 的標準偏差。在本申請案及申請專利範圍中描述特定值之情況下，除非另有規定，否則術語「約」可意謂處於該特定值之可接受誤差範圍內，諸如由術語「約」修飾之值的 $\pm 10\%$ 。

【0034】 出於本文之目的，術語「接受體人類構架」係指包含來源於如下文所定義之人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之輕鏈可變域(VL)構架或重鏈可變域(VH)構架之胺基酸序列的構架。「來源於」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之接受體人類構架可包含與人類免疫球蛋白構架或人類共同構架相同的胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在某些實施例中，胺基酸變化之數目為 10 個或更少、9 個或更少、8 個或更少、7 個或更少、6 個或更少、5 個或更少、4 個或更少、3 個或更少或 2 個或更少。在某些實施例中，VL 接受體人類構架之序列與 VL 人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

【0035】 術語「親和力」係指在分子(例如，抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如，抗原)之間的非共價相互作用之合計強度。除非另外指示，否則如本文所用之「結合親和力」係指反映結合對(例如，抗體與抗原)成員之間 1:1 相互作用的固有結合親和力。分子 X 對其搭配物 Y 之親和力一般可由解離常數(K_D)表示。親和力可藉由此項技術中已知之通用方法來量測，該等方法包括本文所述之方法。下文描述用於量測結合親和力之特定說明性且例示性實施方案。

【0036】 術語「親和力成熟」抗體係指與親本抗體相比在一或多個高變區(HVR)中具有一或多種改變之抗體，該親本抗體不具有該等改變，該等改變導致該抗體對抗原之親和力的改善。

【0037】 術語「抗體」在本文中以廣義使用並且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)以及抗體片段，只要其表現出所需抗原結合活性。

【0038】 「抗體片段」係指除完整抗體以外之分子，其包含結合完整抗體所結合至之抗原的完整抗體之一部分。抗體片段之實例包括但不限於 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙功能抗體；線性抗體；單鏈抗體分子(例如，scFv)；及由抗體片段形成之多特異性抗體。

【0039】 「結合」所關注抗原(例如，CD20 蛋白)之抗體為以足夠親和力結合抗原之抗體，使得該抗體可用作測定藥劑，例如用作捕捉抗體或用作偵測抗體。通常，此類抗體不與其他多肽顯著地交叉反應。關於多肽與標靶分子之結合，術語「特異性結合」或「特異性結合至」或「特異於」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基意指可測量地不同於非特異性相互作用之結合。特異性結合可例如藉由測定標靶分子之結合相較於對照分子之結合來測量，該對照分子一般為不具有結合活性之結構類似分子。

【0040】 術語「抗腫瘤抗原抗體」係指能夠以足夠親和力結合腫瘤抗原例如 CD20 的抗體，使得該抗體適用作靶向腫瘤抗原之劑，例如本文所述檢定中之劑。在某些實施例中，抗腫瘤抗原抗體與不相關蛋白之結合程度小於該抗體與靶向腫瘤抗原之結合的約 10%，例如藉由放射免疫檢定(RIA)所量測。在某些實施例中，結合至靶向腫瘤抗原之抗體之解離常數(K_D)為 $\leq 1\text{ M}$ 、 $\leq 100\text{ mM}$ 、 $\leq 10\text{ mM}$ 、 $\leq 1\text{ mM}$ 、 $\leq 100\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 10\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ 。在某些實施例中，結合到本文所揭示之 CD20 之抗體的 K_D 可為 10^{-3} M 或更小、或 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M 。在某些實施例中，結合到本文所揭示之靶向腫瘤抗原之抗體的 K_D 可為 10^{-10} M 至 10^{-13} M 。在某些實施例中，抗腫瘤抗原抗體結合到靶向腫瘤抗原之抗原決定基，該抗原決定基在來自不同物種之靶向腫瘤抗原內為保守的。

【0041】 與參考抗體「競爭結合之抗體」係指在競爭檢定中阻斷該參考抗體與其抗原之結合達 50% 或更多的抗體，且相反地，該參考抗體在競爭檢定中阻斷該抗體與其抗原之結合達 50% 或更多。示範性競爭檢定描述於「Antibodies,」 Harlow 及 Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) 中。

【0042】 「B 細胞」為在骨髓內成熟之淋巴球，且包括天然 B 細胞、記憶 B 細胞、或效應 B 細胞(漿細胞)。B 細胞在本文中可為正常或非惡性 B 細胞。

【0043】 「結合域」意謂化合物或分子中特定地結合於標靶抗原決定基、抗原、配體或受體之部分。結合域包括但不限於抗體(例如，單株、多株、重組、人類化及嵌合抗體)、抗體片段或其部分(例如，Fab 片段、Fab'2、scFv 抗體、SMIP、域抗體、雙功能抗體、微型抗體、scFv-Fc、親和體、奈米抗體及抗體之 VH 及/或 VL 域)、受體、配體、適體及具有經鑑別結合搭配物之其他分子。

【0044】 如本文所用，「捕捉抗體」係指特異性結合樣品中之標靶分子(例如 CD20 形式)之抗體。在某些條件下，捕捉抗體與標靶分子形成複合物，使得抗體-標靶分子複合物可與樣品之剩餘部分分離。在某些實施例中，此類分離可包括洗去樣品中未結合捕捉抗體之物質或材料。在某些實施例中，捕捉抗體可連接至固體支持物表面，諸如例如但不限於板或珠粒，例如順磁珠粒。

【0045】 如本文所用，術語「CD20」係指 CD20 抗原，其為來自外周血或淋巴器官之大於 90% B 細胞之表面上可見的大約 35 kDa 磷酸蛋白。CD20 在早期前 B 細胞發育期間表現且保留直至漿細胞分化。CD20 存在於正常 B 細胞以及惡性 B 細胞上。文獻中 CD20 之其他名稱包括「B 淋巴球限制性抗原」及「Bp35」。CD20 抗原例如描述於 Clark 等人 PNAS (USA) 82:1766 (1985)。

【0046】 術語「CD20 核酸」在本文中係指編碼 CD20 蛋白之至少一部分的核酸(包括 DNA 及 mRNA)和/或互補核酸。

【0047】 「偵測腫瘤抗原」意指評估樣品是否包含腫瘤抗原。一般而言，將偵測到腫瘤抗原蛋白，例如 CD20 蛋白，但在本文中該片語亦包括偵測腫瘤抗原核酸，例如 CD20 核酸。

【0048】 術語「腫瘤抗原核酸」在本文中係指編碼腫瘤抗原蛋白之至少一部分的核酸(包括 DNA 及 mRNA)和/或互補核酸。

【0049】 術語「嵌合」抗體係指其中重鏈及/或輕鏈之一部分來源於特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈之剩餘部分來源於不同來源或物種的抗體。

【0050】 抗體之「類別」係指由其重鏈所具有之恆定結構域或恆定區之類型。存在五個主要抗體類別：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且此等類別中之若干類別可進一步分成子類(同型)，例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及 IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

【0051】 在整個說明書及申請專利範圍中，詞語「包括(comprise)」或諸如「包括(comprises)」或「包括(comprising)」的變化形式將被理解為暗示包括所述整數或整數群，但不排除任何其他整數或整數群。

【0052】 術語「相關(correlate)」或「相關(correlating)」意指以任何方式將第一分析或方案之性能及/或結果與第二分析或方案之性能及/或結果比較。例如，在執行第二方案中可使用第一分析或方案之結果，及/或可使用第一分析或方案之結果來確定是否應進行第二分析或方案。關於基因表現分析或方案之實施例，可使用基因表現分析或方案之結果來確定是否應進行具體治療方案。

【0053】 術語「偵測」在本文中用於包括對標靶分子例如 CD20 或其經處理形式之定性及定量量測。在某些實施例中，偵測包括鑑別出在樣品中標靶分子之單純存在，以及確定標靶分子是否以可偵測水準存在於樣品中。

【0054】 如本文所用，術語「偵測抗體」係指特異性結合樣品或樣品-捕捉抗體組合材料中之標靶分子之抗體。在某些條件下，偵測抗體與標靶分子或標靶分子-捕捉抗體複合物形成複合物。偵測抗體能夠通過可經擴增之標籤直接地或例如通過使用經標記且結合偵測抗體之另一種抗體間接地偵測。對於直接標記，偵測抗體通常與可藉由一些手段偵測之部分接合，例如包括但不限於生物素或鈎。

【0055】 如本文所用，術語「偵測手段」係指用於通過信號報告來偵測可偵測抗體之存在的部分或技術，該信號報告然後在測定中讀出。通常，偵測手段採用擴增固定化標籤(諸如捕捉至微量滴定板上之標籤，例如抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白-HRP 或鏈黴抗生物素蛋白- β -D-半乳呷喃糖)之藥劑，例如偵測劑。

【0056】 劑之「有效量」係指引起投與該劑之細胞或組織之生理學變化所必

需之量。

【0057】 術語「效應功能」係指可歸因於抗體 Fc 區之彼等生物活性，其隨抗體同型變化。抗體效應功能之實例包括：C1q 結合及補體依賴性細胞毒性 (CDC)；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如 B 細胞受體)之下調；及 B 細胞活化。

【0058】 本文中術語「Fc 區」用於定義免疫球蛋白重鏈中含有恆定區之至少一部分的 C 末端區。該術語包括天然序列 Fc 區及變異體 Fc 區。在某些實施例中，人類 IgG 重鏈 Fc 區自 Cys226 或 Pro230 延伸至重鏈之羧基末端。然而，Fc 區之 C 末端離胺酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文中另外指定，否則 Fc 區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據 EU 編號系統，該系統亦稱為 EU 指數，如 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

【0059】 「構架」或「FR」係指除高變區(HVR)殘基之外的可變域殘基。可變域之 FR 一般由四個 FR 域組成：FR1、FR2、FR3 及 FR4。因此，HVR 及 FR 序列一般依以下順序出現於 VH (或 VL) 中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0060】 術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用且係指結構基本上類似於天然抗體結構或具有含有如本文所定義之 Fc 區之重鏈的抗體。

【0061】 「異多聚體」、「異多聚體複合物」或「異多聚體蛋白」係指包含至少第一含鉸鏈多肽及第二含鉸鏈多肽之分子，其中該第二含鉸鏈多肽之胺基酸序列與該第一含鉸鏈多肽相差至少一個胺基酸殘基。異多聚體可含有由第一含鉸鏈多肽及第二含鉸鏈多肽形成之「異二聚體」或者可形成更高級三級結構，

其中存在除了第一含鉸鏈多肽及第二含鉸鏈多肽以外之多肽。異多聚體之多肽可藉由非肽共價鍵(例如，二硫鍵)及/或非共價相互作用(例如，氫鍵、離子鍵、凡得瓦力、及/或疏水性相互作用)來彼此相互作用。

【0062】 如本文中可互換使用之術語「宿主細胞」、「宿主細胞系」及「宿主細胞培養物」係指已引入外源核酸之細胞，包括此類細胞之子代。宿主細胞包括「轉型體」及「經轉型細胞」，其包括原代轉型細胞及來源於其之子代，而與傳代次數無關。子代之核酸含量可與母細胞不完全一致，而是可含有突變。本文包括具有與原始轉型細胞中所篩選或選擇相同之功能或生物學活性的突變體子代。

【0063】 「人類抗體」為具有對應於由人類或人類細胞產生之抗體的胺基酸序列之胺基酸序列或源於利用人類抗體譜系或其他人類抗體編碼序列之非人類來源的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

【0064】 「人類共同構架」為表示人類免疫球蛋白 VL 或 VH 構架序列之選擇中最常出現之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白 VL 或 VH 序列係選自可變域序列之子群。一般而言，序列子群為如 Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第 1-3 卷中之子群。在某些實施例中，對於 VL，該亞組為如 Kabat 等人(同上)中之亞組 κ I。在某些實施例中，對於 VH，該亞組為如 Kabat 等人(同上)中之亞組 III。

【0065】 「人源化」抗體係指包含來自非人類 HVR 之胺基酸殘基及來自人類 FR 之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人源化抗體將實質上包含至少一個且通常兩個可變域中之全部，其中全部或實質上全部 HVR (例如，HVR)對

應於非人類抗體之彼等，且全部或實質上全部 FR 對應於人類抗體之彼等。人源化抗體視情況可包含來源於人類抗體之抗體恆定區之至少一部分。抗體(例如，非人類抗體)之「人源化形式」係指已經歷人源化之抗體。

【0066】 如本文所用，術語「高變區」或「HVR」係指抗體可變域中在序列方面高變(在本文中亦稱為「互補決定區」或「HVR」)及/或形成在結構上經定義之環(「高變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原接觸」)的各區。除非另外指示，否則可變域中之 HVR 殘基及其他殘基(例如，FR 殘基)在本文中根據 Kabat 等人, 上述編號。一般而言，抗體包含六個 HVR：三個在 VH 中(H1、H2、H3)，且三個在 VL 中(L1、L2、L3)。本文中之示範性 HVR 包括：

(a) 出現在胺基酸殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2) 及 96-101 (H3)處之高變環(Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；

(b) 出現於胺基酸殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2) 及 95-102 (H3)處之 HVR (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c) 抗原接觸，其存在於胺基酸殘基 27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及 93-101 (H3) (MacCallum 等人 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括 HVR 胺基酸殘基 46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及 94-102 (H3)。

如本文中可互換使用之「個體」或「受試者」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於家養動物(例如，牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如，人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及啮齒動物(例如，小鼠及大鼠)。在某些實施例中，

在某些實施例中，個體或受試者為人類。

【0067】 「免疫結合物」係指結合於一或多個異源分子(包括(但不限於)細胞毒性劑)之抗體。

【0068】 「經分離」核酸係指已自其自然環境之組分中分離之核酸分子。經分離核酸包括含於細胞中之核酸分子，該等細胞普遍含有該核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或不同於其天然染色體位置的染色體位置處。

【0069】 如本文中可互換使用之「個體」或「受試者」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於家養動物(例如，牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如，人類及非人類靈長類動物，諸如猴)、兔及嚙齒動物(例如，小鼠及大鼠)。在某些實施例中，在某些實施例中，個體或受試者為人類。

【0070】 「編碼抗體之經分離核酸」(包括提及特定抗體，例如抗 CD20 抗體)係指一或多個編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之核酸分子，包括在單一載體或各別載體中之此(等)核酸分子及存在於宿主細胞中之一或多個位置上之此(等)核酸分子。

【0071】 如本文所用，術語「標籤」或「可偵測標籤」係指可與欲偵測或量化之物質(例如，抗體)鍵聯之任何化學基團或部分。標籤為可偵測的標籤，其適於物質之敏感性偵測或量化。可偵測標籤之非限制性實例包括但不限於發光標籤例如螢光、磷光、化學發光、生物發光、及電化學發光標籤、放射性標籤、酶、粒子、磁性物質、電活性物質、及其類似物。或者，可偵測標籤可藉由參與特異性結合反應來發出其存在的信號。此類標籤之非限制性實例包括半抗原、抗體、生物素、鏈黴抗生物素蛋白、his-標籤、氨基三乙酸、麩胱甘肽 S-轉移酶、麩胱甘肽、及其類似物。

【0072】 如本文所用，術語「膜相關蛋白」係指任何膜相關標靶，包括抗原、

肽、及蛋白。膜相關蛋白可包括完整膜蛋白及/或外周膜蛋白。膜相關蛋白之非限制性實例包括但不限於人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、及食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0073】 如本文所用之術語「單株抗體」係指由實質上均質抗體群獲得之抗體，亦即構成該群之單個抗體為相同的及/或結合相同抗原決定基，除可能的變異抗體之外，例如，含有天然存在之突變或在產生單株抗體製劑期間出現，此類變異體一般以較少量存在。與通常包括針對不同決定基(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之各單株抗體針對抗原上之單一決定基。因此，修飾語「單株」指示該抗體之特徵為獲自抗體之實質上均質群體，且不應解釋為需要由任何特定方法產生該抗體。例如，欲根據本發明所揭示之主題使用之單株抗體可由多種技術製得，包括但不限於融合瘤方法、重組 DNA 方法、噬菌體呈現方法及利用含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分的轉殖基因動物之方法，該等方法及用於製造單株抗體之其他示範性方法描述於本文中。

【0074】 如本文所用，術語「包裝插頁」係指通常包括於商業包裝中且含有關於使用該包裝之組件的信息的說明書。

【0075】 「致病」細胞為引起疾病或異常之細胞且可存在於患病組織或細胞中或周圍。

【0076】 關於參考多肽序列之「百分比(%)胺基酸序列一致性」係定義為在比對候選序列及引入之間隙(必要時)以實現最大百分比序列一致性之後，且不考慮

作為序列一致性的一部分之任何保守取代，候選序列中與該參考多肽序列中之胺基酸殘基一致的胺基酸殘基之百分率。可以此項技術中之技能範圍內之多種方式，例如使用可公開獲得之電腦軟體，諸如 **BLAST**、**BLAST-2**、**ALIGN** 或 **Megalign (DNASTAR)**軟體來比對以便測定胺基酸序列一致性百分比。熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較之序列全長上實現最大比對所需的任何算法。然而，出於本文目的，使用序列比較電腦程式 **ALIGN-2** 生成胺基酸序列一致性%值。該 **ALIGN-2** 序列比較電腦程式由 **Genentech** 公司創造，且源代碼已由美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559 之用戶文檔歸檔，其中其登記在美國版權登記號 **TXU510087** 下。該 **ALIGN-2** 程式由 **Genentech** 公司, South San Francisco, California 公開可得，或可由源代碼編譯。該 **ALIGN-2** 程式應經編譯用於 **UNIX** 操作系統，包括數位 **UNIX V4.0D**。所有序列比較參數均由 **ALIGN-2** 程式設定且不變化。

【0077】 在其中 **ALIGN-2** 用於胺基酸序列比較之情形中，既定胺基酸序列 **A** 相對、與或針對既定胺基酸序列 **B** 之%胺基酸序列一致性(其或者可表述為具有或包含相對、與或針對既定胺基酸序列 **B** 之某一%胺基酸序列一致性的既定胺基酸序列 **A**)計算如下：

$$100 \times \text{分數 } X/Y$$

其中 **X** 為藉由序列比對程式 **ALIGN-2** 在 **A** 及 **B** 之程式比對中評分為相同匹配之胺基酸殘基的數目，且其中 **Y** 為 **B** 中之胺基酸殘基的總數目。應瞭解當胺基酸序列 **A** 之長度不等於胺基酸序列 **B** 之長度時，**A** 對於 **B** 之胺基酸序列一致性%將不等於 **B** 對於 **A** 之胺基酸序列一致性%。除非另外明確陳述，否則本文使用之所有胺基酸序列一致性%值皆係使用 **ALIGN-2** 電腦程式如前一段中所述來獲得。

【0078】 如在本文中可互換使用之術語「多肽」及「蛋白」係指任何長度之胺基酸的聚合物。該聚合物可為線性或分支鏈的，其可包含經修飾胺基酸，且其可由非胺基酸中斷。該等術語亦涵蓋已天然地或藉由干預經修飾之胺基酸聚合物；例如二硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。在定義內還包括，例如，含有胺基酸的一種或多種類似物(包括，例如，非天然胺基酸，等等)的多肽、以及本領域已知的其他修飾。如本文所用，術語「多肽」及「蛋白」特定地涵蓋抗體。

【0079】 如本文所用，「樣品」係指較大量之材料的一小部分。在某些實施例中，樣品包括但不限於培養物中之細胞、細胞上清液、細胞裂解物、血清、血漿、生物流體(例如，血液、血漿、血清、糞便、尿液、淋巴液、腹水、導管灌洗液、唾液及腦脊髓液)及組織樣品。樣品之來源可為實體組織(例如，來自新鮮、冷凍及/或防腐器官、組織樣品或生檢體或吸出物)、血液或任何血液成分、體液(諸如例如尿液、淋巴液、腦脊髓液、羊水、腹膜液或間隙液)、或來自個體之細胞(包括循環細胞)。

【0080】 如本文所用，「治療」是指試圖改變正在治療的個體或細胞的自然進程的臨床干預，並且可以在臨床病理學過程之前或期間進行。治療的理想效果包括預防疾病或其病狀或症狀之發生或復發、減輕疾病之病狀或症狀、減少疾病之任何直接或間接病理學後果、降低疾病進展速度、改善或緩解疾病狀態、及達到緩解或改善預後。在某些實施例中，本揭露之方法及組成物可用於試圖延緩疾病或病症的發展。

【0081】 術語「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原之結合的域。天然抗體之重鏈可變域及輕鏈可變域(分別為 VH 及 VL)一般具有相似結構，其中各域包含四個保守構架區(FR)及三個高變區(HVR)。(參見，

例如 Kindt 等人 *Kuby Immunology*, 第 6 版, W.H. Freeman and Co., 第 91 頁 (2007)。
單一 VH 或 VL 域可足以賦予抗原結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原的抗體之 VH 或 VL 域進行分離以分別篩選互補 VL 或 VH 域之文庫。參見例如 Portolano 等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993) ; Clarkson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

【0082】 如本文所用，術語「載體」係指如下核酸分子，其能夠傳送與其連接之另一核酸。該術語包括自複製核酸結構形式之載體，以及併入宿主細胞基因組中之載體，其中已在該宿主細胞中引入該載體。某些載體能夠指導與其可操作連接之核酸的表現。此類載體在本文中稱為「表現載體」。

II. 免疫檢定

【0083】 本揭露提供用於偵測及/或量化膜相關蛋白例如循環 CD20 之檢定以及此類檢定在偵測及治療過度增生性病徵方面之用途，該等檢定併入包含膜相關蛋白之基於胞外囊泡的校準物。在某些實施例中，本揭露之檢定包含藉由確定存在於樣品之胞外囊泡中之 CD20 的水準且比較樣品中之 CD20 的水準與使用包含 CD20 之胞外囊泡生成的校準曲線來量化膜性格蛋白(例如胞外囊泡相關蛋白，例如循環 CD20)之濃度。在某些實施例中，採用一或多種抗體之免疫檢定例如 ELISA 或西方墨點法用於確定樣品中之膜相關腫瘤抗原之濃度或與校準曲線之製備相結合。

【0084】 在某些實施例中，本揭露提供用於偵測且量化膜相關蛋白之免疫檢定方法。舉例而言，本揭露之免疫檢定方法可併入此項技術中已知之策略，包括但不限於夾心檢定、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)檢定、ELISA 之數字形式、電化學檢定(ECL)檢定及磁性免疫檢定。

【0085】 在某些實施例中，本揭露提供一種基於胞外囊泡(EV)之校準物。EV

校準物可為膜結合蛋白校準物。舉例而言，EV 校準物可在對天然 CD20 之確認方面為類似的。由於奧瑞珠單抗結合到具有由四個跨膜物形成之三級結構(呈環形式)之 CD20 的抗原決定基，生成膜結合蛋白校準物為重要的。

【0086】 在某些實施例中，本揭露提供一種用於生成 EV 校準物之方法。示範性方法包括每 3 至 4 日傳代種子罐(seed train)、將種子罐以產物培養基稀釋至生產培養物、轉染生產培養物(例如，DNA/jetPEI 複合物)、自經轉染生產培養物收集 EV 校準物、及純化該 EV 校準物。經純化 EV 校準物可透過西方墨點法進行表徵。

【0087】 在某些實施例中，本揭露提供用於連續檢定之方法。該連續檢定為三日連續檢定。三日連續檢定可在期望經改善敏感性之情況下使用。舉例而言，在第一天，板可在 4°C 下用捕捉抗體塗覆。在第二天，樣品可添加到該板中且在 4°C 下溫育隔夜。在第三天，添加偵測抗體(例如，經結合至生物素)及試劑(例如，HRP)。在非限制性實施例中，奧瑞珠單抗(捕捉抗體)、奧法珠單抗(偵測抗體)及 HRP 100 ng/mL (信號)可用於三日連續檢定。

【0088】 在某些實施例中，本揭露提供用於橋式檢定之方法。橋式檢定可為兩日橋式檢定。兩日橋式檢定可在期望得到結果之時間減小之情況下使用。舉例而言，在第一天，樣品可與包括經生物素結合之奧瑞珠單抗及經 dig 結合之奧法珠單抗抗體的主要混合物一起溫育。在第二天，樣品可經轉移至鏈黴抗生物素蛋白板且隨後可添加經 HRP 結合之抗 DIG 抗體，且經溫育以用於偵測。在非限制性實施例中，板可在 450 nm 下讀取偵測吸光度且在 630 nm 下讀取參考吸光度。樣品濃度可藉由將資料輸入以 $1/y^2$ 曲線加權之五參數邏輯曲線來確定。

【0089】 在某些實施例中，本揭露之方法包含使自受試者獲得之樣品與捕捉抗體諸如本文所述之彼等者在允許該捕捉抗 CD20 抗體與 CD20 蛋白在樣品中結

合的條件下接觸。例如但不作為限制，樣品可與結合至存在於 CD20 上之抗原決定基的捕捉抗體一起溫育以生成樣品-捕捉抗體組合材料。用於溫育樣品及捕捉抗體之條件可經選擇以使檢定之敏感性最小化且/或使解離最小化，以及以確保存在於樣品中之 CD20 蛋白結合到捕捉抗體。

【0090】 在某些實施例中，用於本文所揭示之免疫檢定方法中之捕捉抗體可以約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度使用。例如但不作為限制，捕捉抗體可以以下濃度使用：約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 3.0 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 、約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 或約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至約 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ，例如約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

【0091】 在某些實施例中，捕捉抗體可以塗覆緩衝液稀釋。塗覆緩衝液之非限制性實例包括 PBS、碳酸鹽緩衝液、碳酸氫鹽緩衝液或其組合。在某些實施例中，該塗覆緩衝液為碳酸氫鈉。在某些實施例中，該塗覆緩衝液為 PBS。在某些實施例中，該塗覆緩衝液可以約 10 mM 至約 1 M 之濃度使用。例如但不作為限制，塗覆緩衝液可以以下濃度使用：約 10 mM 至約 100 mM、約 10 mM 至約 200 mM、約 10 mM 至約 300 mM、約 10 mM 至約 400 mM、約 10 mM 至約 500 mM、約 10 mM 至約 600 mM、約 10 mM 至約 700 mM、約 10 mM 至約 800 mM、約 10 mM 至約 900 mM、約 100 mM 至約 1 M、約 200 mM 至約 1 M、約 300 mM 至約 1 M、約 400 mM 至約 1 M、約 500 mM 至約 1 M、約 600 mM 至約

1 M、約 700 mM 至約 1 M、約 800 mM 至約 1 M 或約 900 mM 至約 1 M。

【0092】 如本文所用，捕捉抗體可固定於固相上。例如但不作為限制，固相可為適用於免疫計量檢定中之任何惰性支持物或載體，包括呈例如表面、粒子、多孔基質、珠粒等形式之支持物。常用支持物之非限制性實例包括小片、SEPHADEX®、凝膠、聚乙烯氧、塑料珠粒及由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等製造之檢定板或測試管，包括 96 孔微量滴定板，以及微粒材料諸如濾紙、瓊脂糖、交聯葡聚糖、及其他多糖。在某些實施例中，用於固定之固相可為珠粒。例如但不作為限制，本文所揭示之捕捉抗體固定至順磁珠粒。在某些實施例中，經固定之捕捉抗體塗覆於微量滴定板上，該微量滴定板可用於一次分析若干種樣品。

【0093】 在某些實施例中，偶合至捕捉抗體之順磁珠粒可以以下濃度使用：約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml，例如約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 0.5×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 1.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 2.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 3.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 4.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 5.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 6.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 7.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 8.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 9.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.5×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 1.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 2.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 3.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 4.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 5.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 6.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 7.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 8.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7

個珠粒/ml、約 9.0×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.5×10^7 個珠粒/ml 至約 1.0×10^7 個珠粒/ml、約 0.5×10^7 個珠粒/ml 至約 2.0×10^7 個珠粒/ml 或約 0.5×10^7 個珠粒/ml 至約 3.0×10^7 個珠粒/ml。在某些實施例中，順磁珠粒可以約 0.5×10^7 個珠粒/ml 至約 2.0×10^7 個珠粒/ml 之濃度使用。在某些實施例中，順磁珠粒可以約 1.0×10^7 個珠粒/ml，例如約 1.22×10^7 個珠粒/ml 之濃度使用，或以約 0.5×10^7 個珠粒/ml，例如約 0.59×10^7 個珠粒/ml 之濃度使用。

【0094】 本文所揭示之免疫檢定方法可進一步包括使樣品-捕捉抗體組合材料與偵測劑抗體(detector antibody)接觸。在某些實施例中，偵測劑抗體結合到存在於 CD20 上之抗原決定基。在某些實施例中，偵測劑抗體結合到存在於樣品-捕捉抗體組合材料上而非存在於 CD20 不存在之捕捉抗體上之抗原決定基。在某些實施例中，結合到樣品-捕捉抗體組合之偵測劑抗體隨後使用對於偵測抗體之偵測手段例如一或多種偵測劑量測或量化，以確定由偵測劑抗體結合之 CD20 蛋白的量。

【0095】 在某些實施例中，偵測劑抗體可以約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 之濃度使用。例如但不作為限制，偵測劑抗體可以以下濃度使用：約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $4.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 至約 $4.5 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $4.0 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $4.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $5.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 至約 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 或約 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 至約 $2.0 \mu\text{g/ml}$ 。在某些實施例中，用於偵測總 CD20 蛋白之免疫

檢定可以約 0.1 µg/ml 至約 1.0 µg/ml 之間，例如約 0.4 µg/ml 或約 0.8 µg/ml 之濃度使用偵測劑抗體。在某些實施例中，用於偵測活性 CD20 蛋白之免疫檢定可以約 1.0 µg/ml 至約 3.0 µg/ml 之間，例如約 1.1 µg/ml 或約 2.1 µg/ml 之濃度使用偵測劑抗體。

【0096】 在某些實施例中，用於所揭示方法之抗 CD20 抗體可經標記。標記包括但不限於直接檢測之標記或部分(諸如螢光標記、發色標記、電子密集標記、化學發光標記及放射性標記)，以及間接(例如經由酶促反應或分子間相互作用)偵測之部分，諸如酶或配體。標記之非限制性實例包括但不限於放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團(諸如稀土金屬螯合物)或螢光素(fluorescein)及其衍生物；若丹明(rhodamine)及其衍生物；丹磺醯基；傘形酮；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(參見美國專利第 4,737,456 號)；螢光素(luciferin)；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化物酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與使用過氧化氫氧化染料前體之酶(諸如 HRP、乳過氧化物酶或微過氧化物酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基；及其類似物。在一些實施例中，偵測劑抗體經生物素標記，例如偵測劑抗體經結合至生物素。

【0097】 在某些實施例中，用於經生物素化偵測劑抗體之偵測劑為抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白-HRP 或鏈黴抗生物素蛋白- β -D-半乳呷喃糖(SBG)。在某些實施例中，偵測劑之讀出為螢光測定或比色測定。例如但不作為限制，四甲基聯苯胺及過氧化氫可用作讀出。在某些實施例中，若偵測劑為鏈黴抗生物素蛋白-HRP，則讀出可藉由使用四甲基聯苯胺及過氧化氫進行比色測定。或者，在某些實施例中，刃天青 β -D-半乳呷喃糖可用作讀出。例如但不作為限制，若

偵測劑為 SBG，則讀出可藉由使用刃天青 β -D-半乳呷喃糖進行螢光測定。

【0098】 在某些實施例中，偵測劑例如 SBG 可以約 50 至約 500 pM 之濃度使用。例如但不作為限制，偵測劑可以以下濃度使用：約 50 至約 100 pM、約 50 至約 150 pM、約 50 至約 200 pM、約 50 至約 250 pM、約 50 至約 300 pM、約 50 至約 350 pM、約 50 至約 400 pM、約 50 至約 450 pM、約 100 至約 500 pM、約 150 至約 500 pM、約 200 至約 500 pM、約 250 至約 500 pM、約 300 至約 500 pM、約 350 至約 500 pM、約 400 至約 500 pM、約 450 至約 500 pM、約 100 至約 400 pM 或約 200 至約 400 pM。在某些實施例中，偵測劑可以約 100 pM 至約 400 pM 之濃度使用，例如 SBG 可以約 110 pM、約 155 pM 或約 310 pM 之濃度使用。在某些實施例中，SBG 以約 310 pM 之濃度使用。在某些實施例中，偵測劑例如 HRP 可以約 1/10 至約 1/1000 之稀釋度使用。例如但不作為限制，偵測劑可以以下稀釋度使用：約 1/10 至約 1/100、約 1/10 至約 1/500、約 1/100 至約 1/1000 或約 1/500 至約 1/1000。在某些實施例中，偵測劑可以約 1/100 至約 1/1000 之稀釋度使用，例如 HRP 可以約 1/100 或約 1/500 之稀釋度使用。

【0099】 在某些實施例中，本揭露之方法可包括以阻斷緩衝液阻斷捕捉抗體。在某些實施例中，阻斷緩衝液可包括 PBS、牛血清白蛋白(BSA)及/或殺生物劑，例如 ProClin™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)。在某些實施例中，該方法可包括多個洗滌步驟。在某些實施例中，用於洗滌之溶液通常為緩衝液(例如「洗滌緩衝液」)，諸如但不限於包括清潔劑諸如 Tween 20 之 PBS 緩衝液。例如但不作為限制，捕捉抗體可在阻斷後洗滌且/或樣品可與捕捉抗體分離以去除未經捕捉材料，例如藉由洗滌。

【0100】 在某些實施例中，本文所揭示之免疫檢定方法具有約 2 pg/ml 至約 20 pg/ml 之偵測敏感度，例如孔內敏感度。例如但不作為限制，本文所揭示之免疫

檢定具有以下敏感度：約 2 pg/ml 至約 3 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 4 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 5 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 6 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 7 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 8 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 10 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 11 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 12 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 13 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 14 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 15 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 16 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 17 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 18 pg/ml、約 2 pg/ml 至約 19 pg/ml、約 3 pg/ml 至約 15 pg/ml、約 3 pg/ml 至約 10 pg/ml 或約 3 pg/ml 至約 5 pg/ml。在某些實施例中，本文所揭示之免疫檢定具有約 2 pg/ml 或更大、1 pg/ml 或更大或 0.5 pg/ml 或更大之敏感度。在某些實施例中，本文所揭示之免疫檢定具有約 0.2 pg/ml 至約 2.0 pg/ml，例如約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml、約 0.2 pg/ml 至約 1.0 pg/ml 或約 0.2 pg/ml 至約 1.5 pg/ml 之偵測敏感度，例如孔內敏感度。例如但不作為限制，本文所揭示之免疫檢定，例如使用 Simoa HD-1 Analyzer™ 進行之單分子免疫檢定具有約 0.2 pg/ml 至約 0.5 pg/ml 之敏感度，例如孔內敏感度。

【0101】 藉由本揭露之免疫檢定方法分析之樣品可為臨床樣品、培養物中之細胞、細胞上清液、細胞裂解物、血清樣品、血漿樣品、其他生物流體(例如，淋巴液流體)樣品或組織樣品。在某些實施例中，樣品來源可為來自受試者之實體組織(例如，來自新鮮、冷凍及/或防腐器官、組織樣品、血清、血漿、生檢體或吸出物)或細胞。在某些實施例中，樣品為血液樣品。在某些實施例中，樣品為血漿樣品。在某些實施例中，樣品例如血液或血漿樣品可自受試者獲得且用一或多種蛋白酶、酯酶、DDP-IV 及/或磷酸酶抑制劑處理。例如但不作為限制，樣品可用蛋白酶及磷酸酶抑制劑之混合物例如 MS-SAFE (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)處理。在某些實施例中，樣品用抗凝劑處理或收集於含有抗凝劑例如 K₂-EDTA 之管中。在某些實施例中，樣品可使用 P800 血液收集系統(BD

Biosciences, San Jose, CA)收集。

【0102】 在某些實施例中，本揭露提供用於使用表面電漿子共振分析(SPR)量測治療劑之親和力的方法。例如，在標靶蛋白例如胞外囊泡上表現之 CD20 與抗標靶蛋白抗體例如抗 CD20 抗體之間的結合相互作用可藉由 SPR 分析來評估，其中表現標靶例如 CD20 之胞外囊泡可用作配體且抗標靶抗體例如抗 CD20 抗體可用作分析物。透過 SPR 分析，可計算解離平衡常數(K_D)、解離速率常數(k_d)及締合速率常數(k_a)值。在某些實施例中，治療劑可包括利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。在某些實施例中，如本文所述採用 SPR 分析以區分二或更多種抗標靶抗體。在某些實施例中，SPR 分析允許對抗標靶抗體進行分級。在某些實施例中，特定抗標靶抗體之選擇藉由經 SPR 分析對二或更多種抗標靶抗體進行分級且選擇最高分級之抗標靶抗體或藉由選擇表現出所要親和力之抗標靶抗體來進行。

III. 抗體

【0103】 本揭露進一步提高結合到 CD20 之抗體。本揭露之抗體適用於偵測且量化樣品中之 CD20 蛋白的水準。在某些實施例中，本揭露之抗體可用於本文所揭示之用於偵測且量化 CD20 蛋白的免疫檢定方法中。例如但不作為限制，本揭露之抗體可用於偵測樣品中之循環 CD20 蛋白的水準。

【0104】 在某些實施例中，本揭露之抗體可經人源化。在某些實施例中，本揭露之抗體包含接受體人類構架，例如人類免疫球蛋白構架或人類共同構架。在某些實施例中，本揭露之抗體可為單株抗體，包括嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。在某些實施例中，本揭露之抗體可為抗體片段，例如 Fv、Fab、Fab'、scFv、雙功能抗體或 F(ab')₂ 片段。在某些實施例中，抗體為 IgG。在某些實施例中，抗體選自 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4。在某些實施例中，抗體為全長抗體，

例如完整 IgG1 抗體或如本文所定義之其他抗體類別或同型。在某些實施例中，本文所揭示之抗體可經標記，例如經結合至生物素。在某些實施例中，本揭露之抗體可併有單獨或呈組合形式之如下文詳述之部分 1-7 中所述之任何特徵。

A. 示範性抗體

【0105】 在某些實施例中，本揭露之抗體例如抗 CD20 抗體之解離常數(K_D)為 $\leq 1\text{ M}$ 、 $\leq 100\text{ mM}$ 、 $\leq 10\text{ mM}$ 、 $\leq 1\text{ mM}$ 、 $\leq 100\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 10\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ 。在某些實施例中，本揭露之抗體可具有之 K_D 為約 10^{-3} 或更小或 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M 。在某些實施例中，本文所揭示之抗體可具有之 K_D 為約 10^{-10} M 至 10^{-13} M 。例如但不作為限制，本揭露之捕捉抗體或偵測劑抗體結合至其標靶抗原之 K_D 為約 10^{-10} M 至 10^{-13} M 。

【0106】 在某些實施例中， K_D 可藉由經放射性標記之抗原結合鑑定(RIA)量測。在某些實施例中，RIA 可用 Fab 型式之所關注抗體及其抗原進行。例如但不作為限制，藉由以下方法量測 Fab 對抗原之溶液結合親和力：在未標記抗原之滴定系列存在下，以最小濃度之經(^{125}I)標記抗原平衡 Fab，隨後以塗有抗 Fab 抗體之板捕捉結合之抗原(參見例如 Chen 等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999))。為了確立分析條件，將 MICROTITER[®] 多孔培養板(Thermo Scientific)用含 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗 Fab 抗體(Cappel Labs)之 50 mM 碳酸鈉(pH 9.6)塗佈隔夜，且隨後在室溫(大約 23°C)下用含 2% (w/v)牛血清白蛋白之 PBS 阻斷兩小時至五小時。在一非吸附板(Nunc #269620)中，將 100 pM 或 26 pM [^{125}I]抗原與所關注 Fab 之連續稀釋液混合(例如與 Presta 等人, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)中對抗 VEGF 抗體 Fab-12 之評估一致)。接著將所關注 Fab 培育過夜；然而，培育可持續更長時間(例如約 65 小時)以確保達到平衡。之後，將混合物轉移至捕捉板中，在室溫下培育

(例如一小時)。然後移除溶液，並用在 PBS 中之 0.1% 聚山梨酯 20 (TWEEN-20[®]) 洗滌板 8 次。當板乾燥時，添加 150 微升/孔閃爍體 (MICROSCINT-20[™]；Packard)，且在 TOPCOUNT[™] γ 計數器 (Packard) 上對盤計數十分鐘。選擇提供小於或等於 20% 最大結合之各 Fab 的濃度用於競爭性結合檢定。

【0107】 在某些實施例中， K_D 可使用 BIACORE[®] 表面電漿子共振檢定來量測。例如但不作為限制，使用 BIACORE[®]-2000、BIACORE[®]-3000、BIACORE X100 或 BIACORE T200 處理單元 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) 之檢定在 25°C 下使用 ~10 反應單位 (RU) 之固定抗原 CM5 晶片來進行。在某些實施例中，根據供應商之說明書，用 *N*-乙基-*N'*-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽 (EDC) 及 *N*-羥基丁二醯亞胺 (NHS) 來活化羧基甲基化葡聚糖生物感測器晶片 (CM5, Biacore, Inc.)。以 10 mM 乙酸鈉 (pH 4.8) 稀釋抗原至 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0.2 μM)，隨後以 5 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射，以實現約 10 個反應單位 (RU) 之偶合蛋白。在注射抗原後，注射 1 M 乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在 25°C 下將 Fab 之兩倍系列稀釋液 (0.78 nM 至 500 nM) 以約 25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注入到含有 0.05% 聚山梨酯 20 (TWEEN-20[™]) 界面活性劑 (PBST) 的 PBS 中。藉由同時擬合結合及解離感應圖，使用簡單一對一 Langmuir 結合模型 (BIACORE[®] 評估軟件版本 3.2) 計算締合速率 (k_{on}) 及解離速率 (k_{off})。平衡解離常數 (K_D) 可經計算為比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。參見例如 Chen 等人, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。若藉由以上表面電漿子共振檢定的締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則可藉由使用螢光淬滅技術來確定締合速率，該螢光淬滅技術量測在如在分光計 (諸如停流配備分光光度計 (Aviv Instruments) 或具有攪拌比色皿的 8000 系列 SLM-AMINCO[™] 分光光度計 (ThermoSpectronic)) 中所量測的在遞增濃度之抗原存在下，在 25°C 下於 PBS (pH 7.2) 中的 20 nM 抗抗原抗體 (Fab 形式) 之螢光發射強度 (激發 = 295 nm；發射 = 340 nm，16 nm 帶通) 的增加或降低。

1. 抗體片段

【0108】 在某些實施例中，本揭露之抗原抗體為抗體片段。抗體片段包括但不限於 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 及 scFv 片段，及下文所描述之其他片段。關於某些抗體片段之評述，參見 Hudson 等人 *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。關於 scFv 片段之回顧，參見例如 Pluckthün, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore 編, (Springer-Verlag, New York), 第 269-315 頁 (1994); 亦參見 WO 93/16185; 及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含補救受體結合抗原決定基殘基且具有延長之活體內半衰期的 Fab 及 F(ab')₂ 片段的討論，參見美國專利第 5,869,046 號。

【0109】 在某些實施例中，本揭露之抗體可為雙功能抗體。雙功能抗體為包含兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性的。參見例如 EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); 及 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。三抗體及四抗體為處於本揭露之抗體之範疇內的額外抗體片段，其亦描述於 Hudson 等人, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003)。

【0110】 在某些實施例中，本揭露之抗體可為單域抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域全部或一部分或輕鏈可變域全部或一部分的抗體片段。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis 公司, Waltham, MA; 參見例如美國專利第 6,248,516 B1 號)。

【0111】 抗體片段可藉由各種技術製備，該等技術包括但不限於如本文所述之蛋白水解消化完整抗體以及由重組宿主細胞(例如大腸桿菌或噬菌體)產生。

2. 嵌合及人類化抗體

【0112】 在某些實施例中，本揭露之抗體為嵌合抗體。某些嵌合抗體描述於

此項技術中，例如描述於美國專利第 4,816,567 號；及 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))中。在某些實施例中，本揭露之嵌合抗體包含非人類可變區(例如來源於小鼠、大鼠、倉鼠、兔、或非人類靈長類諸如猴的可變區)及人類恆定區。在進一步實例中，嵌合抗體可為「類別轉換」抗體，其中類別或子類別已自親本抗體之類別或子類別改變。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0113】 在某些實施例中，本揭露之嵌合抗體可為人源化抗體。通常，將非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保留非人類母抗體之特異性及親和力。一般而言，人源化抗體包含一或多個可變域，其中 HVR (或其部分)來源於非人類抗體，且 FR (或其部分)來源於人類抗體序列。人類化抗體視情況亦包含人類恆定區之至少一部分。在某些實施例中，人類化抗體中之一些 FR 殘基經來自非人類抗體(例如 HVR 殘基所來源之抗體)之相應殘基取代，例如以恢復或改善抗體特異性或親和力。

【0114】 人源化抗體及其製備方法評述於例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)中，且進一步描述於例如 Riechmann 等人, *Nature* 332:323-329 (1988)；Queen 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)；美國專利第 5,821,337 號、第 7,527,791 號、第 6,982,321 號及第 7,087,409 號；Kashmiri 等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述特異性決定區(SDR)移植)；Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述「表面重整」)；Dall'Acqua 等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述「FR 改組」)；及 Osbourn 等人, *Methods* 36:61-68 (2005)及 Klimka 等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述 FR 改組之「引導選擇」法)中。

【0115】 可用於人源化之人類框架區包括但不限於：使用「最佳擬合」方法

選擇之框架區(參見例如 Sims 等人, *J. Immunol.* 151:2296 (1993))；來源於輕鏈或重鏈可變區之具體亞群之人類抗體的共有序列之框架區(參見例如 Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；及 Presta 等人, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))；人類成熟(體細胞突變)框架區或人類生殖系框架區(參見例如 Almagro 及 Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))；及來源於篩選 FR 文庫之框架區(參見例如 Baca 等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及 Rosok 等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

3. 人類抗體

【0116】 在某些實施例中，本揭露之抗體可為人類抗體。人類抗體可以使用在此項技術中已知的各種技術來產生。人類抗體一般描述於 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)以及 Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)中。

【0117】 可以藉由向基因轉殖動物投與免疫原製備人類抗體，該基因轉殖動物經修飾以響應抗原性攻擊產生完整的人類抗體或具有人類可變區的完整抗體。此類動物通常含有人類免疫球蛋白基因座之全部或一部分，其置換內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合於動物之染色體中。在此類基因轉殖小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座一般已失活。關於自基因轉殖動物獲得人類抗體之方法之評述，參見 Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。亦參見例如描述 XENOMOUSE™ 技術之美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號；描述 HUMAB® 技術之美國專利第 5,770,429 號；描述 K-M MOUSE® 技術之美國專利第 7,041,870 號及描述 VELOCIMOUSE® 技術之美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號)。由此類動物生成之完整抗體之人類可變區可例如藉由與不同人類恆定區組合來經進一步修飾。

【0118】 人類抗體亦可藉由基於融合瘤之方法製備。已描述了用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株。(參見例如 Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984) ; Brodeur 等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 頁 (Marcel Dekker 公司, New York, 1987) ; 及 Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991) 。) 經由人類 B 細胞融合瘤技術生成之人類抗體亦描述於 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 中。另外的方法包括例如在美國專利第 7,189,826 號(描述了從融合瘤細胞株產生單株人類 IgM 抗體)及 Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006)(描述了人類-人類融合瘤)中描述的彼等方法。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術)亦描述於 Vollmers 及 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 及 Vollmers 及 Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005) 中。

【0119】 還可以藉由單離選自人源噬菌體顯示文庫之 Fv 純系可變域序列來生成人類抗體。隨後可以將此類可變域序列與所要之人類恆定域組合。用於自抗體文庫選擇人類抗體之技術如下所述。

4. 來源於文庫之抗體

【0120】 本揭露之抗體可藉由針對具有所需活性之抗體篩選組合文庫來分離。例如，此項技術中已知多種方法用於生成噬菌體顯示文庫及針對具有所需結合特徵之抗體篩選此類文庫。此類方法評述於例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001) , 且進一步描述於例如 McCafferty 等人, *Nature* 348:552-554 ; Clackson 等人, *Nature* 352: 624-628 (1991) ; Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992) ; Marks 及 Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo 編, Human Press, Totowa,

NJ, 2003) ; Sidhu 等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee 等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004) 。

【0121】 在某些噬菌體顯示方法中，藉由聚合酶鏈反應(PCR)分開選殖 VH 及 VL 基因之全庫且隨機重組於噬菌體文庫中，然後可篩選該等文庫中之抗原結合噬菌體，如 Winter 等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) 中所述。噬菌體通常顯示呈單鏈 Fv (scFv) 片段或 Fab 片段的抗體片段。來自免疫來源之文庫提供針對免疫原之高親和力抗體，而無需構築融合瘤。或者，可選殖(例如自人類選殖)天然譜系以提供單一來源之針對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原的抗體而不進行任何免疫，如 Griffiths 等人, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) 所述。在某些實施例中，天然文庫亦可以合成方式藉由自幹細胞選殖未經重排之 V 基因區段，且使用含有隨機序列以編碼高度可變 HVR 區及實現活體外重排之 PCR 引物來製得，如由 Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) 所描述。描述人類抗體噬菌體文庫之專利公開案包括例如：美國專利第 5,750,373 號、以及美國專利公開案第 2005/0079574 號、第 2005/0119455 號、第 2005/0266000 號、第 2007/0117126 號、第 2007/0160598 號、第 2007/0237764 號、第 2007/0292936 號、及第 2009/0002360 號。

【0122】 在本文中，認為自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段係人類抗體或人類抗體片段。

5. 多特異性抗體

【0123】 在某些實施例中，本揭露之抗體可為多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體為對至少兩個不同抗原決定基具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，一個結合特異性係針對存在於 CD20 上之抗原決定基且另

一個係針對任何其他抗原。可製備全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體。

【0124】 用於製備多特異性抗體之技術包括但不限於重組共表現具有不同特異性之兩對免疫球蛋白重鏈-輕鏈(參見 Milstein 及 Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829 及 Traunecker 等人 *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) 及「孔中結(knob-in-hole)」工程改造(參見例如美國專利第 5,731,168 號)。亦可藉由以下方法來製備多特異性抗體：設計用於製備抗體 Fc-異二聚體分子之靜電轉向效應(WO 2009/089004A1)；交聯兩種或兩種以上抗體或片段(參見例如美國專利第 4,676,980 號，及 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985))；使用白胺酸拉煉產生雙特異性抗體(參見例如 Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992))；使用「微型雙功能抗體」技術製備雙特異性抗體片段(參見例如 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；及使用單鏈 Fv (sFv)二聚體(參見例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994))；及如例如在 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所描述來製備三特異性抗體。

【0125】 本文亦包括具有三個或更多個功能性抗原結合位點的經工程改造之抗體，包括「章魚抗體(Octopus antibody)」(參見例如 US 2006/0025576A1)。

6. 抗體變異體

【0126】 本發明揭示之主題進一步提高所揭示抗體之胺基酸序列變異體。例如，可能需要改善抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當修飾引入至編碼該抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。此類修飾包括但不限於抗體之胺基酸序列內的殘基之缺失、及/或插入、及/或取代。可進行缺失、插入、及取代之任何組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終抗體，亦即經修飾抗體具有所需特徵，例如抗原結合。

a) 取代、插入及缺失變異體

【0127】 抗體變異體可具有一或多個胺基酸取代、插入及/或缺失。此類變化之所關注位點包括但不限於 HVR 及 FR。保守性取代之非限制性實例示於表 1 中之「較佳取代」標題下。更實質性改變之非限制性實例提供於表 1 中之「示範性取代」標題下，且在下文中關於胺基酸側鏈類別進一步描述。可將胺基酸取代引入所關注抗體中，且篩選具有所要活性之產物，該活性例如保留/改善之抗原結合、降低之免疫原性或改善之補體依賴性細胞毒性(CDC)或抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

表 1

初始殘基	示範性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	Norleucine ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據共有側鏈特性分組：

第 36 頁(發明說明書)

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0128】 在某些實施例中，非保守取代將需要將此等類別之一的成員交換為另一類別。

【0129】 在某些實施例中，一種類型之取代型變異體涉及取代親本抗體(例如人源化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選用於進一步研究之所得變異體相對於親本抗體將在某些生物特性方面具有修飾(例如改善)(諸如但不限於親和力提高、免疫原性降低)及/或將基本上保留親本抗體之某些生物特性。取代型變異體之非限制性實例為親和力成熟抗體，其可方便地生成，例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術，諸如本文所述之技術。簡言之，一或多個 HVR 殘基發生突變且該等變異體抗體在噬菌體上顯示且針對特定生物活性(例如，結合親和力)進行篩選。

【0130】 在某些實施例中，可在 HVR 中進行改變(例如取代)，例如以改善抗體親和力。該等改變可在 HVR「熱點」(亦即，由在體細胞成熟過程期間以高頻率經歷突變之密碼子編碼的殘基)(參見例如 Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))及/或接觸抗原之殘基中產生，其中所產生之變異體 VH 或 VL 針對結合親和力進行測試。藉由構築且自二級文庫重新選擇之親和力成熟已描述於例如 Hoogenboom 等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien 等人編, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中。在親和力成熟之某些實施例中，可藉

由多種方法(例如易錯 PCR、鏈改組或寡核苷酸定向突變誘發)中之任一者將多樣性引入選用於成熟之可變基因中。接著創建二級文庫。接著篩選該文庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體變異體。引入多樣性之另一種方法涉及 HVR 定向方法，其中使數個 HVR 殘基(例如一次 4-6 個殘基)進行隨機化。可例如使用丙胺酸掃描誘變或模型化來特異性地鑑別抗原結合中涉及的 HVR 殘基。

【0131】 在某些實施例中，取代、插入、及/或缺失可出現於一或多個 HVR 內，只要該等改變不會實質上降低該抗體結合抗原之能力。例如，可在 HVR 中產生不會實質上降低結合親和力之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。該等改變可例如在 HVR 中之抗原接觸殘基外部。在上文所提供之變異體 VH 及 VL 序列的某些實施例中，各 HVR 未改變，或含有不多於一個、兩個、或三個胺基酸取代。

【0132】 用於鑑別抗體中可經靶向用於突變誘發之殘基或區的適用方法係稱作「丙胺酸掃描突變誘發」，如由 Cunningham 及 Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085 所述。在此方法中，鑑別一殘基或一組標靶殘基(例如帶電殘基，諸如 arg、asp、his、lys 及 glu)且置換為中性或帶負電荷之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)以判定抗體與抗原之相互作用是否受影響。可在對初始取代展示功能敏感性之胺基酸位置處引入進一步取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構鑑別該抗體與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及相鄰殘基可經靶向或消除以作為取代之候選者。可篩選變異體以判定其是否含有所要特性。

【0133】 胺基酸序列插入包括在一個殘基至含有一百個或更多個殘基之多肽之長度範圍內的胺基及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有 N 端甲硫胺醯基殘基之抗體。該抗體分子之其他插入變異體包括該抗體的 N 端或 C 端融合至酶(例如，針對經抗體介導之酶前藥

療法(ADEPT))或增加該抗體之血清半衰期的多肽。

b) 糖基化變異體

【0134】 在某些實施例中，本揭露之抗體可經改變以增加或減小抗體糖基化之程度。例如但不作為限制，向抗體中添加糖基化位點或使抗體缺失糖基化位點可藉由改變胺基酸序列以便產生或移除一或多個糖基化位點來便利地實現。

【0135】 當本揭露之抗體包含 Fc 區時，可以改變與其連接之碳水化合物(若存在的話)。由哺乳動物細胞產生之天然抗體典型地包含分支鏈、雙觸角寡糖，該寡糖一般藉由 N-鍵聯連接至該 Fc 區之 CH2 域的 Asn297。參見例如 Wright 等人, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各種碳水化合物，例如甘露糖、N-乙醯基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸以及連接於雙觸角寡糖結構之「莖」中之 GlcNAc 的海藻糖。在某些實施例中，可對本揭露之抗體中的寡糖進行修飾以便產生具有某些經改善特性之抗體變異體。

【0136】 在某些實施例中，提供具有如下碳水化合物結構之抗體變異體，該碳水化合物結構無海藻糖(直接或間接)連接於 Fc 區。例如，此類抗體中的海藻糖量可為約 1%至約 80%、約 1%至約 65%、約 5%至約 65%或約 20%至約 40% 及其之間的值。

【0137】 在某些實施例中，海藻糖之量可藉由如例如 WO 2008/077546 中所述，如藉由 MALDI-TOF 質譜所量測，相對於連接於 Asn 297 之所有糖結構(例如複合、雜合及高甘露糖結構)之總和計算糖鏈中 Asn297 處海藻糖的平均量來確定。Asn297 係指位於 Fc 區中約 297 位(Fc 區殘基之 Eu 編號)之天冬醯胺殘基；然而，由於抗體中之微小序列變化，Asn297 亦可位於位置 297 上游或下游約±3 個胺基酸，亦即在位置 294 與 300 之間。該等海藻糖化變異體可具有經改善之 ADCC 功能。參見例如美國專利公開案 US 2003/0157108 (Presta, L.)；US

2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。關於「脫海藻糖基化」或「缺乏海藻糖」抗體變異體之公開案之實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki 等人 *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki 等人 *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。

【0138】 脫海藻糖基化抗體可在缺乏蛋白海藻糖基化之任何細胞株中產生。細胞株之實例包括缺乏蛋白海藻糖基化之 Lec13 CHO 細胞(Ripka 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第 US 2003/0157108 A1 號, Presta, L；及 WO 2004/056312 A1, Adams 等人, 尤其實例 11)及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因 *FUT8* 基因剔除 CHO 細胞(參見例如 Yamane-Ohnuki 等人, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)；Kanda, Y.等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)；及 WO2003/085107)。

【0139】 抗體變異體進一步具有平分寡醣，例如其中附接於抗體之 Fc 區上的雙觸角寡醣藉由 GlcNAc 平分。該等抗體變異體可具有降低之海藻糖化及/或經改善之 ADCC 功能。此類抗體變異體之非限制性實例描述於例如 WO 2003/011878 (Jean-Mairet 等人)；美國專利第 6,602,684 號(Umana 等人)；及 US 2005/0123546 (Umana 等人)中。亦提供在連接至 Fc 區之寡醣中具有至少一個半乳糖殘基之抗體變異體。此類抗體變異體可具有經改善之 CDC 功能。此類抗體變異體描述於例如 WO 1997/30087 (Patel 等人)；WO 1998/58964 (Raju, S.)；及 WO 1999/22764 (Raju, S.)中。

c) Fc 區變異體

【0140】 在某些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入至本文所提供之抗體的 Fc 區中，從而生成 Fc 區變異體。Fc 區變異體可包含人類 Fc 區序列(例如人類 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 區)，其在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸修飾(例如取代)。

【0141】 在某些實施例中，本揭露提供具有一些而非全部效應功能之抗體變異體。此類有限效應功能可使抗體變異體成為其中抗體的活體內半衰期至關重要而某些效應功能(諸如補體及 ADCC)非必需或有害之應用的所需候選物。可進行體外及/或體內細胞毒性檢定以確認 CDC 及/或 ADCC 活性的降低/減少。例如，可進行 Fc 受體(FcR)結合檢定以確保抗體缺乏 Fc γ R 結合(因此有可能缺乏 ADCC 活性)，但保留 FcRn 結合能力。介導 ADCC 之原代細胞 NK 細胞僅表現 Fc γ RIII，而單核細胞表現 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII。造血細胞上之 FcR 表現概述於 Ravetch 及 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)第 464 頁之表 3 中。用於評估所關注分子之 ADCC 活性的活體外檢定的非限制性實例描述於美國專利第 5,500,362 號 (參見例如 Hellstrom, I. 等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) 及 Hellstrom, I 等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (參見 Bruggemann, M. 等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。或者，可採用非放射性檢定方法(參見例如用於流式細胞術的 ACTI™ 非放射性細胞毒性檢定(Cell Technology 公司 Mountain View, CA)；以及 CYTOTOX 96®非放射性細胞毒性檢定(Promega, Madison, WI)。適用於該等檢定之效應細胞包括外周血單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，所關注分子之 ADCC 活性可例如在動物模型中進行體內評估，諸如 Clynes 等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 95:652-656 (1998)中揭示之動物模型。還可進行 C1q 結合檢定以確認抗體不能結合 C1q 並且因此缺乏 CDC 活性。參見例如 WO 2006/029879

及 WO 2005/100402 中之 C1q 及 C3c 結合 ELISA。為了評估補體活化，可進行 CDC 檢定(參見例如 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996) ; Cragg, M.S.等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 及 Cragg, M.S.及 M.J.Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可使用此項技術中已知之方法對 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期進行測定(參見例如 Petkova, S.B. 等人, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。在某些實施例中，可在 Fc 區中進行改變，從而產生改變(亦即改善或減少之) C1q 結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)，例如，如美國專利第 6,194,551 號、WO 99/51642 及 Idusogie 等人 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)中所述。

【0142】 效應功能減小之抗體包括具有 Fc 區殘基 238、265、269、270、297、327、及 329 中之一或多者之取代的彼等抗體(美國專利第 6,737,056 號)。此類 Fc 突變體包括具有胺基酸 265、269、270、297、及 327 位中之二或更多者之取代的 Fc 突變體，包括殘基 265 及 297 取代為丙胺酸的所謂「DANA」Fc 突變體(美國專利第 7,332,581 號)。

【0143】 描述了具有經改善或減弱之與 FcR 之結合的某些抗體變異體。(參見例如美國專利第 6,737,056 號; WO 2004/056312 及 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001))。

【0144】 在某些實施例中，本揭露之抗體變異體包含具有改善 ADCC 之一或多個胺基酸取代，例如 Fc 區之位置 298、333 及/或 334 (殘基之 EU 編號)處之取代的 Fc 區。

【0145】 在某些實施例中，在本文所揭示之抗體(例如雙特異性抗體)之 Fc 區中進行之改變可產生具有增加之半衰期及經改善之與新生兒 Fc 受體(FcRn)的結合之變異體抗體，其描述於 US2005/0014934A1 (Hinton 等人)中，該新生兒 Fc

受體(FcRn)負責將母體 IgG 轉移至胎兒(Guyer 等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。彼等抗體包含其中具有一或多個取代之 Fc 區，該等取代改善 Fc 區與 FcRn 之結合。該等 Fc 變異體包括在 Fc 區殘基中之一或多者處具有取代之彼等變異體：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434，例如 Fc 區殘基 434 處的取代(美國專利第 7,371,826 號)。

【0146】 亦參見 Duncan 及 Winter, *Nature* 322:738-40 (1988)；美國專利第 5,648,260 號；美國專利第 5,624,821 號；及 WO 94/29351，其涉及 Fc 區變異體之其他實例。

d) 半胱胺酸工程改造抗體變異體

【0147】 在某些實施例中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在具體實施例中，經取代殘基存在於抗體之可及位點處。藉由經半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基由此經定位於抗體之可及位點處且可用於使抗體綴合於其他部分(諸如藥物部分或連接子-藥物部分)以產生免疫綴合物，如本文中進一步描述。在某些實施例中，以下殘基中之任一者或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之 V205 (Kabat 編號)；重鏈之 A118 (EU 編號)；及重鏈 Fc 區之 S400 (EU 編號)。半胱胺酸工程改造之抗體可如例如美國專利第 7,521,541 號中所述生成。

e) 抗體衍生物

【0148】 在某些實施例中，本揭露之抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且易於獲得之其它非蛋白質部分。適於使抗體衍生化的部分包括但不限於水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括但不限於聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧基甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、

聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由於其在水中之穩定性而可在製造中具有優勢。該聚合物可具有任何分子量，且可具有分支或無分支。連接至抗體之聚合物的數目可變化，且若連接多於一種聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生化之聚合物的數目及/或類型可基於多種考慮因素確定，該等考慮因素包括但不限於欲改善之抗體之特定特性或功能、抗體衍生物是否將在規定條件下用於療法等。

【0149】 在某些實施例中，提供抗體與可藉由暴露於輻射中而選擇性地加熱之非蛋白質部分的結合物。在一個實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11600-11605 (2005))。在某些實施例中，輻射可具有任何波長，並且包括但不限於不損害普通細胞但會將非蛋白質部分加熱至殺死鄰近於抗體-非蛋白質部分的細胞的溫度的波長。

B. 抗體產生方法

【0150】 本文所揭示之抗體(例如捕捉抗體及/或偵測抗體)可使用此項技術中任何可用或已知之技術產生。例如但不作為限制，可使用例如如美國專利第 4,816,567 號中所描述之重組法及組成物產生抗體。生成抗體之詳細規程描述於以下實例中。

【0151】 本發明揭示之主題進一步提供一種編碼本文所揭示之抗體的經分離核酸。舉例而言，經分離核酸可編碼包括抗體之 VL 的胺基酸序列及/或包含抗體之 VH(例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)的胺基酸序列。

【0152】 在某些實施例中，核酸可存在於一或多種載體中，例如表現載體。

如本文所用，術語「載體」係指能夠輸送其已連接之另一核酸的核酸分子。一種類型之載體為「質體」，其係指其中可接合額外 DNA 區段之環狀雙鏈 DNA 環。另一類型之載體為病毒載體，其中其他 DNA 區段可接合至病毒基因組。某些載體能夠在引有其之宿主細胞(例如具有細菌複製起點之細菌載體，及遊離型哺乳動物載體)中自體複製。其他載體(例如非遊離型哺乳動物載體)在引入至宿主細胞中時整合至宿主細胞之基因組中，藉此連同宿主基因組一起複製。此外，某些載體(表現載體)能夠引導其可操作地連接之基因之表現。一般而言，表現載體在重組 DNA 技術中之效用經常呈質體(載體)形式。然而，所揭示之主題意欲包括表現載體之此等其他形式，諸如病毒載體(例如複製缺陷反轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)，其提供等效功能。

【0153】 在某些實施例中，編碼本揭露之抗體之核酸及/或包括該核酸之一或多個載體可引入至宿主細胞。在某些實施例中，將核酸引入至細胞可藉由此項技術中已知之任何方法來進行，該等方法包括但不限於轉染、電穿孔、顯微注射、用含有核酸序列之病毒或噬菌體載體感染、細胞輸注、經染色體介導之基因轉移、經微細胞介導之基因轉移、原生質球融合等。在某些實施例中，宿主細胞可包括以下項，例如已經以下項轉型：(1)包含核酸之載體，該核酸編碼包含抗體之 VL 的胺基酸序列及包含抗體之 VH 的胺基酸序列；或(2)包含編碼包含抗體之 VL 的胺基酸序列之核酸的第一載體及包含編碼包含抗體之 VH 的胺基酸序列之核酸的第二載體。在某些實施例中，宿主細胞為真核的，例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或淋巴樣細胞(例如 Y0、NS0、Sp20 細胞)。

【0154】 在某些實施例中，製備所揭示之抗 CD20 抗體之方法可包括在適於表現該抗體之條件下培養其中已引入編碼該抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自該宿主細胞及/或宿主細胞培養基回收該抗體。在某些實施例中，抗體透過層

析技術自宿主細胞回收。

【0155】 對於本揭露之抗體之重組產生，可分離編碼例如如上文所描述之抗體的核酸，且將其插入至一或多種載體中以用於在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此類核酸可易於使用習知程序(例如，藉由使用能夠特異性地結合於編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及定序。

【0156】 用於選殖或表現編碼抗體之載體的合適宿主細胞包括本文所述之原核或真核細胞。舉例而言，抗體可於細菌中產生，在不需要糖基化及 Fc 效應功能時尤其如此。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見，例如 U.S.專利第 5,648,237 號、第 5,789,199 號及第 5,840,523 號。(亦參見 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷 (B.K.C.Lo 編, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 頁, 描述抗體片段在大腸桿菌中之表現。)在表現之後，可以可溶性級分自細菌細胞糊狀物分離抗體且其可進一步經純化。

【0157】 除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適合用於編碼抗體之載體的選殖或表現宿主，包括糖基化路徑已經「人源化」，從而使得所產生之抗體具有部分或完全人類糖基化型態的真菌及酵母菌株。參見 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004)及 Li 等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)。適合用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦可來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

【0158】 適合用於表現糖基化抗體之宿主細胞亦來源於多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別出眾多可與昆蟲細胞聯合使用，尤其用於轉染草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞之桿狀病毒株。

【0159】 在某些實施例中，植物細胞培養物可用作宿主細胞。參見，例如，美國專利第 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 及 6,417,429 號(描述用於在轉殖基因植物中產生抗體之 PLANTIBODIES™ 技術)。

【0160】 在某些實施例中，脊椎動物細胞亦可用作宿主。例如但不作為限制，適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞株可為有用的。適用哺乳動物宿主細胞株之非限制性實例為藉由 SV40(COS-7)轉型之猴腎 CV1 細胞株；人類胚胎腎細胞株(293 或 293 細胞，如例如 Graham 等人 *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)所描述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞爾托利細胞(TM4 細胞，如例如 Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)所描述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；布法羅大鼠肝臟細胞(BRL3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(HepG2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；TRI 細胞，如例如 Mather 等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)所描述；MRC 5 細胞；及 FS4 細胞。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括 DHFR- CHO 細胞(Urlaub 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；及骨髓瘤細胞株，諸如 Y0、NS0 及 Sp2/0。關於適於抗體製造之某些哺乳動物宿主細胞株之評述，參見例如 Yazaki 及 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第 248 卷 (B.K.C. Lo 編, Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 頁 (2003)。

【0161】 在某些實施例中，用於製備雙特異性抗體及/或多特異性抗體之技術包括但不限於重組共表現具有不同特異性之兩對免疫球蛋白重鏈-輕鏈(參見 Milstein 及 Cuello, *Nature* 305: 537 (1983))、PCT 專利申請案第 WO 93/08829 號及 Traunecker 等人, *EMBO J.* 10: 3655 (1991))及「孔中結(knob-in-hole)」工程改造(參見例如美國專利第 5,731,168 號)。雙特異性抗體亦可藉由以下方式來製備：工程改造用於製備抗體 Fc 異二聚體分子之靜電牽引效應(WO 2009/089004A1)；使兩

個或兩個以上抗體或片段交聯(參見例如美國專利第4,676,980號及 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985)); 使用白胺酸拉鍊以產生雙特異性抗體(參見例如 Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); 使用「雙功能抗體」技術來製備雙特異性抗體片段(參見例如 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); 及使用單鏈 Fv(sFv)二聚體(參見例如 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); 及如例如 Tutt 等人 *J. Immunol.* 147: 60 (1991)中所述製備三特異性抗體。

【0162】 本揭露之雙特異性分子及多特異性分子亦可使用化學技術(參見例如 Kranz (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807)、 「多瘤病毒(polydoma)」技術(參見例如美國專利 4,474,893)或重組 DNA 技術來製成。本發明揭示之主題之雙特異性分子及多特異性分子亦可藉由使用此項技術中已知且如本文所述之方法將組成型結合特異性(例如第一抗原決定基結合特異性及第二抗原決定基結合特異性)結合在一起來製備。例如但不作為限制，雙特異性及多特異性分子之各種結合特異性可單獨生成且隨後彼此結合。當該等結合特異性為蛋白質或肽時，多種偶聯或交聯劑可用於共價結合。交聯劑之非限制性實例包括蛋白 A、碳化二亞胺、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸鹽(SATA)、N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸鹽(SPDP)、及磺基丁二醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸鹽(磺基-SMCC) (參見例如 Karpovsky (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686 ; Liu (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他方法包括 Paulus (*Behring Ins. Mitt.* (1985) 第 78 卷, 118-132 ; Brennan (1985) *Science* 229:81-83), Glennie (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375)所描述之彼等者。當該等結合特異性為抗體(例如，兩個人源化抗體)時，其可經由兩條重鏈之 C 端鉸鏈區之巰基鍵結而結合。在某些實施例中，鉸鏈區可在結合之前經修飾以含有奇數個(例如一個)

巰基殘基。

【0163】 在某些實施例中，雙特異性抗體之兩種結合特異性可於同一載體中編碼且於同一宿主細胞中表現並組裝。在該雙特異性及多特異性分子為 MAb x MAb、MAb x Fab、Fab x F(ab')₂ 或配體 x Fab 融合蛋白之情況下，該方法尤其有用。在某些實施例中，本揭露之雙特異性抗體可為單鏈分子，諸如單鏈雙特異性抗體、包含一個單鏈抗體及結合決定基之單鏈雙特異性分子或包含兩個結合決定基之單鏈雙特異性分子。雙特異性分子及多特異性分子亦可為單鏈分子或可包含至少兩個單鏈分子。用於製備雙特異性分子及多特異性分子之方法例如描述於以下專利中：美國專利第 5,260,203 號；美國專利第 5,455,030 號；美國專利第 4,881,175 號；美國專利第 5,132,405 號；美國專利第 5,091,513 號；美國專利第 5,476,786 號；美國專利第 5,013,653 號；美國專利第 5,258,498 號；及美國專利第 5,482,858 號。本文亦包括具有三個或更多個功能性抗原結合位點(例如，抗原決定基結合位點)的經工程改造抗體，包括「章魚抗體(Octopus antibody)」(參見例如 US 2006/0025576A1)。

【0164】 在某些實施例中，動物系統可用於產生本揭露之抗體。用於製備融合瘤之一種動物系統為鼠類系統。小鼠中之融合瘤產生為經極良好建立的規程。用於分離融合物之經免疫脾細胞的免疫方案及技術為此項技術中已知的。融合搭配物(例如，鼠類骨髓瘤細胞)及融合規程亦為已知的(參見例如 Harlow 及 Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York)。

IV. 套組

【0165】 本發明揭示之主題進一步提供含有適用於進行本文所揭示之免疫檢定的材料的套組。在某些實施例中，套組包括含有本文所揭示之抗體例如抗

CD20 抗體之容器。適合容器之非限制性實例包括瓶、測試管、小瓶及微量滴定板。容器可由多種材料諸如玻璃或塑膠形成。在某些實施例中，套組進一步包括提供關於在所揭示之免疫檢定方法中使用抗體例如抗 CD20 抗體之說明書的包裝插頁。

【0166】 在某些實施例中，套組可包括含有一或多種抗體之一或多個容器。例如但不作為限制，套組可包括有包括捕捉抗體之至少一個容器及包括偵測劑抗體之至少一個容器。

【0167】 在某些實施例中，用於偵測樣品中之腫瘤抗原蛋白之套組包括含有結合到存在於標靶蛋白之胺基酸序列內之抗原決定基的捕捉抗體的第一容器、含有結合到存在於標靶蛋白之胺基酸序列內之抗原決定基的偵測劑抗體的第二容器及含有偵測劑之第三容器。在某些實施例中，捕捉抗體及偵測劑抗體結合到存在於標靶蛋白之胺基酸序列內的不同抗原決定基。

【0168】 在某些實施例中，捕捉抗體及/或偵測劑抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【0169】 在某些實施例中，捕捉抗體及/或偵測劑抗體可以約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度提供於本揭露之套組中。舉例而言，捕捉抗體及/或偵測劑抗體可以約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 5.0 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度提供於 ELISA 套組中。在非限制性實施例中，捕捉抗體及/或偵測劑抗體可以約 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 至約 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 之濃度提供於 Quanterix 套組中。在某些實施例中，偵測劑抗體可經標記，例如經生物素標記。

【0170】 在某些實施例中，提供於本揭露之套組中之偵測劑可為抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白-HRP 或鏈黴抗生物素蛋白- β -D-半乳呷喃糖(SBG)。在某些實施例中，本揭露之套組可進一步包括四甲基聯苯胺、過氧化氫及/或刃天青

β -D-半乳呷喃糖。在某些實施例中，若套組包括鏈黴抗生物素蛋白-HRP，則該套組可進一步包括四甲基聯苯胺及過氧化氫。在某些實施例中，若套組包括 SBG，則該套組可進一步包括刃天青 β -D-半乳呷喃糖。在某些實施例中，SBG 可以約 100 pM 至約 400 pM 之濃度提供於套組。

【0171】 在某些實施例中，可提供捕捉抗體，其連接至固體支持物表面，諸如例如但不限於板或珠粒，例如順磁珠粒。或者或另外，套組進一步包括可偶合至捕捉抗體之固體支持物表面。在某些實施例中，固體支持物可為順磁珠粒且可以約 0.1×10^7 個珠粒/ml 至約 10.0×10^7 個珠粒/ml 之濃度提供。

【0172】 或者或另外，套組可包括自商業及使用者觀點來看所需要之其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、及過濾器。在某些實施例中，套組可包括用於收集且/或處理血液樣品之材料。

【0173】 以下實例僅說明本發明所揭示之主題且不應視為以任何方式限制。

IV. 示範性實施例

【0174】 A1. 在某些非限制性實施例中，本揭露提供用於偵測樣品中之膜相關蛋白的檢定，該樣品包含：捕捉抗體，其結合到該樣品中包含該膜相關蛋白之胞外囊泡，從而生成捕捉抗體-胞外囊泡複合物；及 b) 偵測抗體，其結合到該捕捉抗體-胞外囊泡複合物以形成可偵測結合複合物，其中來自該可偵測結合複合物之信號係針對自包含該蛋白之胞外囊泡偵測之一或多個已知值來校準。

【0175】 A2. 在 A1 之某些實施例中，該捕捉抗體不與該偵測抗體競爭結合。

【0176】 A3. 在 A1 及 A2 之某些實施例中，該捕捉抗體所結合之抗原決定基與該偵測抗體所結合之抗原決定基不同。

【0177】 A4. 在 A1-A3 之某些實施例中，該膜相關蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴

CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0178】 A5. 在 A1-A4 之某些實施例中，該捕捉抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、及其組合。

【0179】 A6. 在 A1-A5 之某些實施例中，該偵測抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、及其組合。

【0180】 A7. 在 A1-A6 之某些實施例中，該檢定進一步包含胞外囊泡校準物。

【0181】 A8. 在 A1-A7 之某些實施例中，該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【0182】 B1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：a)確定該樣品之胞外囊泡中之標靶蛋白的水準；及 b)比較該樣品之該等胞外囊泡中之該標靶蛋白的水準與使用包含該標靶蛋白之胞外囊泡生成之校準曲線。

【0183】 B2. 在 B1 之某些實施例中，該標靶蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0184】 B3. 在 B1 或 B2 之某些實施例中，該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【0185】 B4. 在 B1-B3 之某些實施例中，該標靶蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【0186】 B5. 在 B1-B4 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外囊泡標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0187】 C1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：a)使用包含該蛋白之胞外囊泡生成校準曲線；及 b)比較該樣品之胞外囊泡中之該蛋白的水準與該校準曲線以確定該樣品之胞外囊泡中之該蛋白的量。

【0188】 C2. 在 C1 之某些實施例中，該蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0189】 C3. 在 C1 或 C2 之某些實施例中，該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【0190】 C4. 在 C1-C3 之某些實施例中，該循環蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【0191】 C5. 在 C1-C4 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外囊泡標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0192】 D1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種用於確定患有 B 細胞淋巴瘤之環狀是否可能表現出對抗 CD20 療法之反應的方法，其包含以下步驟：a)自患者獲得樣品；b)確定樣品之胞外囊泡中之循環 CD20 的量；c)比較樣品之胞外囊泡中之 CD20 的水準與使用包含 CD20 之胞外囊泡生成的校準曲線；

及 d)基於樣品中確定之胞外囊泡中之循環 CD20 的量，確定該患者是否可能表現出對 CD20 療法的反應。

【0193】 D2. 在 D1 之某些實施例中，該抗 CD20 療法包含投與抗 CD20 抗體。

【0194】 D3. 在 D1 或 D2 之某些實施例中，該抗 CD20 抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【0195】 D4. 在 D1-D3 之某些實施例中，該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【0196】 D5. 在 D1-D4 之某些實施例中，該循環蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【0197】 D6. 在 D1-D5 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0198】 E1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種用於確定抗 CD20 抗體之親和力的方法，其包含使該抗 CD20 抗體經歷表面電漿子共振(SPR)分析，其中該 SPR 分析包含使用表現 CD20 之胞外囊泡作為配體及使用該抗 CD20 抗體作為分析物。

【0199】 E2. 在 E1 之某些實施例中，該抗 CD20 抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【0200】 E3. 在 E1-E2 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0201】 F1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種用於確定自患者獲得

之 T 細胞之活化的方法，其包含 a)將表現 CD20 之胞外囊泡與 T 細胞及 CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體一起溫育；及 b)確定 T 細胞之活化。

【0202】 F2. 在 F1 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0203】 G1. 在某些非限制性實施例中，本揭露涉及一種治療有需要之受試者之腫瘤的方法，其包含：a)自該受試者獲得樣品；b)使用包含腫瘤抗原之胞外囊泡生成校準曲線；c)比較該樣品之胞外囊泡中之該腫瘤抗原的水準與該校準曲線以確定該樣品之該等胞外囊泡中之該標靶腫瘤抗原的量；d)基於該樣品之胞外囊泡中之該腫瘤抗原的水準，確定該受試者是否可能表現出對抗體療法之反應；及 e)回應於 d)中之該確定投與治療劑。

【0204】 G2. 在 G1 之某些實施例中，該方法進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【0205】 G3. 在 G1-G2 之某些實施例中，該抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、及其組合。

【0206】 G4. 在 G1-G3 之某些實施例中，該標靶腫瘤抗原選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【0207】 G5. 在 G1-G4 之某些實施例中，該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【0208】 G6. 在 G1-G5 之某些實施例中，該循環腫瘤抗原之濃度及該校準曲

線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

實例

實例 1. 腫瘤抗原檢定校準曲線之製備

A. 表現腫瘤抗原之細胞的培養

【0209】 種子品種維持：每 3 至 4 日傳代種子罐。對於 3 日傳代，將細胞以 0.8×10^6 個細胞/mL 接種於不帶擋板搖瓶中之 32% 填充物(例如 250 mL 不帶擋板搖瓶中之 80 mL 填充物)或 50% 填充物(例如 2 L 不帶擋板搖瓶中之 1 L 填充物) Expi293 表現培養基中；在 125 rpm (32% 填充物)或 160 rpm (50% 填充物)、25 mm 軌道直徑下攪拌，且在 8% CO₂、80% 濕度、37°C 下溫育；細胞應生長至 $>4 \times 10^6$ 個細胞/mL、>95% 活力。對於 4 日傳代，將細胞以 0.4×10^6 個細胞/mL 接種於不帶擋板搖瓶中之 32% 填充物(例如 250 mL 不帶擋板搖瓶中之 80 mL 填充物)或 50% 填充物(例如 2 L 不帶擋板搖瓶中之 1 L 填充物) Expi293 表現培養基中；在 125 rpm (32% 填充物)或 160 rpm (50% 填充物)、25 mm 軌道直徑下攪拌，且在 8% CO₂、80% 濕度、37°C 下溫育；細胞應生長至 $>4 \times 10^6$ 個細胞/mL、>95% 活力。

【0210】 種子生產培養物：將 Expi293 種子罐在 Hyclone HyCell TransFX-H 培養基、10 mg/mL 慶大黴素(A466)、10% pluronic F-68、20 mM L-麩醯胺酸(A0821) 中培養。將容器及 125 mL 搖瓶/50 mL 生物反應器管(tubespin)用於稀釋。

【0211】 計數種子罐培養物之活細胞密度及活力(在 $>4 \times 10^6$ 個細胞/mL、>95% 活力下)：計算轉染所需要之培養物體積($V_F = 30 \text{ mL} \times \text{轉染之次數}$)。

【0212】 製備產物培養基：向 Hyclone 培養基補充 0.5 g/L pluronic F-68 (將 5 mL 10% pluronic F-68 添加到 1 L Hyclone 培養基)；4 mM L-麩醯胺酸(將 20 mL 20 mM L-麩醯胺酸(A0821)添加至 1 L Hyclone 培養基中)；及 0.21 g/L 慶大黴素(將 21 mL 10 mg/mL 慶大黴素(A466)添加至 1 L Hyclone 培養基)(視情況)。

【0213】 將 Expi293 種子罐以適當量之生產培養基稀釋至 2.0×10^6 個細胞/mL；

這為將轉染之培養物。使用以下公式計算稀釋所需要之種子罐培養物：

$$V_C = \frac{X_F V_F}{X_C}$$

其中：

V_C =所需種子罐培養物體積(mL)

X_F =用於轉染之最終所要活細胞密度(2.0×10^6 個細胞/mL)

V_F =全部轉染所需要之最終培養體積(mL)

X_C =種子罐培養物活細胞密度(個細胞/mL)

【0214】 將 Expi293 生產培養物稀釋液每個燒瓶/生物反應器管等分 25.5 mL。將燒瓶/生物反應器管置於 37°C、8% CO₂、125 rpm (25 mm 軌道直徑之燒瓶)或 225 rpm (50 mm 軌道直徑之生物反應器管)下且使其平衡(至少 15 分鐘)。

B. 胞外囊泡腫瘤抗原校準物純化方案

【0215】 收集經 pB_EF1_hCD20 構築體轉染之 Expi293 7 日培養物且在 500 g 旋轉 10 min。將上清液傾析到另一個 50 ml 錐形瓶中且在 2000 g 下旋轉 10 min。將上清液傾析到 0.22 um 真空過濾器中且過濾。將經過濾培養基用 70 ml 離心濃縮機(Centricon Plus-70, UFC710008)濃縮：裝載 60 ml 上清液，在 3750 rpm、4°C 下達 10 min，輕輕混合上清液；在 3750 rpm、4°C 下達 10 min；傾析出濾液，添加更多上清液，旋轉更多次，直到體積小於 12 ml。將濃縮物在 750 g (最大值 1000 g)、4°C 下回收 2 min。將濃縮物旋轉不超過 10 min 以避免沉澱及聚集。將經濃縮培養基在超速離心機中在 30k rpm、4°C 下旋轉 75 min。將管在 0.01 g 內與 PBS(包括不具有樣品之 PBS)適當平衡(使用 H₂O 平衡)。Accel 及 Decel 二者皆使用最大值。傾析出上清液。沉澱應為在管底部可見。將沉澱重懸浮於 500 uL PBS 中且然後用 12 mL 1X PBS 再填充超離心管。將混合物再次與 PBS 平衡且在 30k

rpm (100,000 g)、4°C下再離心 75 min。倒掉上清液且將沉澱輕輕重懸浮於 0.5 至 1 ml PBS 中。

C. 藉由西方墨點法進行 EV 腫瘤抗原校準物賦值

【0216】 圖 2 描繪如本文所述製備之 EV 腫瘤抗原校準物之示範性表徵，其中該等值藉由西方墨點法賦予。第 1 列表示標記物，第 2 列表示 EV 2 ug，第 3 列表示 EV 1 ug，第 4 列表示 EV 0.5 ug，第 5 列表示 EV 0.25 ug，第 6 列表示 rhCD20 250 ng，第 7 列表示 rCD20 100 ng，第 8 列表示 rCD20 40 ng，第 9 列表示 rCD20 16 ng，且第 10 列表示 rCD20 6.4 ng。

【0217】 圖 3 證實使用抗 CD20 Ab 作為捕捉及使用抗 CD20 作為偵測或使用抗跨膜四蛋白抗體作為偵測的 CD20 於來自正常及 NHL (例如，DLBCL 及 FL) 供體之血漿樣品中的存在。跨膜四蛋白抗體亦可用於偵測 CD20 於胞外囊泡中之存在。舉例而言，使用 CD20 進行捕捉且使用 CD81、CD9、CD63 進行偵測表明該等標記物為共定位的且 CD20 存在於膜(或胞外囊泡)中。由於並非所有囊胚具有全部或相同標記物，因此需要混合物進行偵測。

【0218】 圖 4 示出在使用抗 CD20 抗體偵測來自正常及 NHL (例如 DLBCL 及 FL) 之血漿中之 CD 20 時之示範性 ELISA 格式。圖 4 中之 ELISA 資料示出在未超速離心之情況下該等標記物於乾淨血漿中共定位之證據。

D. 藉由 Quanterix 得到之 EV 腫瘤抗原標準曲線

【0219】 將以下材料用於 Quanterix 檢定：a)標準曲線及樣品稀釋液 PBS、1.5% BSA、0.05%聚山梨醇酯 20、0.05% Proclin 300、pH 7.4；b)抗 DIG 抗體偶合珠粒；c)作為 CD20 抗原之捕捉抗體的經 DIG 偶合奧法珠單抗；d)作為偵測抗體之經生物素偶合奧法珠單抗；e)作為酶試劑之鏈黴抗生物素蛋白偶合 β 半乳糖苷酶 (SBG)；及 f)用作信號之報告基因的 SBG 之受質 RGP (亦參考圖 10)

【0220】 將胞外囊泡中表現之 CD20 以 500 ng/mL 起始濃度以標準曲線稀釋液稀釋。進行十次 2 倍連續稀釋至 0.5 ng/mL 最終濃度。將十一個水準加上非特異性空白移液到 Quanterix 聚丙烯低結合板。製備在 PBS、1.5% BSA、0.05% 聚山梨醇酯 20、0.05% Proclin 300、pH 7.4 中稀釋至 0.5 ug/mL 之偵測劑及捕捉抗體且將其裝載到儀器上，之後裝載到 96 孔板中。將酶試劑 SA β 半乳糖苷酶以其自身緩衝液稀釋至 150 pM 之濃度。將原始資料以 excel cvs 文件形式自儀器下載且使用具有 5pl 擬合之 SoftMax Pro 軟體迴歸。表 2 提供藉由 Quanterix 得到之示範性 EV CD20 標準曲線。

表 2. 藉由 Quanterix 得到之 EV CD20 標準曲線

標稱濃度 (ng/ml)	AEB	AEB CV(%)	經檢定濃度 (ng/ml)	CV (經檢定濃度) (%)	自標稱物回收(%)
非特異性信號	0.048	5.635			
0.488	0.058	1.0	0.24	22.6	49
0.977	0.066	5.0	0.91	29.3	92.9
1.953	0.083	4.0	2.16	11.5	111
3.906	0.115	7.7	4.51	13.7	116
7.813	0.167	2.8	8.00	3.9	102
15.625	0.292	3.5	15.9	3.9	102
31.25	0.517	4.7	29.4	4.9	94.1
62.5	0.964	4.2	54.8	4.1	87.8
125	2.679	9.4	147	9.1	118
250	5.007	1.2	271	1.2	109
500	8.773	1.2	478	1.3	95.6

實例 2. 在具有及不具有校準曲線之情況下偵測腫瘤抗原

【0221】 **血漿收集**。收集 6 mL 全血且將其轉移至血漿淡紫色頂部真空采血管 (血漿收集管, BD #367863)。收集管完全填充, 直至血流停止。在全血收集之後, 將血漿淡紫色頂部真空采血管輕輕且完全倒置 5 次以均勻混合。藉由劇烈倒置管未破壞紅血細胞。細胞裂解可導致樣本降解。在血液收集之後立即將樣本置於濕冰上。該過程在抽血之 30 分鐘內開始。

【0222】 在該處理之後立即冷凍樣品。於 4°C 以 1600 x g 將真空采血管離心

15 分鐘。在未干擾白色細胞層之情況下，使用移液管自管頂部層(~3 mL)緩慢且小心收集血漿且將其轉移至預先標記之兩個 4.5 mL NUNC 管。適當丟棄其餘細胞沉澱。並非全部可能的血漿均被去除。血漿位於距離白血球層約 5 mm 以避免細胞材料(單核細胞)對血漿之污染。藉由倒置 5-6 次來混合血漿且在預先標記之 2.0 mL Sarstedt 管中等分。將樣品在垂直位置轉移至 -70/-80°C 冷凍器(較佳)或 -20°C 冷凍器(替代)以用於保存。

【0223】 將樣品保存在 -70/-80°C (較佳)或 -20°C (替代)，直至分析。

【0224】 **連續檢定**。三日連續檢定(圖 5A)可在期望經改善敏感性之情況下使用。第 1 日：在 4°C 下將板用捕捉抗體塗覆隔夜。第 2 日：添加樣品且在 4°C 下溫育隔夜。第 3 日：添加偵測抗體(結合至生物素)及 SA-HRP。使用以下抗體及信號狀態：奧瑞珠單抗 1 ug/ml (捕捉抗體)、奧法珠單抗 0.5 ug/ml (偵測抗體)及 HRP 100 ng/mL (信號)。表 3 提供藉由連續檢定產生之示範性資料。

表 3. 並行性：三日連續檢定

樣品	稀釋	吸光度	經矯正稀釋 (ng/mL)	自乾淨回收 %	自 2 倍回收%
D8	乾淨	0.63	153.5	Ref	-
	2	0.403	190	124	Ref
	4	0.25	219.2	115	115
	8	0.161	240.7	110	110
	16	0.335	1237.4	514	514
F9	乾淨	2.432	816.466	Ref	-
	2	1.745	991.9	121	Ref
	4	0.902	904.2	91	91
	8	0.425	804.7	89	89
	16	0.203	672.7	84	84
F10	乾淨	0.911	228.397	Ref	-
	2	0.524	252.1	110	Ref
	4	0.281	252.4	100	100
	8	0.139	185.9	74	74
	16	0.099	164.1	88	88
F3	乾淨	1.031	262.143	Ref	-
	2	0.626	305	116	Ref
	4	0.404	380.9	125	125
	8	0.192	311.6	82	82
	16	0.116	256	82	88

F6	乾淨	0.767	189.456	Ref	-
	2	0.556	268.7	142	Ref
	4	0.303	276.3	103	103
	8	0.221	375.4	136	136
	16	0.158	463.9	124	124
F1	乾淨	0.777	192.092	Ref	-
	2	0.519	249.6	130	Ref
	4	0.311	284.1	114	114
	8	0.392	737.9	260	260
	16	0.15	428.6	58	58

【0225】 橋式檢定。兩日橋式檢定(圖 5B)可在期望得到結果之時間減小之情況下使用。第 1 日：將 100 uL 樣品與 100 uL 主要混合物(Ab-DIG + Ab-生物素)在 4°C 下溫育隔夜。第 2 日：取出 100 uL 具有主要混合物之樣品且將其轉移至 SA 板。用抗 DIG-HRP 偵測信號。使用以下抗體及信號狀況：主要混合物 1 ug/mL (奧法珠單抗-DIG + 抗 DIG 生物素)及 HRP 50 ng/mL(信號)。表 4 提供藉由橋式檢定產生之示範性資料。

表 4. 並行性：兩日橋式檢定

樣品	稀釋倍數	信號	Obs 濃度 [ng/ml]	回收%(自乾淨)	回收%(自½ MRD)
F1	1	0.228	81.40	Ref	-
	2	0.118	39.00	96%	Ref
	4	0.080	23.61	116%	121%
	8	0.55	13.77	135%	141%
F2	1	0.322	117.92	-	-
	2	0.168	58.15	99%	-
	4	0.109	35.43	120%	122%
	8	0.084	25.37	172%	175%
F3	1	2.649	1647.70	Ref	-
	2	2.054	1030.81	125%	Ref
	4	1.189	494.65	120%	96%
	8	0.740	287.90	140%	112%
D1	1	0.137	43.95	-	-
	2	0.062	13.99	64%	-
	4	0.046	8.22	75%	117%
	8	0.033	3.57	65%	102%
D2	1	0.242	89.46	Ref	-
	2	0.147	48.18	108%	Ref
	4	0.093	25.88	116%	107%
	8	0.070	17.01	152%	141%
D3	1	0.053	10.67	-	-
	2	0.032	3.44	64%	-

	4	0.025	1.26	47%	73%
	8	0.028	1.96	147%	228%
D4	1	0.101	29.23	Ref	-
	2	0.066	15.65	107%	Ref
	4	0.040	5.93	81%	76%
	8	0.032	3.24	89%	83%

【0226】 不使用校準曲線之信號偵測：在無 EV 校準物之情況下將樣品及試劑以標準曲線稀釋液稀釋。將樣品連續稀釋 2 倍。將經稀釋樣品移液至 Quanterix 聚丙烯低結合板。將偶合至抗 DIG 抗體之珠粒、奧法珠單抗-DIG 及奧法珠單抗-生物素在標準曲線稀釋液中稀釋至 0.5 ug/mL 之濃度。將珠粒稀釋至 1.4×10^9 個珠粒/mL 之標稱珠粒濃度。將酶(鏈黴抗生物素蛋白 β -半乳糖苷酶, SBG)在 SBG 稀釋液中稀釋至 150 pM。將珠粒、偵測劑、酶、受質及含有標準物/樣品之 96 孔板裝載到儀器中。將原始資料以 excel cvs 文件形式自儀器下載。將原始資料使用 Excel 試算表處理。

【0227】 如表 5 所示，未使用重組人類生成校準曲線，其中奧瑞珠單抗用作捕捉抗體且奧法珠單抗用作偵測抗體。商業上可用之重組人類可能因未藉由跨膜螺旋形成環而未使用奧瑞珠單抗/奧法珠單抗組合引發信號。結合至膜之線性肽或重組蛋白在 ELISA 中未引發信號，這表明奧瑞珠單抗或奧法珠單抗在該構象中未結合至 CD20。

表 5. 在無校準曲線情況下偵測信號

Ab 對： 奧瑞珠單抗/ 奧法珠單抗	Rh CD20 Exp 濃 度(ng/ml)	全長信號	截短 1 信號	截短 2 信號
1	200	0.01	0.01	0.01
2	66.67	0.01	0.01	0.01
3	22.22	0.01	0.01	0.01
4	7.41	0.01	0.01	0.01
5	2.47	0.01	0.02	0.01
6	0.82	0.01	0.01	0.01
7	0.27	0.01	0.01	0.01
8	0	0.01	0.01	0.01

【0228】 在有校準曲線情況下進行信號偵測：將 CD20 EV 以 500 ng/mL 起始

濃度以標準曲線稀釋液稀釋。進行十次 2 倍連續稀釋至 0.5 ng/mL 最終濃度。將十一個水準加上非特異性空白移液到 Quanterix 聚丙烯低結合板。

【0229】 將奧法珠單抗-DIG 及奧法珠單抗-生物素在 BA003 + 1.5% BSA 中稀釋至 0.5 ug/mL 之濃度。將抗 DIG Ab 珠粒在 BA003 + 1.5% BSA 中稀釋至 1.4×10^9 個珠粒/mL 之標稱珠粒濃度。將酶(鏈黴抗生物素蛋白 β -半乳糖苷酶, SBG)在 SBG 稀釋液中稀釋至 150 pM。將珠粒、偵測劑、酶、受質及含有標準物/樣品之 96 孔板裝載到儀器中。輸出原始資料且使用 Softmax Pro 分析。

【0230】 表 6 提供劑量(does)依賴性信號(每個珠粒之平均酶，亦參見圖 10)、標準偏差、CD 經觀測濃度、濃度變異係數、及回收率。使用以下公式：

信號：每個珠粒之平均酶(AEB)，

$$\text{變異係數}(\%C.V.) = \left(\frac{\text{標準偏差}}{\text{理論計算值}} \right) \times 100$$

$$\text{標準偏差}(S.D.) = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{與理論值之差異}(\text{回收率}\%) = \left[\left(\frac{\text{平均計算濃度}}{\text{理論濃度}} \right) - 1 \right] \times 100$$

表 6. 使用抗 CD20 抗體使用校準曲線偵測 CD20 EV 信號

Std 曲線	CD20 預期 濃度 [ng/ml]	信號	STD DEV	CD 經觀測 濃度 [ng/ml]	濃度% CV	回收率%
1	500.00	2.92	0.002	498.92	0.12	99.78
2	250.00	1.90	0.007	252.92	0.51	101.17
3	125.00	1.05	0.020	121.56	2.17	97.25
4	62.50	0.58	0.002	62.71	0.44	100.34
5	31.25	0.32	0.003	32.82	1.19	105.01
6	15.63	0.17	0.007	16.55	4.46	105.91
7	7.81	0.10	0.003	8.09	3.90	103.60
8	3.91	0.06	0.002	4.39	4.00	112.42
9	1.95	0.04	0.001	1.34	6.80	68.54
10	0.98	0.03	0.002	0.37	56.40	37.68
12	0.00	0.02	0.000			

實例 3. 基於珠粒之免疫檢定格式

【0231】 適用於偵測蛋白例如腫瘤抗原之替代性格式包括基於珠粒之免疫檢定，例如 Quanterix 平台。在此檢定中，抗 DIG Ab 接著奧法珠單抗-DIG 塗覆可用於捕捉 cCD20 且奧法珠單抗-生物素接著鏈黴抗生物素蛋白 β 半乳糖苷酶可用於偵測(圖 6)。

【0232】 在示範性基於珠粒之免疫檢定格式中，將奧法珠單抗-DIG 及奧法珠單抗-生物素在 BA003 + 1.5% BSA 中稀釋至 0.5 ug/mL 之濃度。將用地高辛抗體標記之珠粒(抗 DIG 珠粒)在 BA003 + 1.5% BSA 中稀釋至 1.4×10^9 個珠粒/mL 之標稱珠粒濃度。將酶(鏈黴抗生物素蛋白 β -半乳糖苷酶，SBG)在 SBG 稀釋液中稀釋至 150 pM。將珠粒、偵測劑、酶、受質及含有標準物/樣品之 96 孔板裝載到儀器中。

【0233】 如圖 6 所示，在第一步驟中，將樣品、抗 DIG 珠粒、奧法珠單抗-生物素及奧法珠單抗 DIG 偵測劑移液至光析管中以形成夾心，用於溫育大約 67 個步調(50 分鐘)。然後，在第二步驟中，將夾心用 SBG 標記且溫育達 7 個步調(5 分鐘)。在各步驟之間，磁體使珠粒沉澱且隨後進行洗滌步驟。將珠粒重懸浮於刃天青 β -D-半乳吡喃糖(RGP)受質，且轉移至 Simoa 盤以用於成像。表 7 提供劑量依賴性每個珠粒至平均酶(AEB)、變異係數(CV)、經計算濃度、濃度之 CV、回收率、及信號比背景比率。

表 7. 對 cCD20 進行之 Quanterix 偵測

預期濃度 [CD20] (ng/ml)	AEB (信號)	CV (%)	經計算濃度 (ng/ml)	CV-濃度 (%)	回收率(%)	S/B
500	6.791	1.1	477.5	1.1	96	194
250	3.877	4.9	273	4.8	109	111
125	2.135	4	150.5	3.9	121	61
62.5	0.772	1	54	1	86	22.1
31.25	0.442	6.1	30.3	6.4	97	12.6
15.625	0.236	0.4	15.4	0.5	99	6.74
7.813	0.135	2.4	7.975	2.9	102	3.86

3.906	0.08	2.4	3.93	3.6	101	2.29
1.953	0.057	1.2	2.19	2.4	112	1.63
0.977	0.045	9.1	1.295	24.2	133	1.29
0.488	0.032	4.2	0.2555	41.4	52	0.91
空白	0.035					

實例 4. 清潔劑對可偵測性之影響

【0234】 在 PBS、1.5% BSA、0.15% 聚山梨醇酯 20、0.05% Proclin 300、pH 7.4 中製備一組 CD20 對照(5 及 50 ng/mL)。在 PBS、1.5% BSA、0.05% 聚山梨醇酯 20、0.05% Proclin 300、pH 7.4 中製備第二組對照。在 Quanterix 儀器上檢定該等對照。如圖 7 所示，檢定中較低清潔劑顯示經改善信號比背景(S/B)比率。

實例 5. 耐藥性檢定

【0235】 在緩衝液基質中製備耐藥性對照以減輕內源性影響(圖 8)。將 CD20 TDB 及 CD20 各自以兩倍標稱濃度稀釋到 PBS、1.5% BSA、0.05% 聚山梨醇酯 20、0.05% Proclin 300、pH 7.4 中且然後一對一組合。最終濃度為 0、0.05、0.5、及 5 ug/mL TDB 及 50 ng/mL CD20。檢定對照且針對標準曲線量化。耐藥性測試在 5 ug/mL TDB (例如, 抗 CD20-CD3) 存在下在 50 ng/mL CD20 EV 下顯示約 50% 干擾。

實例 6. 使用 Biacore™ 表徵胞外囊泡上表現之 CD20 的抗 CD20 TDB

【0236】 在 Biacore™ T200 儀器(GE Healthcare ; Piscataway, NJ)上使用表面電漿子共振(SPR)技術評估胞外囊泡(EV)上表現之 CD20 與抗 CD20 TDB 之間的結合相互作用。使用 Biacore™ T200 評估軟體(3.0 版 ; GE Healthcare)使用異源分析物結合模型計算解離平衡常數(K_D)、解離速率常數(kd)、及締合速率常數(ka)值。

【0237】 在 SA 感測器晶片上使用間接捕捉方法將 CD20 EV 捕捉到不同流動細胞(FC)上(圖 9A)。首先經由生物素-鏈黴抗生物素蛋白相互作用將生物素化抗 CD81 及抗 CD9 抗體(與 30 ug/mL 相等濃度混合)捕捉到全部四個 FC，從而引起約 2500 個反應單位(RU)之捕捉水準。然後將 CD20 EV 以 0.25 μ g/mL 之濃度在

FC2 或 FC4 上注射達 40-120 秒。EV 之所得捕捉水準範圍為 600-1800 RU。將不同濃度之抗 CD20 TDB 以運行緩衝液(0.01 M HEPES、0.15 M NaCl 及 3 mM EDTA、pH 7.4)稀釋且然後以 100 μ L/min 之流速注射到四個 FC 中達 1 或 2 分鐘 (min)；使抗 CD20 TDB 與抗體解離達 10 min 以進行動力學親和力量測。在 37°C 下進行實驗且結果概述於圖 9B 中。抗 CD20 TDB 與 CD20 EV 在 37C 下之結合的代表性 Biacore 感應圖亦呈現於圖 9B 中。

【0238】 除了所描繪且提出申請之各個實施例以外，所揭示之主題亦涉及具有本文所揭示且提出申請之特徵的其他組合之其他實施例。這樣，在所揭示主題之範疇內本文所呈現之特定特徵可以其他方式彼此組合，使得所揭示主題包括本文所揭示之特徵之任何適合組合。所揭示主題之特定實施例之前述描述已出於說明及描述之目的而提供。其不欲為無遺漏的或將所揭示主題限於所揭示之彼等實施例。

【0239】 對於熟習此項技術者來說顯而易見的是，在不脫離所揭示主題之精神和範圍的情況下，可以對所揭示主題之組成物及方法進行各種修改及變化。因此，預期所揭示主題涵蓋屬於附隨申請專利範圍及其等效物之範疇的修改及變化。

【0240】 本文引用各種出版物、專利及專利申請案，其內容以全文引用方式併入本文中。

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種用於偵測樣品中之膜相關蛋白的檢定，其包含：

a) 捕捉抗體，該捕捉抗體結合至該樣品之包含該膜相關蛋白之胞外囊泡，從而生成捕捉抗體-胞外囊泡複合物，及

b) 偵測抗體，該偵測抗體結合至該捕捉抗體-胞外囊泡複合物以形成可偵測結合複合物，

其中來自該可偵測結合複合物之信號係針對自包含該蛋白之胞外囊泡偵測之一或多個已知值來校準。

【請求項 2】 如請求項 1 之檢定，其中該捕捉抗體不與該偵測抗體競爭結合。

【請求項 3】 如請求項 1-2 中任一項之檢定，其中該捕捉抗體所結合之抗原決定基與該偵測抗體所結合之抗原決定基不同。

【請求項 4】 如請求項 1-3 中任一項之檢定，其中該膜相關蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【請求項 5】 如請求項 1-4 中任一項之檢定，其中該捕捉抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗(rituximab)、奧瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧法珠單抗(ofatumumab)、奧濱尤妥珠單抗(obinutuzumab)、及其組合。

【請求項 6】 如請求項 1-5 中任一項之檢定，其中該偵測抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗(rituximab)、奧瑞珠單抗(ocrelizumab)、奧法珠單抗(ofatumumab)、奧濱尤妥珠單抗(obinutuzumab)、及其組合。

【請求項 7】 如請求項 1-6 中任一項之檢定，其進一步包含胞外囊泡校準物。

【請求項 8】 如請求項 1-7 中任一項之檢定，其中該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【請求項 9】 一種用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：

a) 確定該樣品之胞外囊泡中之標靶蛋白的水準，及

b) 比較該樣品之該等胞外囊泡中之該標靶蛋白的水準與使用包含該標靶蛋白之胞外囊泡生成之校準曲線。

【請求項 10】 如請求項 9 之方法，其中該標靶蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【請求項 11】 如請求項 9-10 中任一項之方法，其中該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【請求項 12】 如請求項 9-11 中任一項之方法，其中該標靶蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【請求項 13】 如請求項 9-12 中任一項之方法，其進一步包含偵測胞外囊泡標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 14】 一種用於量化樣品中之循環蛋白之濃度的方法，其包含以下步驟：

a) 使用包含該蛋白之胞外囊泡生成校準曲線，及

b) 比較該樣品之胞外囊泡中之該蛋白的水準與該校準曲線以確定該樣品之該等胞外囊泡中之該蛋白的量。

【請求項 15】 如請求項 14 之方法，其中該蛋白選自由以下組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20 抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【請求項 16】 如請求項 14-15 中任一項之方法，其中該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【請求項 17】 如請求項 14-16 中任一項之方法，其中該循環蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【請求項 18】 如請求項 14-17 中任一項之方法，其進一步包含偵測胞外囊泡標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 19】 一種用於確定患有 B 細胞淋巴瘤之患者是否可能表現出對抗 CD20 療法之反應的方法，其包含以下步驟：

a) 自該患者獲得樣品，

b) 確定該樣品之胞外囊泡中之循環 CD20 的量，

c) 比較該樣品之該等胞外囊泡中之 CD20 的水準與使用包含 CD20 之胞外囊泡生成之校準曲線，及

d) 基於該樣品中確定之胞外囊泡中之循環 CD20 的量，確定該患者是否可能表現出對該 CD20 療法之反應。

【請求項 20】 如請求項 19 之方法，其中該抗 CD20 療法包含投與抗 CD20 抗體。

【請求項 21】 如請求項 20 之方法，其中該抗 CD20 抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【請求項 22】 如請求項 19-21 中任一項之方法，其中該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

【請求項 23】 如請求項 19-22 中任一項之方法，其中該循環蛋白之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【請求項 24】 如請求項 19-23 中任一項之方法，其進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 25】 一種用於確定抗 CD20 抗體之親和力的方法，其包含使該抗 CD20 抗體經歷表面電漿子共振(SPR)分析，其中該 SPR 分析包含使用作為配體之表現 CD20 之胞外囊泡及作為分析物之該抗 CD20 抗體。

【請求項 26】 如請求項 25 之方法，其中該抗 CD20 抗體選自由以下組成之群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體、及其組合。

【請求項 27】 如請求項 25-26 中任一項之方法，其進一步包含偵測胞外標記物之存在，其中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 28】 一種用於確定自患者獲得之 T 細胞之活化的方法，其包含

a) 將表現 CD20 之胞外囊泡與 T 細胞及 CD20 T 細胞依賴性雙特異性抗體一起溫育，及

b) 確定 T 細胞之活化。

【請求項 29】 如請求項 28 之方法，其進一步包含偵測胞外標記物之存在，其

中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 30】 一種治療有需要之受試者之腫瘤的方法，其包含：

a) 自該受試者獲得樣品，

b) 使用包含腫瘤抗原之胞外囊泡生成校準曲線，

c) 比較該樣品之胞外囊泡中之該腫瘤抗原的水準與該校準曲線以確定該樣品之該等胞外囊泡中之該靶腫瘤抗原的量，

d) 基於該樣品之胞外囊泡中之該腫瘤抗原的水準，確定該受試者是否可能表現出對抗體療法之反應，及

e) 因應於 d)中之該確定以投與治療劑。

【請求項 31】 如請求項 30 之方法，其進一步包含偵測胞外標記物之存在，其

中該胞外標記物選自由以下組成之群：CD81、CD63、CD9、及其組合。

【請求項 32】 如請求項 30-31 中任一項之方法，其中該抗體選自由以下組成之

群：利妥昔單抗、奧瑞珠單抗、奧法珠單抗、奧濱尤妥珠單抗、及其組合。

【請求項 33】 如請求項 30-32 中任一項之方法，其中該靶腫瘤抗原選自由以下

組成之群：人類 CD20 抗原、小鼠 CD20 抗原、大鼠 CD20 抗原、兔 CD20

抗原、食蟹獼猴 CD20 抗原、人類 CD3 抗原、小鼠 CD3、大鼠 CD3 抗原、

兔 CD3 抗原、食蟹獼猴 CD3 抗原、人類 FcRH5 抗原、人類 Ly6G6 抗原、

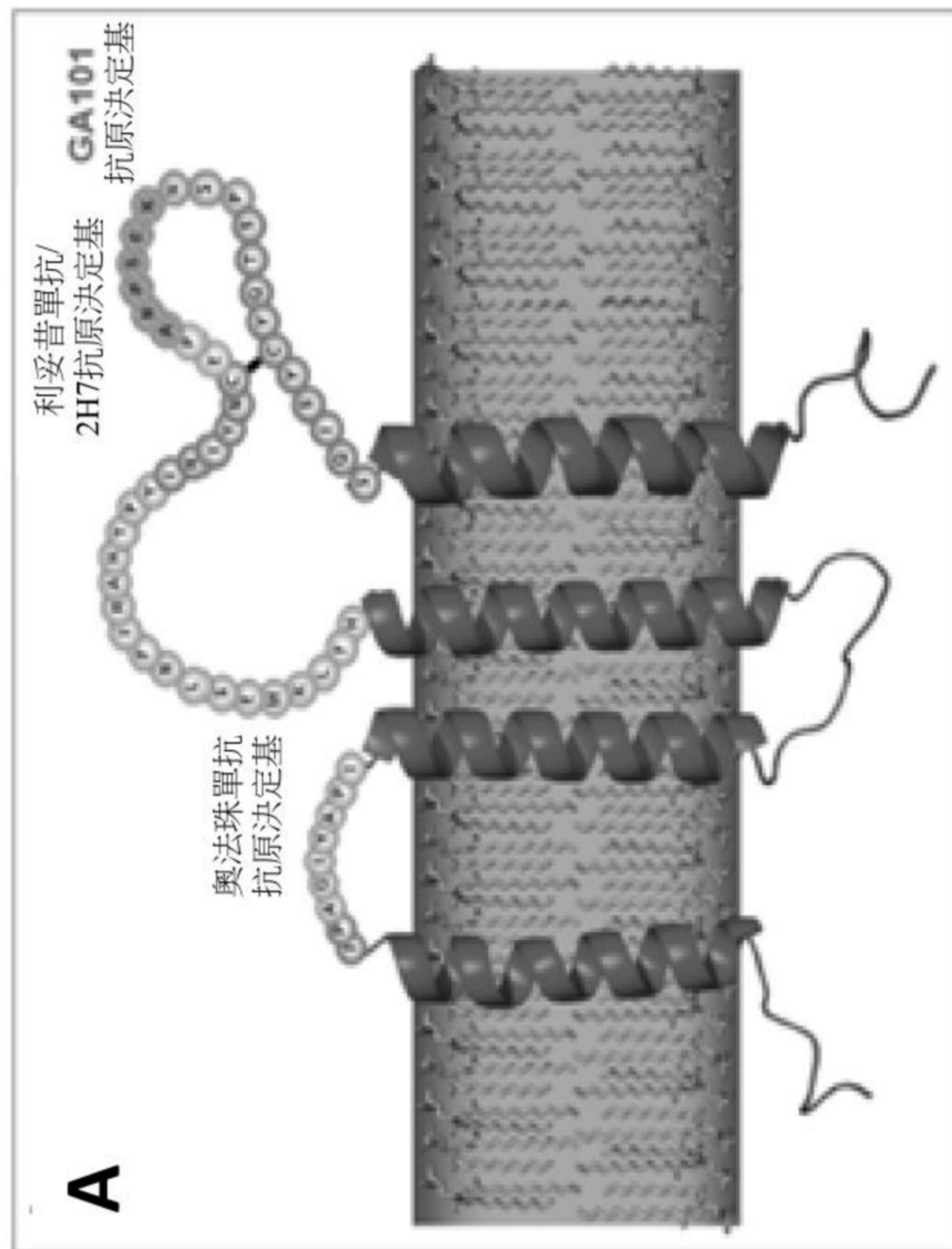
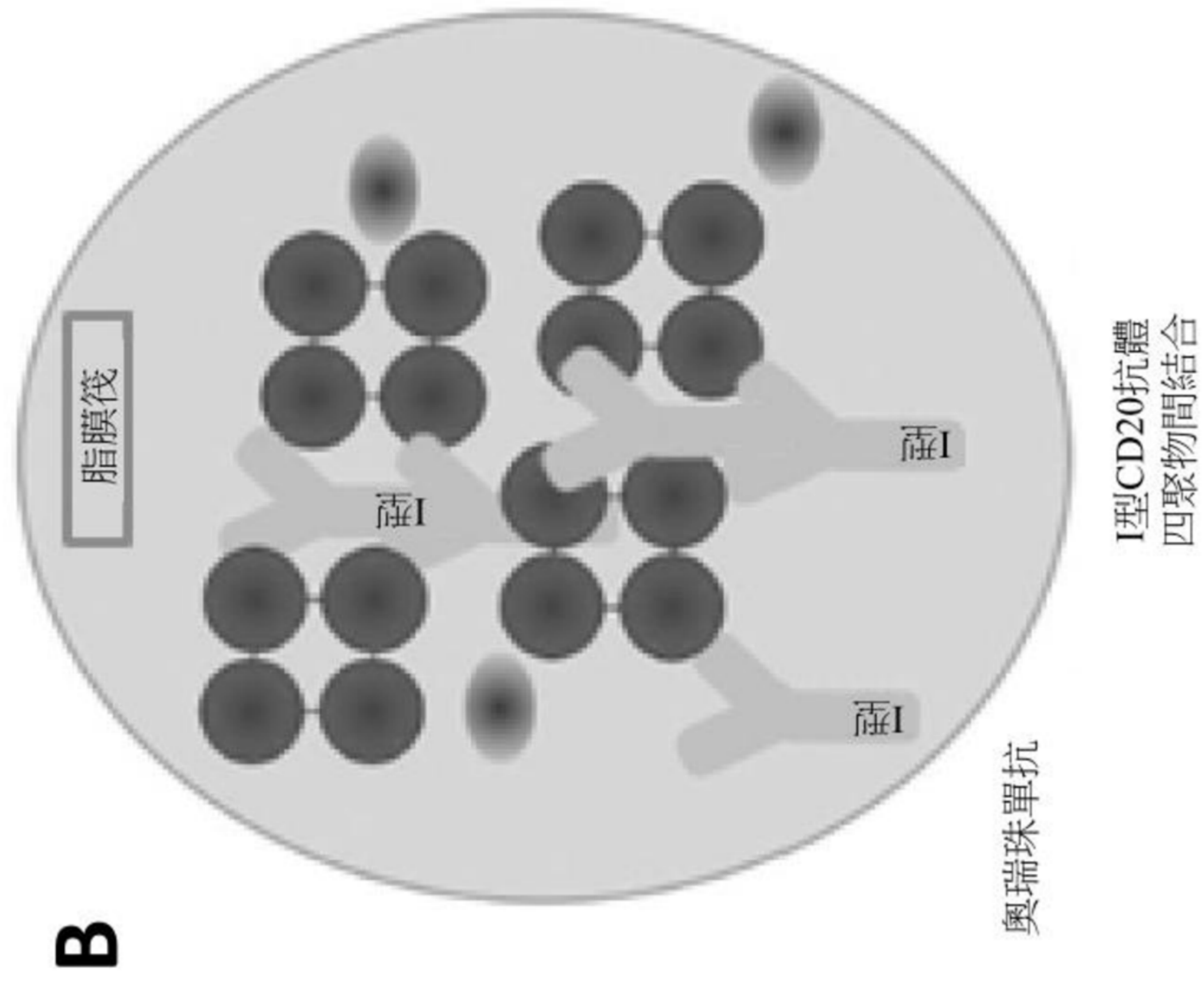
人類 HER2 抗原、人類 EGFR 抗原、人類 HER3 抗原、人類 HER4 抗原、人類 PSMA 抗原、及其組合。

【請求項 34】 如請求項 30-33 中任一項之方法，其中該樣品選自由以下組成之群：血漿樣品、血清樣品、組織培養物上清液樣品、及其組合。

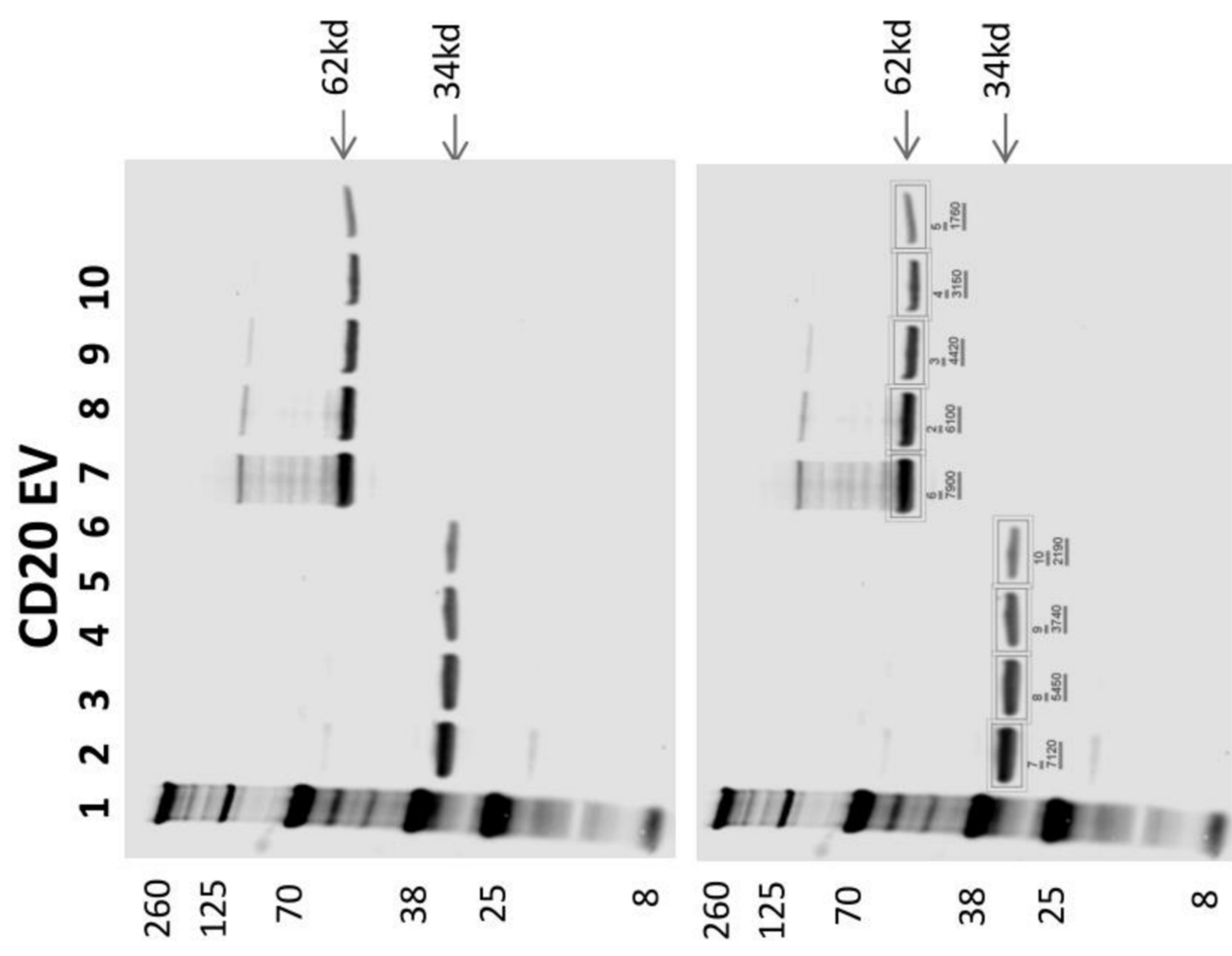
【請求項 35】 如請求項 30-34 中任一項之方法，其中該循環腫瘤抗原之濃度及該校準曲線係使用免疫檢定、ELISA、及/或西方墨點法確定。

【請求項 36】 如請求項 30-35 中任一項之方法，其進一步包含偵測胞外囊泡標記物之存在，其中該胞外標記物包含 CD81、CD63、及/或 CD9。

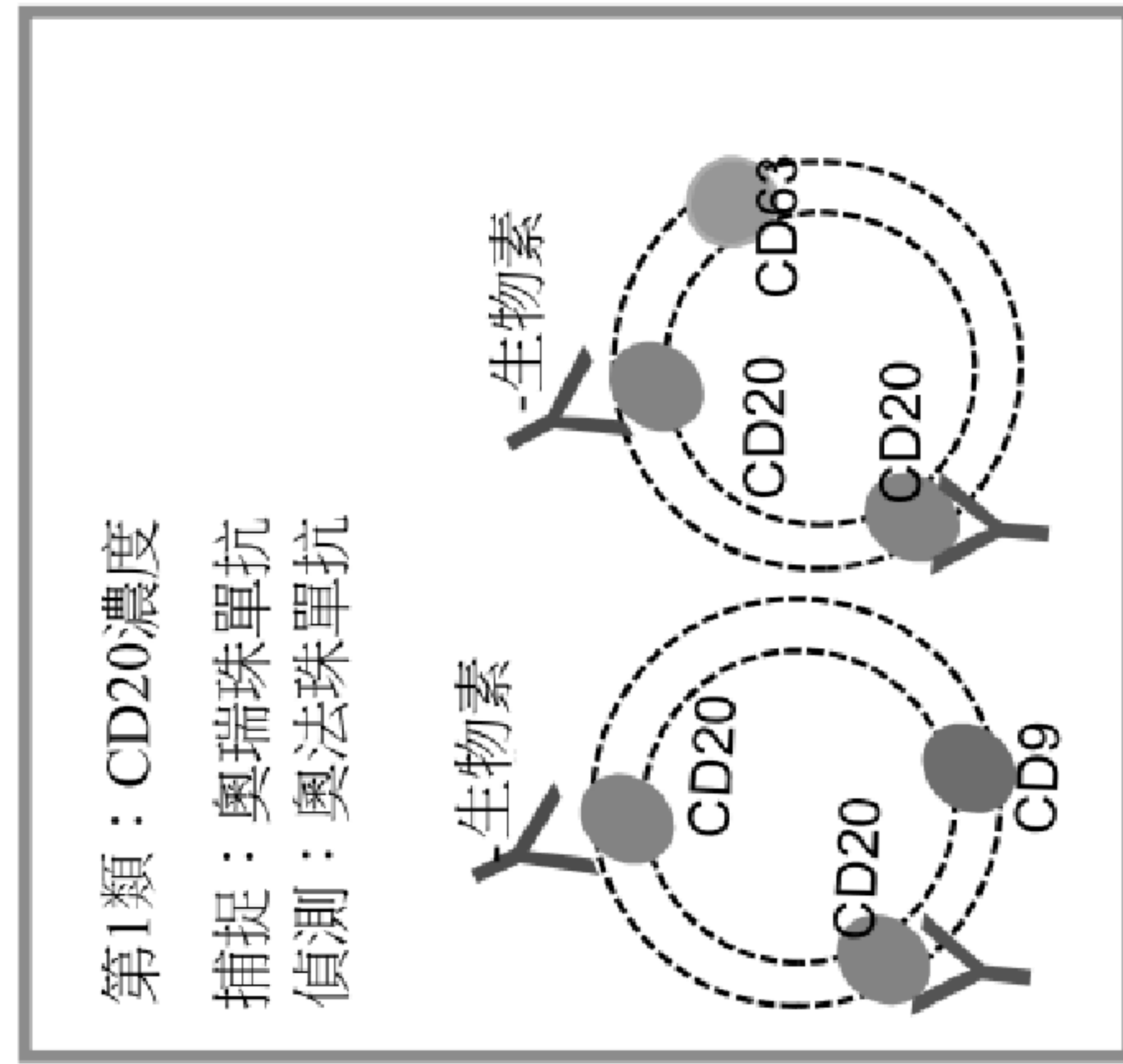
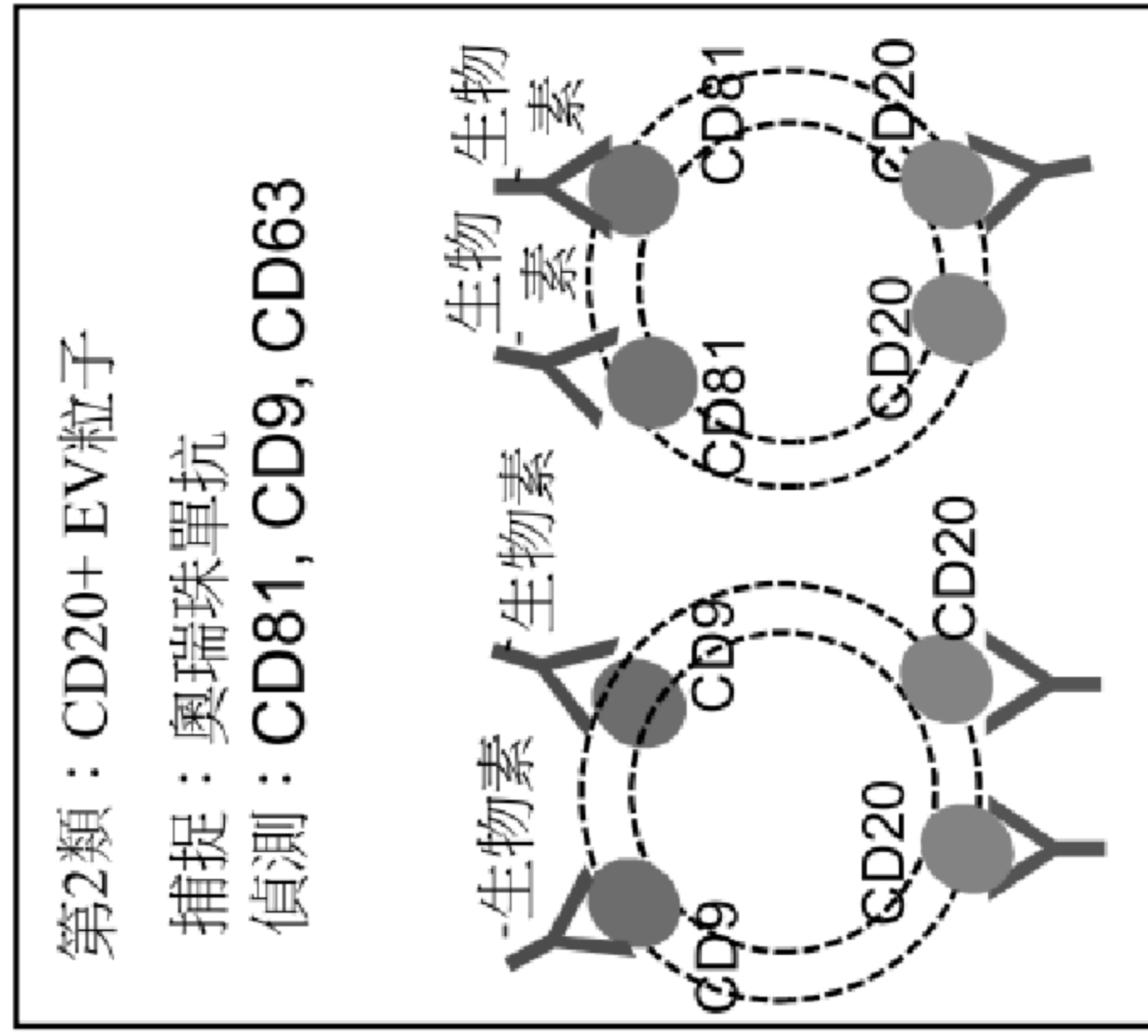
【發明圖式】



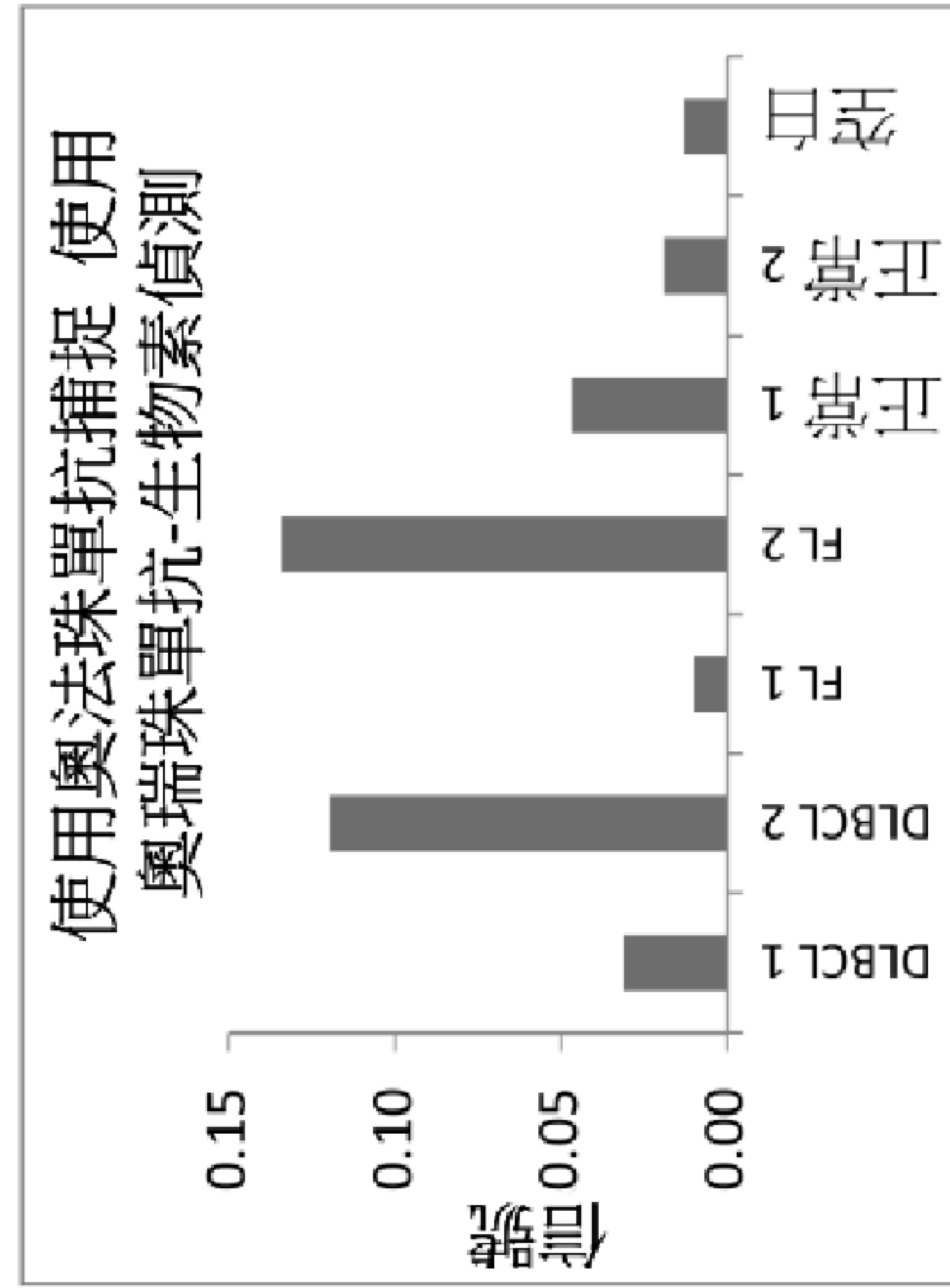
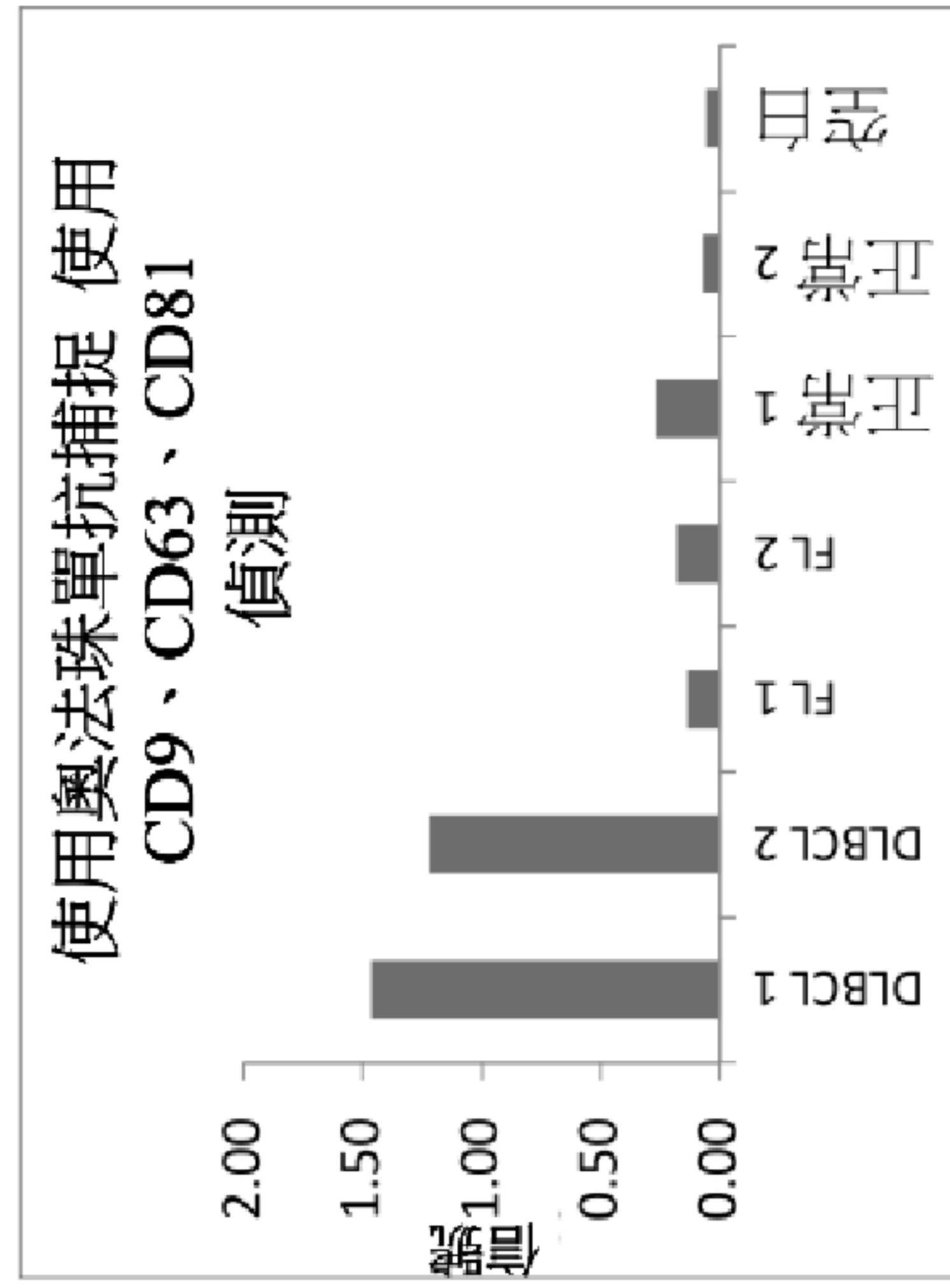
【圖 1】



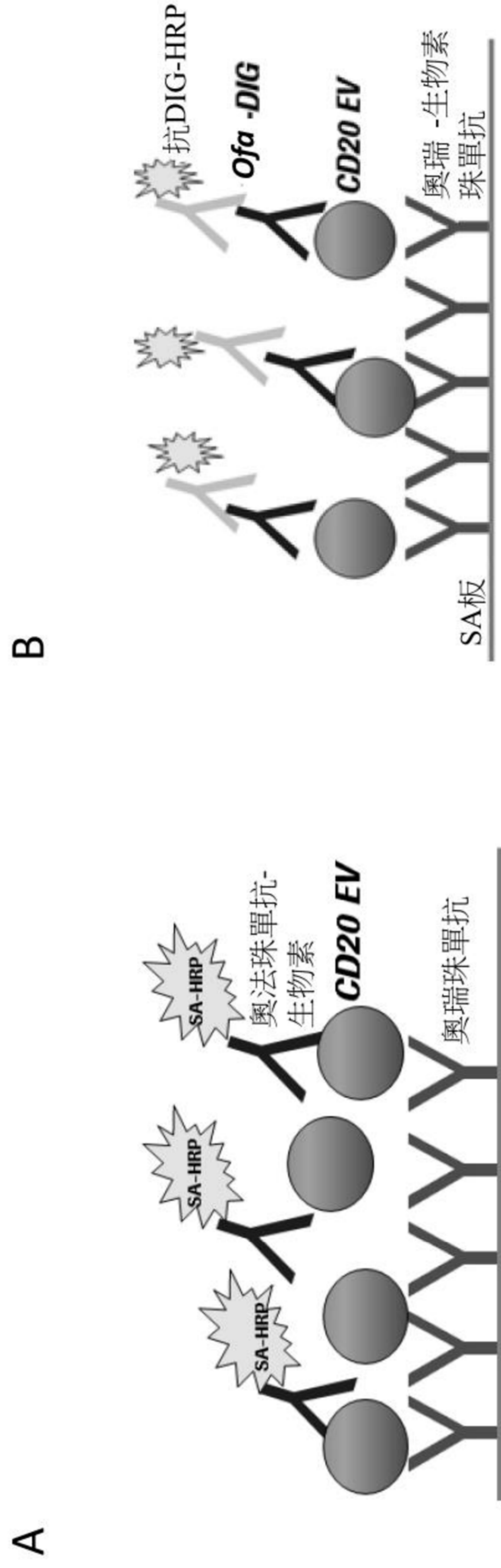
【圖 2】



【圖 3】

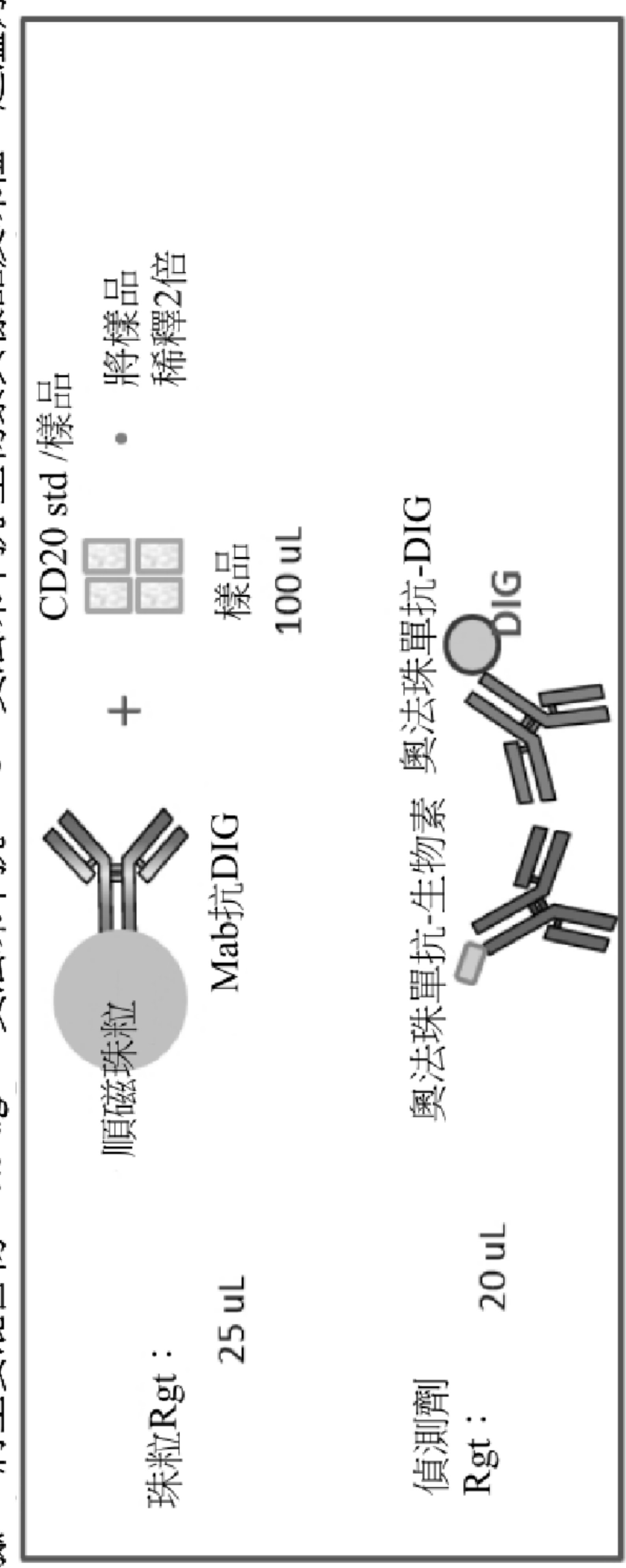


【圖 4】



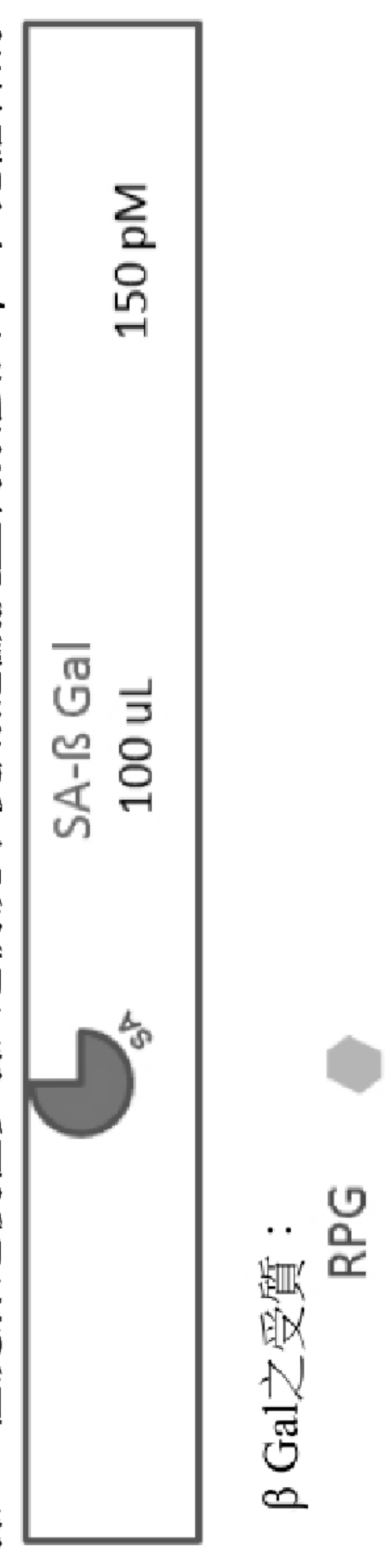
【圖 5】

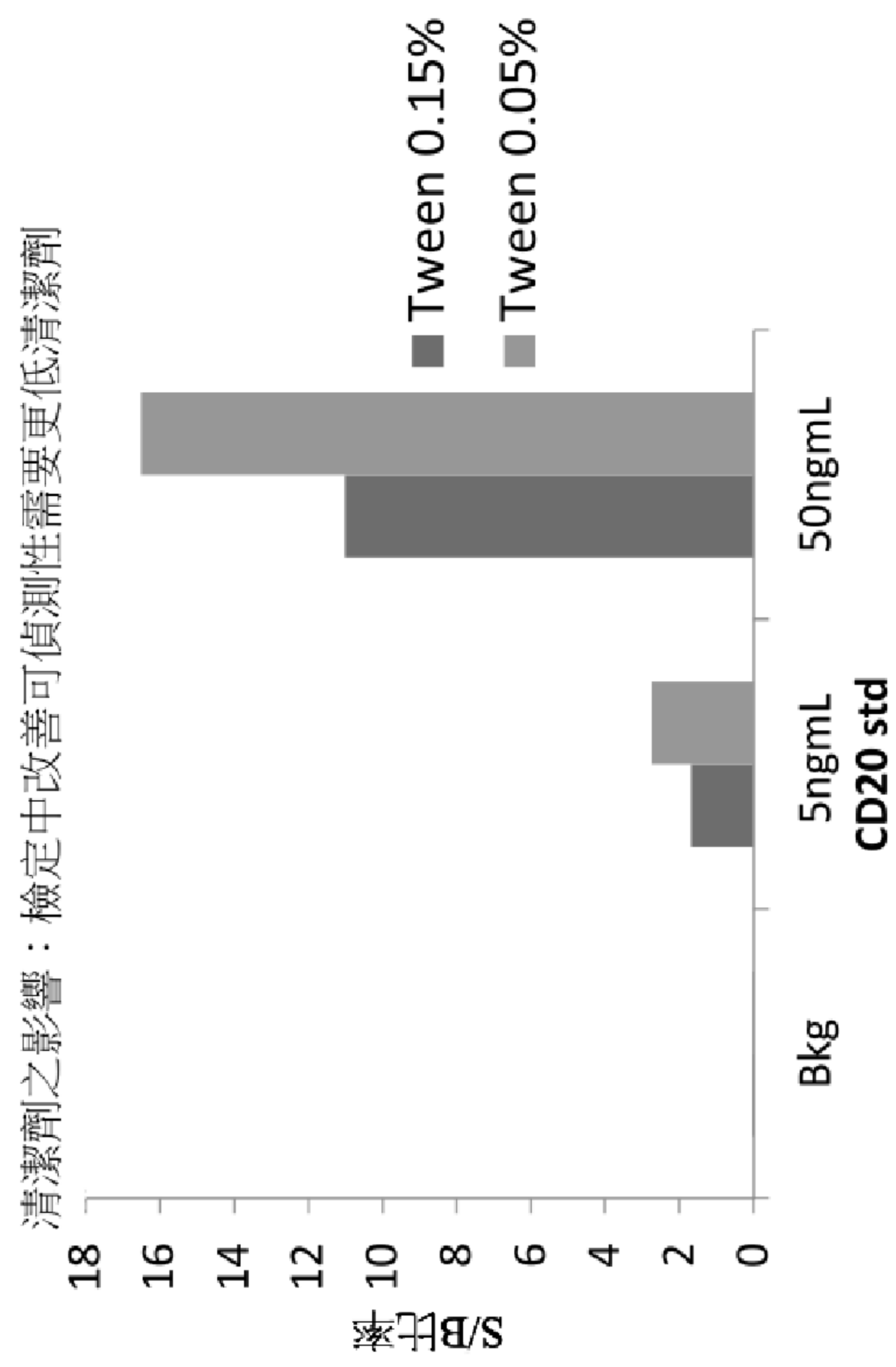
步驟1：將主要混合物、0.5 ug/mL奧法珠單抗-DIG、奧法珠單抗-生物素與樣品及珠粒一起溫育



【圖 6】

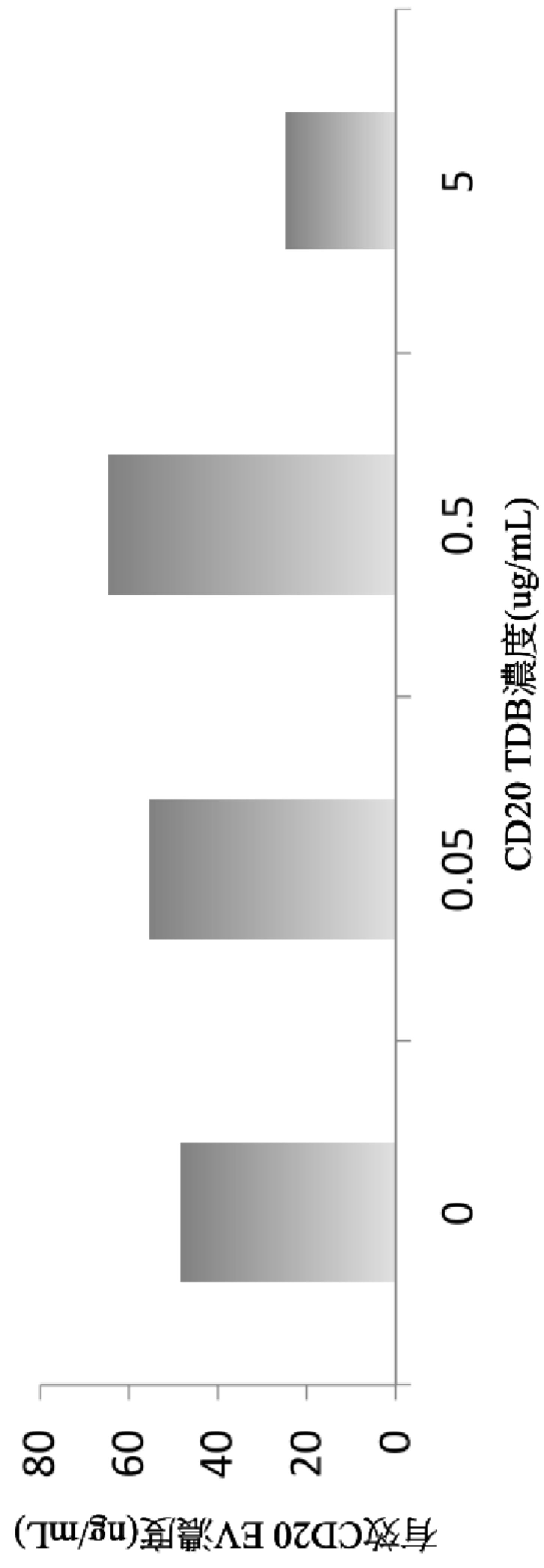
步驟2：在洗滌之後在步驟1之情況下使用鏈黴抗生物素蛋白/ β -半乳糖苷酶





【圖 7】

在0至5 ug/mL TDB存在下之
50 ng/mL CD20 EV



【圖 8】

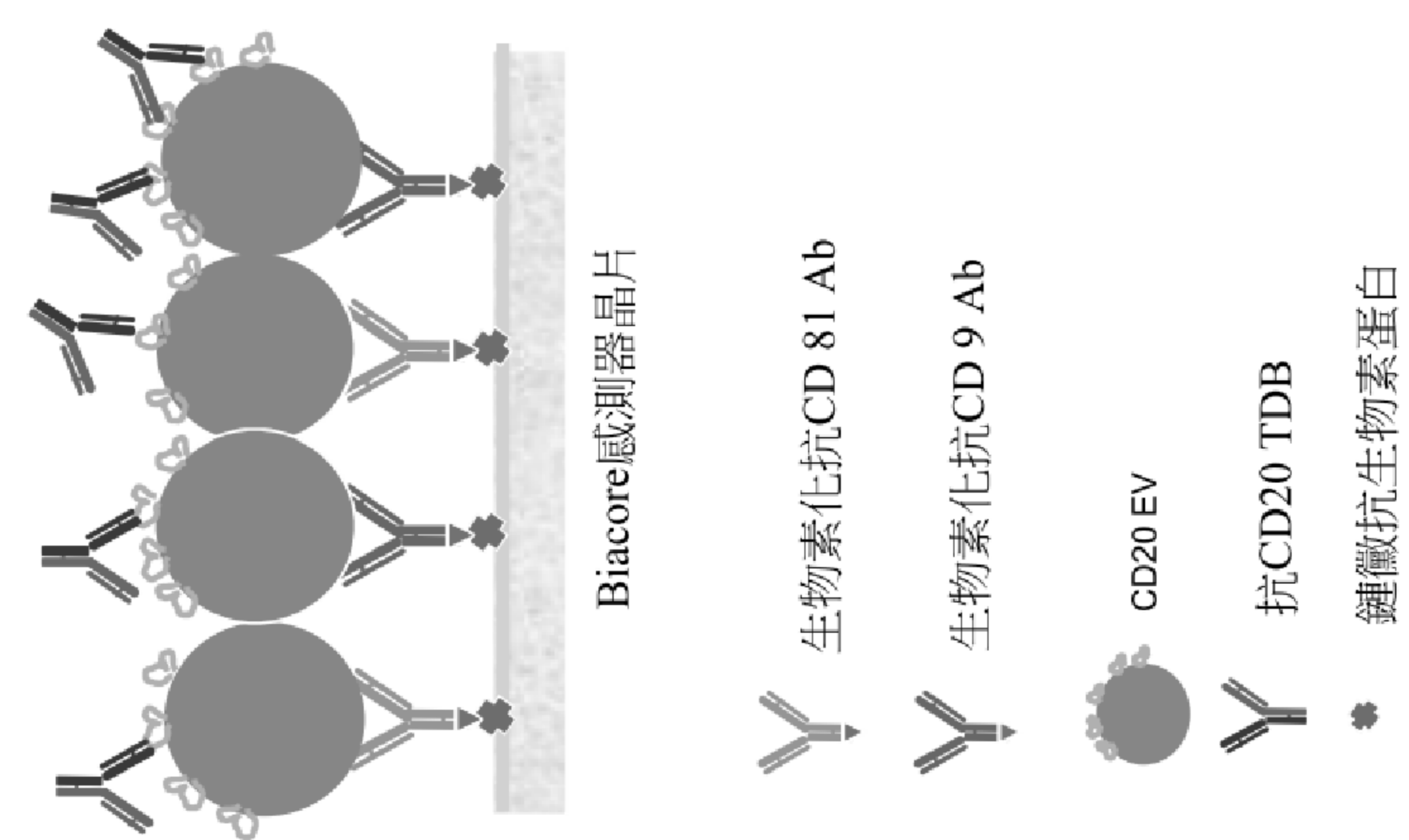
B

如藉由動力學分析確定之抗CD20 TDB與EV上表現之CD20的結合親和力(平均值± SD)

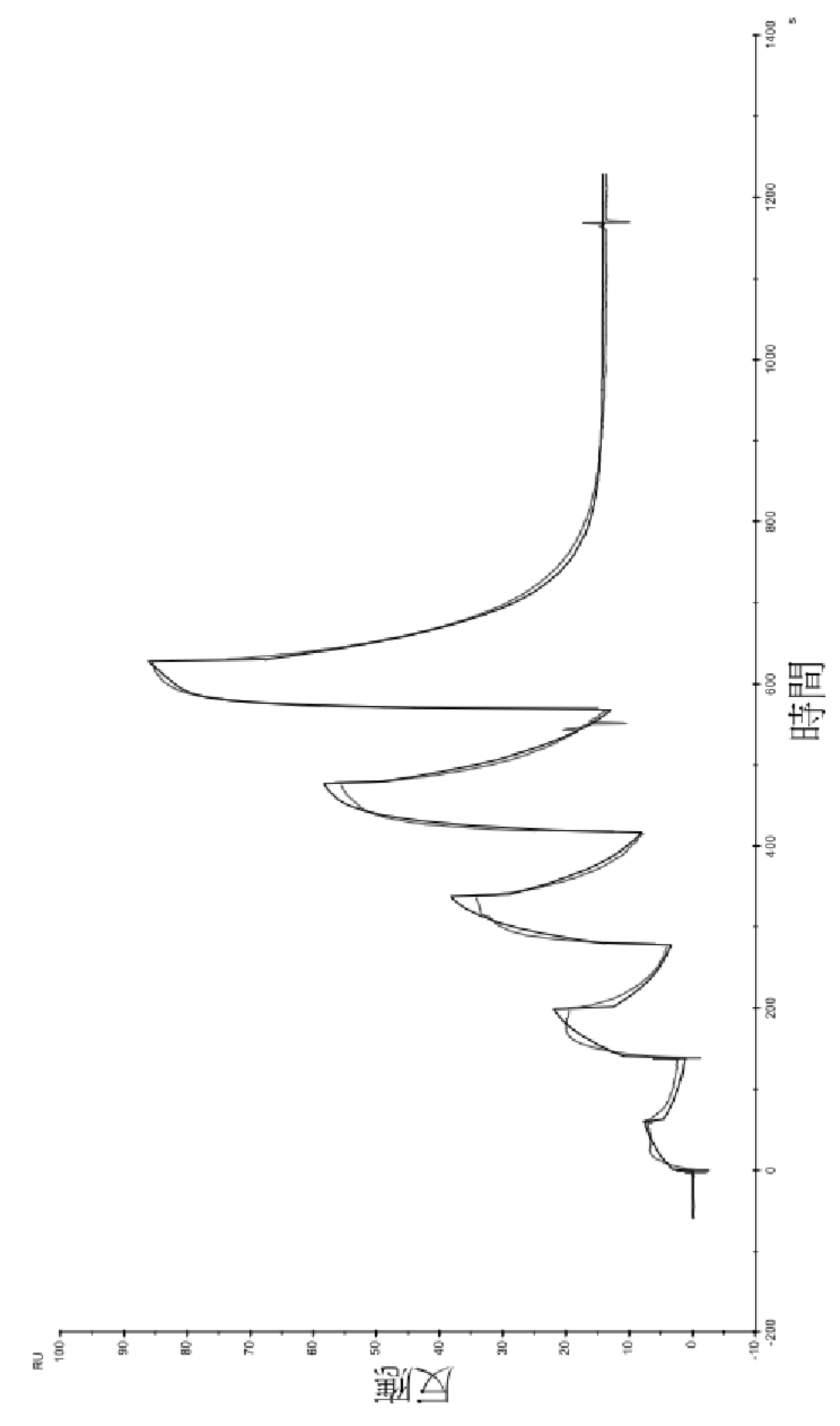
分析物	k_a ($10^5 M^{-1} s^{-1}$)	k_d ($10^{-2} s^{-1}$)	K_D (nM)
抗CD20 TDB	1.48 ± 0.39	1.77 ± 0.27	127 ± 39

k_a =結合速率常數； k_d =解離速率常數； K_D =解離平衡常數。
注意：基於4個獨立實驗Biacore運行計算平均值及標準偏差(SD)。

A

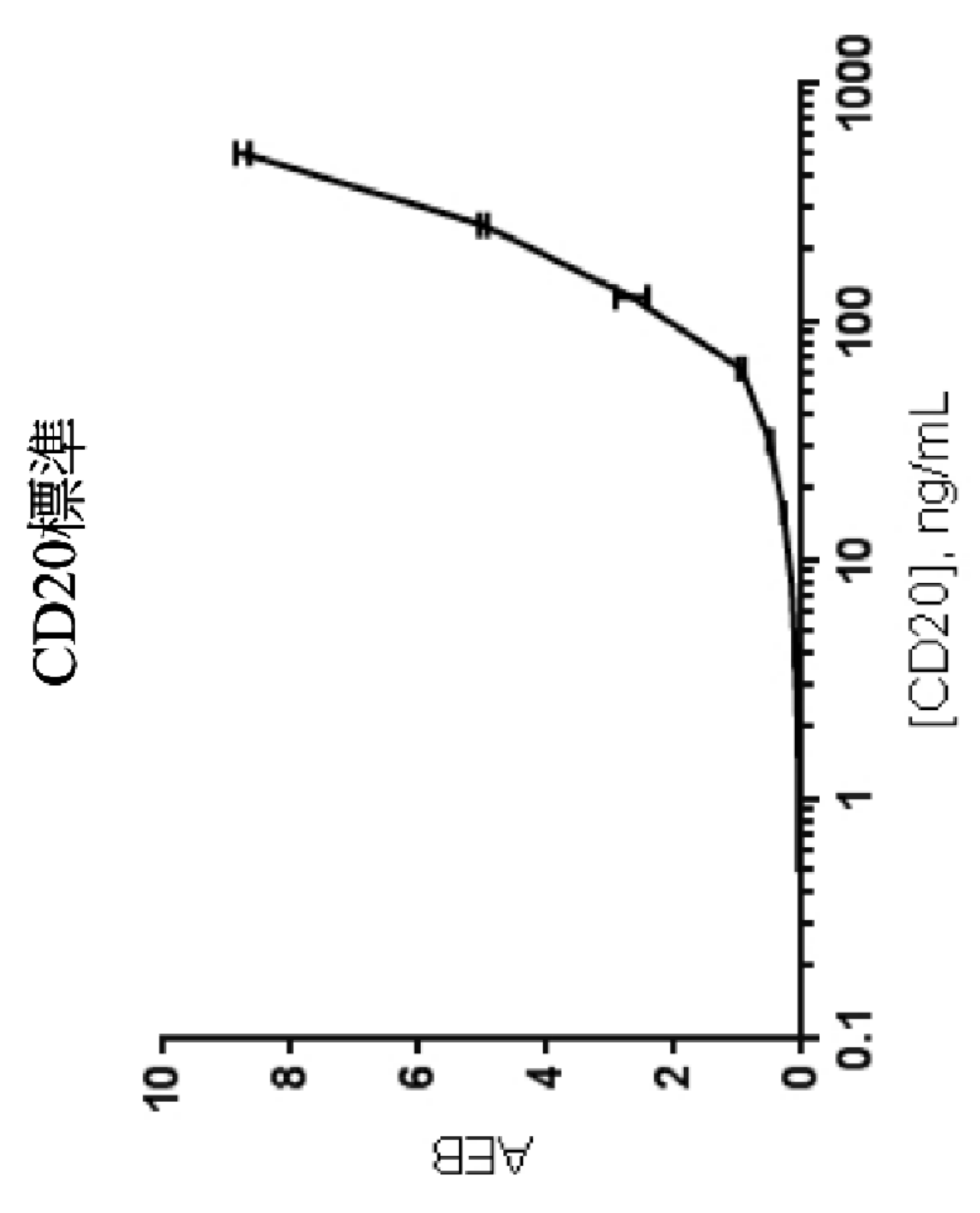


在37°C下抗CD20 TDB與CD20 EV之結合的代表性Biacore感應圖



【圖 9】

所繪製之標準曲線資料



【圖 10】