



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I885439 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：112129467

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : C07K16/00 (2006.01)

C12N5/16 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

(30)優先權：2020/06/01 美國

63/033,014

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

美國

(72)發明人：柯柏 詹姆士 湯瑪斯 KOERBER, JAMES THOMAS (US)；孫 永蓮 SUN,

YONGLIAN (US)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹

(56)參考文獻：

WO 2013119602A1

期刊 Khaleda Rahman Qazi, et al : Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell - dependent mechanism.

BLOOD, 19 MARCH 2009 VOLUME 113, NUMBER 12. Pages 2673-2683.

審查人員：張維纓

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：36 共 111 頁

(54)名稱

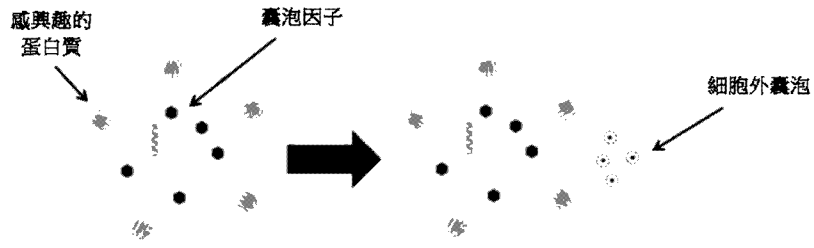
製造細胞外囊泡的方法及細胞外囊泡的用途

(57)摘要

本揭示涉及用於製造細胞外囊泡 (EV) 的改進方法及組成物。本揭示亦涉及新穎的基於 EV 的 ELISA 測定及用於進行該等測定的套組，以及使用包含膜結合抗原的 EV 產生針對特定抗原的抗體的方法。

The present disclosure relates to improved methods and compositions for making extracellular vesicles (EVs). The present disclosure also relates to novel EV-based ELISA assays and kits for performing such assays, as well as methods of producing antibodies to particular antigens using EVs comprising membrane-bound antigen.

指定代表圖：



【圖1】



I885439

【發明摘要】

【中文發明名稱】 製造細胞外囊泡的方法及細胞外囊泡的用途

【英文發明名稱】 METHODS FOR MAKING EXTRACELLULAR

VESICLES AND USES THEREOF

【中文】本揭示涉及用於製造細胞外囊泡 (EV) 的改進方法及組成物。本揭示亦涉及新穎的基於 EV 的 ELISA 測定及用於進行該等測定的套組，以及使用包含膜結合抗原的 EV 產生針對特定抗原的抗體的方法。

【英文】The present disclosure relates to improved methods and compositions for making extracellular vesicles (EVs). The present disclosure also relates to novel EV-based ELISA assays and kits for performing such assays, as well as methods of producing antibodies to particular antigens using EVs comprising membrane-bound antigen.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 製造細胞外囊泡的方法及細胞外囊泡的用途

【英文發明名稱】 METHODS FOR MAKING EXTRACELLULAR

VESICLES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本揭示涉及用於製造細胞外囊泡 (EV) 的改進方法及組成物。本揭示亦涉及新穎的基於 EV 的 ELISA 測定和用於進行該等測定的套組，以及使用包含感興趣的膜結合抗原的 EV 產生針對特定抗原的抗體的方法。

【先前技術】

【0002】 細胞外囊泡 (EV) 是細胞衍生之膜性結構的異質族群，該膜性結構由脂質雙層包圍。EV 包括胞外體、微泡、病毒樣顆粒 (viral-like particle, VLP) 和凋亡體 (> 1 μ m) (Théry 等人, “Membrane vesicles as conveyors of immune responses,” Nat Rev Immunol. 2009;9(8):581-93; Andaloussi 等人, “Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities,” Nat Rev Drug Discov. 2013;12(5):347-357)。EV 可以高度濃縮方式在 EV 表面以天然構形展現膜蛋白。例如，膜蛋白可以比細胞膜高 10 到 100 倍的濃度存在於 EV 表面。

【0003】 強大的 EV 產生平台包括以下一個或多個特徵：可重複地摻入單程 (single-pass) 和多程 (multi-pass) 膜蛋白的能力；產生足夠的 EV 產量 (例

如，mg 含量)；易於以合理的規模 (例如，約 1L) 轉染；及產生種類匹配背景的能力。產生 EV 的先前方法並無法滿足所有這些要求。

【發明內容】

【0004】 本揭示涉及用於製造細胞外囊泡 (EV) 的改進方法及組成物。本揭示亦涉及新穎的基於 EV 的 ELISA 測定和用於進行該等測定的套組，以及使用包含感興趣的膜結合抗原的 EV 產生針對特定抗原的抗體的方法。

【0005】 在一個方面，本揭示提供用於產生與蛋白質特異性結合的抗體的方法。在某些實施例中，該方法包括 (a) 產生複數個含有異源蛋白質的 EV，其藉由 (i) 在暴露於囊泡因子的細胞中表現異源蛋白質，(ii) 在培養基中培養細胞，和 (iii) 從該培養基中分離該複數個包含異源蛋白質之 EV，其中囊泡因子選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組；(b) 藉由向動物投予該複數個 EV 來免疫該動物；及 (c) 從該動物中分離與該異源蛋白質結合的抗體。

【0006】 可替代地及/或另外地，產生與蛋白質特異性結合的抗體的方法可包括 (a) 產生複數個包含異源蛋白質之 EV，其藉由 (i) 在細胞中表現異源蛋白質，(ii) 在培養基中培養該細胞，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個包含蛋白質之 EV，其中細胞是非黏附細胞；(b) 藉由向動物投予該複數個 EV 來免疫該動物；及 (c) 從該動物中分離與該異源蛋白質結合的抗體。在某些實施例中，該方法可進一步包括在細胞中表現囊泡因子，*例如*，異源囊泡因子，*例如*，MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 或它們的組合。

【0007】 在某些實施例中，藉由超速離心從培養基中分離複數個 EV。在某些實施例中，在第 0 週、第 2 週和第 4 週對動物投予複數個 EV。在某些

實施例中，產生抗體的方法進一步包含與 EV 同時對動物投予佐劑，例如 **Ribi** 佐劑。在某些實施例中，產生抗體的方法進一步包含對動物投予追加接種以增強動物對蛋白質的免疫反應。在某些實施例中，追加接種包含蛋白質、編碼蛋白質的多核苷酸或它們的組合。

【0008】 本揭示進一步提供藉由本揭示的方法所產生之抗體。在某些實施例中，抗體為單株抗體。在某些實施例中，抗體為人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。本揭示進一步提供包含抗體或其抗原結合部分和醫藥上可接受之載劑的醫藥組成物。在某些實施例中，醫藥組成物進一步包括另外治療劑。在某些實施例中，藉由本揭示的方法所產生之抗體或其醫藥組成物可用作藥物、可用於治療疾病及/或可用於製造藥物。在某些實施例中，本揭示提供治療患有疾病的個體的方法，其中該方法包括向個體投予有效量的本文所揭示之分離抗體或其抗原結合部分，或其醫藥組成物。本揭示進一步提供編碼本文所揭示之抗體或其抗原結合部分的分離核酸，及包含該核酸的宿主細胞。本揭示亦進一步提供藉由在適合表現抗體的條件下培養宿主細胞及視情況從宿主細胞分離抗體來產生抗體之方法。

【0009】 在另一方面，本揭示提供一種用於產生複數個 EV 之方法。在某些實施例中，該方法包括 (a) 在細胞中表現異源蛋白質；(b) 在培養基中培養該細胞；及 (c) 從該培養基中分離該複數個包含異源蛋白質之 EV，其中細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子，及/或其中細胞為非黏附細胞。

【0010】 在某些實施例中，異源蛋白質為膜蛋白，例如，單程膜蛋白或多程膜蛋白。在某些實施例中，膜蛋白為蛋白質複合物的成員。在某些實施例中，膜蛋白不是跨膜蛋白而是具有跨膜蛋白的複合物的成員。在某些實施例中，非黏附細胞為 293S 細胞或 Expi293F™ 細胞。

【0011】 在另一方面，本揭示提供用於偵測抗體的方法。例如，但不作為限制，該方法可包括 (a) 以捕獲試劑孵育樣品，其中該捕獲試劑包含複數個包含膜結合抗原之 EV，且該抗體與該膜結合抗原特異性結合；及 (b) 將與捕獲試劑結合的抗體與可偵測抗體接觸以偵測結合的抗體，其中該可偵測抗體與該抗體特異性結合。在某些實施例中，該複數個 EV 的產生是藉由 (i) 在細胞中表現該膜結合抗原，(ii) 在培養基中活體外培養該細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現該膜結合抗原之 EV。在某些實施例中，將細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子及/或該細胞為非黏附細胞。在某些實施例中，該方法可進一步包括 (c) 測量在 (b) 中所偵測到的抗體的量，其中使用標準曲線對該量進行定量。在某些實施例中，該樣品為血漿、血清或尿液樣品。在某些實施例中，捕獲抗體可固定化於固體支持物上，例如，微量滴定盤。在某些實施例中，可偵測抗體是經螢光標記的。在某些實施例中，膜結合抗原為膜蛋白或其片段。

【0012】 本揭示提供用於偵測樣品中的抗體之套組。在某些實施例中，本揭示的套組包括 (a) 捕獲試劑，其包含複數個包含膜結合抗原之 EV，其中該待測的抗體與膜結合抗原特異性結合；及 (b) 可偵測抗體，其與待測的抗體特異性結合。在某些實施例中，複數個 EV 固定化於固體支持物上。在某些實施例中，固體支持物為微量滴定盤。在某些實施例中，可偵測抗體是經螢光標記的。在某些實施例中，抗原為膜蛋白或其片段。

【0013】 在某些實施例中，本揭示進一步提供一種分選產生抗體的細胞的方法。在某些實施例中，該方法包括將該產生抗體的細胞與複數個 EV 一起孵育，其中該複數個 EV 包含：(i) 第一 EV 群，其包含膜結合抗原及第一可偵測標記，其中該產生抗體的細胞的子組與該膜結合抗原特異性結合；及 (b) 第

二 EV 群，其缺乏膜結合抗原但包含與第一標記可區分的第二可偵測標記。在某些實施例中，該方法進一步包括基於該產生抗體的細胞是與該第一 EV 群結合還是與該第一 EV 群及該第二 EV 群之組合結合來分選該產生抗體的細胞。在某些實施例中，該第一 EV 群的產生是藉由 (i) 在第一細胞中表現該膜結合抗原及該第一可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第一細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV。在某些實施例中，其中該第二 EV 群的產生是藉由 (i) 在第二細胞中表現該第二可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第二細胞以產生該複數個包含第二可偵測標記之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個 EV。在某些實施例中，將細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子。在某些實施例中，第一細胞及/或第二細胞為非黏附細胞。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1. 顯示細胞外囊泡 (EV) 形成的示意圖。

圖2A-2B. 用於 EV 形成的設計原則。(2A) 一般 EV 成形物及具有 EV 設計的 Acyl.Hrs。(2B) 具有 EV 設計的 MLGag 及 ARRDC1。

圖 3. 顯示產生 EV 的工作流程的示意圖。

圖 4. 使用西方墨點法鑑定可產生表現 MP-X 的 EV 的囊泡因子。

圖 5. 動態光散射 (Dynamic Light Scattering, DLS) 顯示均勻的囊泡大小。

圖 6. 西方墨點法顯示囊泡因子 MLGag、Acryl.Hrs 及鼠類 ARRDC1 (mARRDC1) 在鼠類細胞中誘導表現 MP-X 的 EV 形成。

圖 7A-7B. EV 產生的挑戰：(7A) 獲得高效 EV 純化的挑戰；及 (7B) 獲得足夠產量的挑戰。

圖 8A-8C. 在收穫日測量 Expi293F™ 細胞及 293S 細胞中 EV 的平均產量 (8A、8B) 和細胞活力 (8C)，這些細胞用於產生表現目標蛋白的 EV，具有 MLGag 作為囊泡因子。

圖 9A-9C. 進行 ELISA 來比較 Expi293F™ 細胞產生的 EV 和 293S 細胞產生的 EV 之間 MP-7 (9A)、MP-8 (9B) 或 MP-4 (9C) 的表現含量。

圖 10A-10C. (10A) 產生明確定義的 EV 粒子。(10B、10C) 基於 EV 的 ELISA 可偵測抗單程 (10B) 和多程 (10C) 膜蛋白的 FACS+ 抗體。

圖 11A-11D. 鑑定細胞株用於篩選經 Expi293F™ EV 免疫的大鼠和小鼠。(11A) 示意圖顯示了動物免疫方案。(11B) 藉由 FACS 顯示抗血清及預抽血與細胞的結合。在大鼠中來自 EV 免疫的 pAb 與 293 細胞結合，但不與 RBA 細胞結合。在小鼠中來自 EV 免疫的 pAb 與 RBA 細胞結合，但不與 3T3 細胞結合。(11C, 11D) 使用 eGFP 的 FACS 顯示 RBA (11C) 和 3T3 (11D) 均是可轉染的。

圖 12A-12C. 細胞株被鑑定用於篩選經 Expi293F™ EV 免疫的兔子及駱馬/駱駝。(12A) 示意圖顯示了動物免疫方案。(12B) 藉由 FACS 顯示抗血清和預抽血與細胞的結合。在兔中來自 EV 免疫的 pAb 不結合 RK13 細胞。在駱馬中來自 EV 免疫的 pAb 確實結合 3T3 細胞，但不結合 Dubca 細胞。(12C) FACS 顯示 RK13 細胞 (左) 及 Dubca 細胞 (右) 均是可轉染的。

圖 13. 大鼠 RBA 細胞可產生 EV，但與 293S 細胞相比，產量較低。

圖 14. 西方墨點法證實全細胞溶胞產物和 EV 中存在 MP-1。

圖 15. 西方墨點法證實 MP-2 存在於 EV 和全細胞溶胞產物中。

圖 16. 西方墨點法證實 MP-3 存在於 ARF-6 中，該 ARF-6 具有由 ARF-6 但無 MLGag 轉染的細胞所產生的 EV。

圖 17. 示意圖顯示 Gag 殼體在空間上阻斷 MP 與大細胞內結構域 (large intracellular domain, ICD) 的結合。

圖 18. 顯示蛋白質 ELISA、基於 EV 的 ELISA 和 FACS 的工作機制的示意圖。

圖 19A 至圖 19D. 基於 EV 的 ELISA 力價 (19A) 與 MP-4 的 FACS 力價 (19B) 具有良好的相關性。FACS (19C) 和基於 EV 的 ELISA (19D) 力價與蛋白質 ELISA 力價沒有良好的相關性。

圖 20A 至圖 20B. 抗 MP-5 血清是使用 DNA 免疫法從以 MP-5 免疫的小鼠收集的。顯示了基於 EV 的 ELISA 力價 (20A) 及 FACS 力價 (20B)。

圖 21. 對於偵測抗 MP5 抗體，基於 EV 的 ELISA 與 FACS 具有良好的相關性。

圖 22A 至圖 22C. MP-6 EV 起始批次的質量控制 (QC) 分析。(22A) 西方墨點法顯示分離的 EV 中存在 MP-6。(22B) 西方墨點法顯示分離的 EV 中存在囊泡因子。(22C) 將使用重組蛋白標準品的定量西方墨點法用於量化分離的 EV 中的 MP-6。

圖 23. 使用 MP-6 EV 的免疫方案。

圖 24A 至圖 24D. (24A) 西方墨點法顯示，從以 EV 免疫的大鼠所收集的抗血清中存在抗 MP-6 及抗 Gag 抗體。(24B) FACS 顯示，抗血清與轉染對照細胞沒有顯著的非特異性結合。(24C, 24D) FACS 顯示在 DNA/蛋白質追加接種前 (24C) 和 DNA/蛋白質追加接種後 (24D) 所收集的抗血清中與 MP-6 表現細胞的結合。

圖 25A 至圖 25B. 純化的初級抗體 (25A) 和血清 (25B) 顯示出相似的 FACS 結果。

圖 26. DNA 追加接種選擇性地增加來自經 EV 免疫之大鼠的抗 MP-6 力價。

圖 27A 至圖 27C. 小鼠抗 MP-7 初級抗體由以表現 MP-7 之 EV 免疫的剔除小鼠所產生，並藉由 FACS 篩選。在最後一次追加接種前 (27A) 和最後一次追加接種後 (27B) 所收集的血清中偵測到抗 MP-7 抗體。血清不結合 3T3 對照細胞 (27C)。

圖 28. 藉由 FACS 篩選小鼠抗 MP-7 融合瘤。

圖 29. 藉由 FACS 篩選小鼠抗 MP-7 融合瘤。

圖 30. 在初代細胞上使用 FACS 篩選小鼠抗 MP-7 mAb。

圖 31A 至圖 31B. 將大鼠以包含膜結合 MP-1 或 MP-1 DNA 之 EV 免疫，並以蛋白質或 DNA 追加接種。藉由 FACS 篩選在追加接種前 (31A) 和追加接種後 (31B) 從大鼠所收集的抗血清。

圖 32. 藉由 FACS 篩選大鼠抗 MP-1 融合瘤。

圖 33. 僅用包含膜結合 MP-8 之蛋白質、DNA 或 EV 對大鼠進行免疫。顯示從每組中發現的 ELISA 陽性和 FACS 陽性抗體的數量。

圖 34. 將大鼠和兔以包含 MP-9 和 MP-9 DNA 之 EV 免疫。顯示以 GFP 標記的 MP-9 EV 和 RFP 標記的空 EV 對大鼠和兔 IgG+ B 細胞進行染色。

圖 35. 將大鼠和兔以包含 MP-10 或 MP-11 之 EV 免疫。顯示以 RFP 標記的 MP EV 和 GFP 標記的空 EV 對兔 IgG+ B 細胞進行染色。

圖 36A. 表面表現需要 MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17 (輔受體「B」) 與 MP-12 及 MP-13 (受體「A」) 的共同表現。

圖 36B. MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17 (輔受體「B」) 與 MP-12 及 MP-13 (受體「A」) 的共同表現導致 EV 併入。

【實施方式】

相關申請之交叉引用

【0015】 本案主張 2020 年 6 月 1 日申請的美國臨時申請號 63/033,014 的優先權，其內容藉由引用方式全文併入。

【0016】 本揭示涉及用於製造細胞外囊泡 (EV) 的改進方法及組成物。本揭示亦涉及新穎的基於 EV 的 ELISA 測定和用於進行該等測定的套組，以及使用包含感興趣的膜結合抗原 (例如，膜蛋白) 的 EV 產生針對特定抗原的抗體的方法。本揭示部分基於以下發現：藉由採用某些純化步驟、囊泡因子及/或產生 EV 的細胞株，可達成 EV 的快速且高產量的生成。部分亦基於以下發現：以抗原呈現 EV 免疫動物可開發針對具有挑戰性的膜蛋白抗原及複合物的功能性抗體。本文敘述了本揭示的非限制性實施例。

【0017】 為了使本揭露明確之目的而非限制之目的，詳細描述分為以下子部分：

- I. 定義；
- II. 製造 EV 之方法；
- III. 基於 EV 的 ELISA 測定和套組；
- IV. 使用 EV 產生抗體之方法；
- V. 用於診斷和偵測之方法及組成物；
- VI. 醫藥組成物；
- VII. 治療方法及投予途徑；
- VIII. 製品；及
- IX. 例示性實施例。

I. 定義

【0018】 本揭示中使用的術語在本揭示的上下文中以及在使用每個術語的特定上下文中通常具有其在本技術領域中的普通含義。某些術語在下文或本揭示的其他地方討論，以在描述本公開的組合物和方法以及如何製備和使用它們時為從業者提供另外的指導。

【0019】 如本文所用，當「一」或「一種」一詞的使用與請求項及/或說明書中的術語「包含」結合使用時，其可意指「一個」，但亦與「一個或多個」、「至少一個」和「一個或大於一個」的含義一致。更進一步，術語「具有」、「包括」、「含有」及「包含」是可互換的，且本技術領域中具有通常知識者認識到這些術語是開放式術語。

【0020】 術語「約」或「大約」意指特定值處於本技術領域中具有通常知識者所確定之可接受的誤差範圍內，其部分地取決於如何測量或確定該值，*即*，取決於測量系統的局限性。例如，按照本技術領域中的實務，「約」可意指 3 倍或 3 倍以上的標準偏差。可替代地，「約」可意指給定值的至多 20%、最佳至多 10%、更佳至多 5% 並且更佳至多 1% 的範圍。可替代地，特別是關於生物系統或過程，該術語意指數值的一個數量級內，最佳地在數值的 5 倍以內，並且更佳地在數值的 2 倍以內。

【0021】 本文中的「個體」或「受試者」為是脊椎動物，諸如人類或非人類動物，例如哺乳動物。哺乳動物包括但不限於人類、非人類靈長類動物、農場動物、競賽動物、嚙齒動物和寵物。非人類動物受試者的非限制性實例包括嚙齒動物，諸如小鼠、大鼠、倉鼠和豚鼠；兔；犬；貓；綿羊；豬；山羊；牛；馬；及非人類靈長類動物，如猿和猴。在某些實施例中，個體或受試者為人類。

【0022】 如本文所用，術語「活體外」涉及人工環境及在人工環境內發生的過程或反應。*活體外*環境例如為試管和細胞培養物，但不以此為限。

【0023】 如本文所用，術語「活體內」涉及自然環境(例如，動物或細胞)及在自然環境中發生的過程或反應，諸如胚胎發育、細胞分化、神經管形成等。

【0024】 如本文所用，術語「生物樣品」涉及從受試者獲得的生物材料樣品，包括生物流體，*例如*，血液、血漿、血清、尿液、痰、脊髓液、胸膜液、乳頭吸出物、淋巴液、呼吸道、腸道和泌尿生殖道的液體、淚液、唾液、乳汁、來自淋巴系統的液體、精液、腦脊液、器官系統內液體、腹水、腫瘤囊腫液、羊水、支氣管肺泡液，膽汁液及它們的組合。

【0025】 本文中的術語「抗體」以最廣義使用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)及抗體片段，只要其等展示出預期抗原結合活性即可。

【0026】 如本文所用，術語「抗體片段」係指除完整抗體以外的分子，其包含完整抗體的一部分，與該完整抗體所結合之抗原結合。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)；及抗原片段形成的多特異性抗體。

【0027】 如本文所用，術語「嵌合抗體」涉及其中重鏈及/或輕鏈的一部分源自特定來源或物種，而重鏈及/或輕鏈的其餘部分源自不同來源或物種的抗體。

【0028】 如本文所用的術語「單株抗體」涉及獲自實質上同源抗體群體之抗體，*即*，包含群體的個別抗體是相同的及/或結合相同的表位，除了*例如*含有天然產生之突變或於單株抗體製劑產生過程中產生的可能的變異體抗體之外，該等變異體通常係以少量存在。與通常包括針對不同決定位(抗原決定基)之不同抗體之多株抗體製劑相反，單株抗體製劑之每個單株抗體係針對於抗原上的單一決定位。因此，修飾詞「單株」表示抗體之特徵係獲自實質上同質之

抗體群體，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。例如，依據本揭示的單株抗體可藉由多種技術來製造，包括但不限於融合瘤方法、重組 DNA 方法、噬菌體展現方法、及利用包含全部或部分人免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物之方法，本文描述該等方法及用於製備單株抗體之其他例示性方法。

【0029】 「裸抗體」涉及未與異源部分 (例如，細胞毒性部分) 或放射性標記結合之抗體。裸抗體可存在於醫藥組成物中。

【0030】 抗體之「類別 (class)」係指為其重鏈所具有的恆定域或恆定區之類型。有五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且其中的幾種可進一步分為次類 (同型 (isotype))，例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 及 IgA₂。在某些實施例中，該抗體屬於 IgG₁ 同型。在某些實施例中，該抗體屬於具有 P329G、L234A 及 L235A 突變的 IgG₁ 同型，以減少 Fc 區效應子功能。在其他實施例中，該抗體屬於 IgG₂ 同型。在某些實施例中，該抗體屬於鉸鏈區中具有 S228P 突變 IgG₄ 同型，以改善 IgG₄ 抗體之穩定性。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 。基於其恆定域之胺基酸序列，抗體之輕鏈可被歸類為兩種類型中的一種，稱為卡帕 (κ) 及拉目達 (λ)。

【0031】 如本文所用，術語「骨架 (framework)」或「FR」涉及除高度可變區 (CDR) 殘基之外的可變域殘基。可變域之 FR 通常由四個 FR 域組成：FR1、FR2、FR3、及 FR4。因此，HVR 及 FR 序列通常以如下順序出現在 VH (或 VL) 中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0032】 如本文所用，術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，係指具有與天然抗體結構實質上類似的結構之抗體或具有含有本文定義的 Fc 區的重鏈之抗體。

【0033】 「經單離之」抗體是從其自然環境的組分中分離出來之抗體。在某些實施例中，將抗體純化至大於 95% 或 99% 純度，藉由 (例如) 電泳 (例

如，SDS-PAGE、等電位聚焦 (IEF)、毛細管電泳) 或層析 (例如，離子交換或反相 HPLC) 來測定。關於評估抗體純度之方法的綜述，參見，例如，Flatman 等人，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0034】 「人共有框架」是代表一系列人免疫球蛋白 VL 或 VH 框架序列中最常見的胺基酸殘基的框架。通常，系列人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列來源於可變域序列的亞組。通常，序列的亞組是如 Kabat 等人在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (第 5 版，NIH Publication 91-3242，Bethesda MD (1991)，第 1-3 卷) 中所述之亞組。在某些實施例中，對於 VL，亞群為如上述 Kabat 等人之文獻中的亞組 κ I。在某些實施例中，對於 VH，亞群為如上述 Kabat 等人之文獻中的亞組 III。

【0035】 「人源化 (humanized)」抗體係指包含來自非人 HVR 之胺基酸殘基及來自人 FR 之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人源化抗體將包括實質上所有至少一個 (且通常兩個) 可變域，其中所有或實質上所有 HVR (例如，CDR) 對應於非人類抗體的那些 HVR，且所有或實質上所有 FR 對應於人類抗體的那些 FR。人源化抗體視情況可包含源自人抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體 (例如，非人抗體) 之「人源化形式」涉及已接受人源化之抗體。

【0036】 如本文所用之術語「高度可變區」涉及抗體可變域的序列中高度可變的每個區 (「互補決定區」或「CDR」) 及/或形成結構上確定的環 (「高度可變環」) 及/或包含與抗原接觸的殘基 (「抗原接觸」)。除非另有說明，否則可變域中之 CDR 殘基及其他殘基 (例如，FR 殘基) 在本文中係根據前述 Kabat 等人文獻中之編號。一般而言，抗體包含六個 CDR；三個在 VH 中 (H1、H2、H3)，及三個在 VL 中 (L1、L2、L3)。在本文中，例示性 CDR 包括：

(a) 高度變異環存在於胺基酸殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、及 96-101 (H3) 處 (Chothia 及 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)) ;

(b) CDR 存在於胺基酸殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2) 及 95-102 (H3) (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 CDR 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)。

【0037】 「免疫結合物」是與一個或多個異源分子複合之抗體, 其包括但不限於細胞毒性劑。

【0038】 術語「核酸分子」或「多核苷酸」包括任何包含核苷酸聚合物的化合物及/或物質。每個核苷酸由鹼基具體而言嘌呤或嘧啶鹼基 (即, 胞嘧啶 (C)、鳥嘌呤 (G)、腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T) 或尿嘧啶 (U))、糖 (即, 去氧核糖或核糖) 及磷酸基團構成。通常, 核酸分子通過鹼基序列進行描述, 其中所述鹼基代表核酸分子的一級結構 (線性結構)。鹼基序列通常由 5' 至 3' 表示。在本文中, 術語核酸分子包括: 去氧核糖核酸 (DNA), 其包括例如, 互補 DNA (cDNA) 和基因體 DNA; 核糖核酸 (RNA), 特定而言信使 RNA (mRNA); DNA 或 RNA 的合成形式; 以及包含兩個或更複數個這些分子的混合聚合物。核酸分子可為線性或環狀的。此外, 術語核酸分子包括有義股和反義股, 以及單股

和雙股形式。此外，本文所述之核酸分子可包含天然存在或非天然存在之核苷酸。非天然存在之核苷酸的例子包括帶有衍生糖、磷酸鹽連接或化學修飾殘基的經修飾之核苷酸鹼基。核酸分子亦包括適於在活體外及/或活體內，例如，在宿主或患者體內直接表現本揭示之抗體的載體的 DNA 和 RNA 分子。該等 DNA (例如，cDNA) 或 RNA (例如，mRNA) 載體可為未修飾的或經修飾的。例如，mRNA 可經過化學修飾以增強 RNA 載體之穩定性及/或編碼分子之表達，從而將 mRNA 注入受試者以產生活體內抗體 (參見例如 Stadler 等人，Nature Medicine 2017，線上公開於 2017 年 6 月 12 日：10.1038/nm.4356 或 EP 2 101 823 B1)。

【0039】 「分離的」核酸係指已經與其天然環境的組分分離的核酸分子。分離的核酸包括通常包含核酸分子之細胞中所含之核酸分子，但是核酸分子存在於染色體外或與自然染色體位置不同之染色體位置。

【0040】 「編碼抗體的分離核酸」涉及編碼抗體重鏈及輕鏈 (或其片段) 之一種或多種核酸分子，包括在單個載體或單獨載體中的該等核酸分子，且該等核酸分子存在於宿主細胞中的一個或複數個位置。

【0041】 如本文所用，術語「載體」係指能夠繁殖與其連接的另一核酸的核酸分子。該術語包括作為自我複製核酸結構之載體以及摻入已引入該宿主細胞的基因組中的載體。某些載體能夠指導與其可操作地連接的核酸的表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

【0042】 如本文所用，術語「抗原」和「免疫原」在本文中可互換使用，涉及在用其免疫的動物中誘導免疫反應 (較佳為抗體反應) 的分子或物質。抗原可為蛋白質、肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或其他天然存在或合成化合物。在某些實施例中，該抗原為蛋白質。在某些實施例中，抗原為膜蛋白或其片段。在某些實施例中，抗原為單程或多程膜蛋白或其片段。

【0043】 如本文所用，術語「異源蛋白質」涉及藉由將編碼異源蛋白質的多核苷酸引入細胞而在細胞中表現的蛋白質。在某些實施例中，異源蛋白質不是細胞天然的。在某些實施例中，異源蛋白質是細胞天然的蛋白質，但由於將編碼異源蛋白質的多核苷酸導入細胞而過度表現。

【0044】 術語「膜結合抗原」和「膜抗原」在本文中可互換使用，涉及直接或間接與膜結合的抗原。

【0045】 術語「膜結合蛋白」和「膜蛋白」在本文中可互換使用，涉及直接或間接與膜結合的蛋白。膜結合蛋白的非限制性實例包括整合蛋白、脂質錨定蛋白和外周蛋白。在某些實施例中，膜蛋白為跨膜蛋白，*例如*，單程或多程膜蛋白或其片段。在某些實施例中，膜蛋白不是跨膜蛋白而是屬於具有跨膜蛋白之複合物 (*例如*，輔因子) 的一部分的蛋白。如本文實例中使用，縮寫字「MP」涉及膜蛋白。

【0046】 如本文所用，術語「跨膜抗原」涉及跨越膜至少一次的抗原。跨膜抗原的非限制性實例包括單程抗原 (*例如*，跨膜一次的抗原)、脂質錨定蛋白或多程抗原，*例如*，跨膜至少兩次的蛋白質。

【0047】 如本文所用，術語「跨膜蛋白」涉及跨越膜至少一次的蛋白。跨膜抗原的非限制性實例包括單程蛋白 (*例如*，跨膜一次的蛋白)、脂質錨定蛋白或多程蛋白，*例如*，跨膜至少兩次的蛋白質。在某些實施例中，跨膜蛋白為單程或多程跨膜蛋白或其片段。在某些實施例中，跨膜蛋白是多程跨膜蛋白或其片段。

【0048】 如本文所用，術語「免疫」涉及向動物投予一種或多種抗原以便在動物中產生抗體的一個或多個步驟。一般而言，免疫包含將一種或多種抗原注射至動物體內。免疫可包含一種或多種抗原的一次或多次投予。在某些實施例中，經由複數個表現抗原之 EV 將抗原投予動物。

【0049】 如本文所用，術語「多株抗體」或「多株抗血清」涉及含有對一種(單價或特異性抗血清)或多種(多價抗血清)抗原具有特異性的抗體混合物的免疫血清，其可從經一種抗原或多抗原免疫動物的血液中製備。

【0050】 如本文所用，術語「佐劑」涉及免疫反應的非特異性刺激劑。佐劑可為包含一種或兩種以下組分之組成物的形式：(a) 一種設計用於形成保護抗原免於快速分解代謝的沉積物的物質(例如，礦物油、明礬、氫氧化鋁、脂質體或表面活性劑[例如，普朗尼克多元醇(pluronic polyol)])和(b) 非特異性刺激免疫宿主動物之免疫反應的物質(例如，藉由增加其中的淋巴因子含量)。用於增加淋巴因子含量的分子的非限制性實例包括脂多醣(lipopolysaccharide，LPS)或其脂質 A 部分、百日咳博德氏桿菌(*Bordetella pertussis*)、百日咳毒素、結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)和胞壁醯二肽(muramyl dipeptide，MDP)。佐劑的非限制性實例包括弗氏佐劑(Freund's adjuvant)(視情況包含滅活結核分枝桿菌(*M. tuberculosis*)以形成弗氏完全佐劑(FCA))、氫氧化鋁佐劑、Ribi 佐劑、Titermax 佐劑、specol 佐劑、鋁鹽佐劑和單磷醯基脂質 A-合成海藻糖二徽菌酸酯(monophosphoryl Lipid A- synthetic trehalose dicorynomylcolate，MPL-TDM)。

【0051】 如本文所用，「治療」(及其語法變體，諸如「治療過程」或「治療中」)係指試圖改變受治療個體之疾病自然病程的臨床干預，並且可進行預防或在臨床病理過程中執行。期望之治療效果包括但不限於預防疾病之發生或複發、減輕症狀、減輕疾病之任何直接或間接病理後果、預防轉移、降低疾病進展之速度、改善或減輕疾病狀態、緩解或改善預後。在某些實施例中，本揭示之抗體用於延遲疾病之發展或減慢疾病之進程。

【0052】 術語「可變區(variable region)」或「可變域(variable domain)」係指參與抗體與抗原結合之抗體重鏈或輕鏈之域。天然抗體之重鏈及輕鏈(分

別為 VH 及 VL) 之可變域通常具有類似的結構，且每個結構域均包含四個保守性骨架區 (FR) 及三個高度可變區 (CDR)。(參見，例如，Kindt 等人，*Kuby Immunology*，第 6 版，W.H. Freeman and Co，第 91 頁，2007 年。) 單個 VH 或 VL 域可足以賦予抗原結合特異性。此外，可使用 VH 或 VL 域從結合抗原的抗體中分離結合特定抗原的抗體，以分別篩選互補 VL 或 VH 域的文庫。參見，例如，Portolano 等人，*J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson 等人，*Nature* 352:624-628 (1991)。

【0053】 如本文所用，術語「篩選」涉及將一種或多種單株抗體 (例如，純化的抗體及/或包含該抗體的融合瘤培養上清液) 進行一種或多種測定，以定性及/或定量測定抗體對於感興趣的抗原結合的能力。

【0054】 如本文所用，「標記」涉及允許直接或間接偵測組成物。標記包括但不限於螢光組成物、顯色標記、電子緻密標記、化學發光標記和放射性標記。例如，但不作為限制，特定標記為綠色螢光蛋白 (「GFP」)、mCherry、dtTomato 或本技術領域已知的其他螢光蛋白 (例如，Shaner 等人，*A Guide to Choosing Fluorescent Proteins*, *Nature Methods* 2(12) 905-909 (2005 年十二月，藉由引用併入本文)，³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H 和 ¹³¹I、螢光團 (諸如稀土螯合物或螢光黃及其衍生物)、玫瑰紅 (rhodamine) 及其衍生物，丹磺醯 (dansyl)，繖形酮 (umbelliferone)、螢光素酶 (諸如螢火蟲螢光素酶和細菌螢光素酶) (美國專利號 4,737,456)、螢光素、2,3-二氫吡啶二酮，以及產生可偵測信號的酶，例如山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase，HRP)、鹼性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、碳水化合物氧化酶 (諸如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase，G6PD)) 和雜環氧化酶 (諸如尿酸酶和黃嘌呤氧化酶)。

【0055】 如本文所用，「黏附細胞」涉及需要附著到表面才能生長的細胞。

【0056】 如本文所用，「非黏附細胞」涉及在懸浮液中培養的細胞。在某些實施例中，非黏附細胞是不需要附著到表面來生長的細胞。

II. 製造EV之方法

【0057】 在一個方面，本揭示涉及製造EV之改良方法。部分基於以下發現：藉由採用某些純化步驟、囊泡因子及/或產生EV的細胞株，可達成EV的快速且高產量的生成。

【0058】 在某些非限制性實施例中，一種用於產生EV的方法包含：(a) 在暴露於囊泡因子的細胞中表現感興趣的蛋白質，*例如*，感興趣的異源蛋白質；(b) 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個EV；及(c) 從培養基中分離複數個EV。在某些實施例中，將細胞暴露於囊泡因子包含在細胞中表現囊泡因子。

【0059】 在某些實施例中，在細胞中表現感興趣的蛋白質包括將編碼感興趣的蛋白質的至少一種多核苷酸導入細胞中。例如，但不作為限制，一種產生EV的方法包括：(a) 在暴露於囊泡因子的細胞中導入編碼感興趣的蛋白質(*例如*，感興趣的異源蛋白質)的多核苷酸；(b) 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個EV；及(c) 從培養基中分離複數個EV。在某些實施例中，可用多核苷酸轉染細胞以在細胞中表現感興趣的蛋白質。

【0060】 在某些實施例中，將細胞暴露於囊泡因子可包括在細胞中表現囊泡因子，*例如*，在表現感興趣的蛋白質的同一細胞中。例如，但不作為限制，可以將編碼囊泡因子的多核苷酸導入細胞中。在某些實施例中，囊泡因子可由編碼感興趣的蛋白質的相同多核苷酸編碼。可替代地，感興趣的蛋白質和囊泡因子可由兩種不同的多核苷酸編碼。例如，但不作為限制，在暴露於囊泡

因子的細胞中表現感興趣的蛋白質包括將編碼囊泡因子的第一多核苷酸和編碼感興趣的蛋白質的第二多核苷酸導入細胞。

【0061】 在某些非限制性實施例中，一種用於產生 EV 的方法包含：(a) 提供 (i) 編碼囊泡因子和感興趣的蛋白質的多核苷酸，及/或 (ii) 編碼囊泡因子的第一多核苷酸和編碼感興趣的蛋白質的第二多核苷酸；(b) 用多核苷酸，*例如*，多核苷酸或第一及第二多核苷酸轉染細胞；(c) 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個 EV；及 (d) 從培養基中分離複數個 EV。在某些實施例中，在單個核酸上提供第一多核苷酸和第二多核苷酸。例示性 EV 生成工作流程如圖 3 所示。

【0062】 在某些實施例中，將細胞暴露於囊泡因子可包括在不同於表現感興趣的蛋白質之細胞的細胞中表現囊泡因子。例如，但不作為限制，產生 EV 的方法可包括在細胞 (*例如*第一細胞) 內表現感興趣的蛋白質。在某些實施例中，可藉由在細胞中導入編碼感興趣的蛋白質的多核苷酸來在細胞中表現感興趣的蛋白質。在某些實施例中，該方法可進一步包括在不同的細胞 (*例如*，第二細胞) 內表現囊泡因子，該不同的細胞與表現感興趣的蛋白質的細胞 (*例如*，第一細胞) 共培養。在某些實施例中，該方法包括將表現感興趣的蛋白質的細胞 (*例如*，第一細胞) 暴露於由另一個細胞 (*例如*，第二細胞) 表現的囊泡因子，以產生展現感興趣的蛋白質的 EV。

【0063】 在某些非限制性實施例中，用於產生 EV 的方法可包括在沒有囊泡因子的情況下在細胞中表現感興趣的蛋白質。在某些實施例中，該方法包含：(a) 在細胞中表現感興趣的異源蛋白質；(b) 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個 EV；及 (c) 從培養基中分離複數個 EV，其中細胞為非黏附細胞。在某些非限制性實施例中，本揭示的方法包含：(a) 提供編碼感興趣的蛋白質的

多核苷酸；(b) 用該多核苷酸轉染細胞；(c) 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個 EV；及 (d) 從培養基中分離複數個 EV。

【0064】 在某些實施例中，產生 EV 的方法可包括在細胞中表現形成蛋白質複合物的兩種或多種蛋白質，*例如*，在細胞中表現形成複合物的兩種或多種異源蛋白質。例如，但不作為限制，本揭示的方法可包括在細胞中表現蛋白質複合物的兩種或多種蛋白質，*例如*，蛋白質複合物的三種或更多種蛋白質、四種或更多種蛋白質、五種或更多種蛋白質、六種或更多種蛋白質、七種或更多種蛋白質、八種或更多種蛋白質或九種或更多種蛋白質。在某些實施例中，在細胞中表現的蛋白質複合物的一種或多種蛋白質可為跨膜蛋白質。在某些實施例中，在細胞中表現的蛋白質複合物的一種或多種蛋白質不是跨膜蛋白質。在某些實施例中，在細胞中表現的蛋白質複合物的一種或多種蛋白質可為外周膜蛋白，*例如*，與跨膜蛋白質相關的蛋白質。在某些實施例中，可藉由導入編碼蛋白質的多核苷酸或藉由導入兩種或多種編碼蛋白質的多核苷酸，在細胞中表現兩種或更多種蛋白質。在某些實施例中，該方法可進一步包括將細胞暴露於囊泡因子，*例如*，藉由在細胞內表現囊泡因子，*例如*，以產生展現兩種或多種蛋白質的複合物的 EV。可替代地及/或另外地，感興趣的蛋白質可在不存在囊泡因子的情況下，在產生大量 EV 的細胞 (*例如*非黏附細胞) 中表現。

【0065】 在某些實施例中，囊泡因子是可促進天然囊泡途徑或直接誘導囊泡形成的候選蛋白質 (圖 1)。非限制性例示性囊泡因子及其工作機制如表 1 所示。在某些實施例中，細胞可被遺傳修飾以表現本文揭示之一種或多種囊泡因子。在某些實施例中，囊泡因子選自 MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1、RhoA (*例如*，RhoA.F30L)、ARF6 (*例如*，ARF6.Q67L) 及它們的組合所組成之群組。在某些實施例中，囊泡因子選自 MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6 (*例如*，ARF6.Q67L) 及它們的組合所組成之群組。在某些實施例中，囊泡因子選

自由 Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6 (例如, ARF6.Q67L) 及它們的組合所組成之群組。

表 1. 囊泡因子及其作用機制。

機制	蛋白質
自組裝 VLP	MLGag
自組裝 VLP	ARRDC1、Acyl.Hrs
增強內源性路徑 (例如, 胞外體、腫瘤)	RhoA.F30L、ARF6.Q67L、VPS4a、HAS3、CD9、CD63、CD81
凋亡體	持續性活化 ROCK1

【0066】 在某些實施例中，囊泡因子為 Gag 蛋白，例如，嵌合 Gag 蛋白。HIV 病毒 Gag 蛋白含有一種肽，該肽可將 Tsg101/ESCRT 複合物結合並補充到膜上以促進病毒出芽 (Pomillos 等人，“HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein,” J Cell Biol. 2003;162(3): 425 – 434)。已顯示將單獨編碼 Gag 的 cDNA 導入人類細胞以生成囊泡 (參見，例如，Qiu 等人，J. Virol. 1999, 73(11):9145-9152；及 Megede 等人，J. Virol. 2000, 74(6):2628-2635)。然而，野生型 HIV Gag 在非人類細胞中不能有效出芽。已顯示嵌合 Gag 蛋白可在人類和鼠類細胞中誘導 EV 產生 (Hammarstedt 等人，“Passive and active inclusion of host proteins in human immunodeficiency virus Type 1 Gag particles during budding at the plasma membrane,” J Virol. 2004;78(11):5686-97；Chen 等人，“Efficient assembly of an HIV-1/MLV Gag-chimeric virus in murine cells,” Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(26):15239-44)。例示性嵌合 Gag (MLGag) 揭示於 Chen 等人，“Efficient assembly of an HIV-1/MLV Gag-chimeric virus in murine cells,” Proc Natl Acad Sci U S A.

2001;98(26):15239-44，其內容藉由引用整體併入。在某些實施例中，嵌合 Gag 蛋白包含來自不同反轉錄病毒的一部分 HIV Gag 和一部分 Gag。例如，但不作為限制，嵌合 Gag 包含 HIV Gag，其中已知指導其定位的 HIV Gag 的區域以來自莫洛尼 (Moloney) 鼠白血病病毒 (murine leukemia virus, MLV)，鼠反轉錄病毒的功能同源區取代。在某些實施例中，HIV Gag 的取代區域為基質域 (matrix domain, MA)，以生成本文中稱為 MLGag 的嵌合 Gag。在某些實施例中，嵌合和全長 Gag 蛋白可以從源自任何物種的內源性反轉錄病毒 (endogenous retroviruse, ERV) 序列產生，例如，如 Stocking 等人，Cell Mol. Life Sci. 65(21):3383 - 3398 (2008) 中所述，其內容藉由引用整體併入。在某些實施例中，囊泡因子為 MLGag。

【0067】 在某些實施例中，囊泡因子為含抑制蛋白域蛋白 1 (ARRDC1)。在某些實施例中，囊泡因子為鼠 ARRDC1 (mARRDC1)。在某些實施例中，囊泡因子為人類 ARRDC1 (hARRDC1)。ARRDC1 是輔助蛋白的四肽 PSAP 基序，且為誘導 EV 形成的宿主蛋白。已表明 ARRDC1 的過表現導致增強微泡 (MV) 的形成。該作用是藉由 PSAP/PTAP 肽補充 Tsg101 介導的。ATPase VPS4a 的過表現導致 MV 形成的進一步增強 (Nabhan 等人，
“Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein,” Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(11):4146-51)。

【0068】 在某些實施例中，囊泡因子為 ADP 核糖基化因子-6 (ARF6)。已顯示 ARF6 為一種 Rho GTP 酶，它以 ERK 依賴性方式驅動腫瘤細胞中微泡的形成 (Muralidharan-Chari 等人， “ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles,” Curr Biol. 2009;19(22):1875-85)。在某些實施例中，囊泡因子為 ARF6 的持續性活化形式。例如，但不作為限制，

ARF6 的持續性活化形式為 ARF6.Q67L (參見例如, Peters 等人, J. Cell Biol 128(6):1003-1017 (1995), 藉由引用將其全文併入本文)。

【0069】 在某些實施例中, 囊泡因子為突變的 RhoA/ROCK1, 其亦可驅動腫瘤細胞中的微囊泡形成 (Li 等人, “RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells,” Oncogene. 2012;31(45):4740-9)。在某些實施例中, 囊泡因子為 RhoA 的持續性活化形式。例如, 但不作為限制, RhoA 的持續性活化形式為 RhoA.F30L (參見, 例如, Lin 等人, JBC 274(33):23633-23641 (1999), 藉由引用將其全文併入本文)。

【0070】 在某些實施例中, 囊泡因子包含原生質膜 (plasma membrane, PM) 結合域、自組裝域和轉運所需的胞內體分選複合物 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 補充域 (圖 2A)。EV 形成的設計原則是能夠快速產生新的 EV 因子/貨 (cargo)。已顯示 PM 靶向和高階低聚合驅動 EV 併入 (Fang 等人, “Higher-Order Oligomerization Targets Plasma Membrane Proteins and HIV Gag to Exosomes,” PLoS Biol. 2007 Jun;5(6):e158)。在某些實施例中, 囊泡因子為 Acyl.Hrs, 其包含醯基化標籤的 PM 結合域和肝細胞生長因子調節的酪胺酸激酶受質 (Hrs) 的 C 端域, 由捲曲螺旋的自組裝域組成, 以及 ESCRT 補充域 (圖 2A)。在某些實施例中, 囊泡因子為 MLGag, 其包含基質 (Matrix) 的 PM 結合域、殼體的自組裝域和 p6 的 ESCRT 補充域 (圖 2B)。在某些實施例中, 囊泡因子包含自組裝域和 ESCRT 補充域。在某些實施例中, 囊泡因子為 ARRDC1, 其包含抑制蛋白域的自組裝域和 ESCRT 補充域 (圖 2B)。可藉由本技術領域已知的任何方法鑑定另外的囊泡因子。例如, 但不作為限制, 可對所有蛋白質 (例如, 人類蛋白質) 的 cDNA 庫進行篩選, 以鑑定增加 EV 產生的單個基因或基因組合。可替代地或另外地, 可進行 CRISPR 或 RNAi 篩選來鑑定抑制 EV 產生的單個基因或基因組合。

【0071】 在某些實施例中，藉由本揭示之方法所產生的 EV 包含囊泡因子及/或感興趣的蛋白質。例如，但不作為限制，囊泡因子被併入 EV 中，*例如*，存在於所產生的 EV 的內部。在某些實施例中，感興趣的蛋白質展現在 EV 的表面上，*例如*，感興趣的蛋白質為跨越膜一次或多次的蛋白質，或為與跨越膜的蛋白質相關的蛋白質。在某些實施例中，藉由所揭示的方法產生的 EV 包含囊泡因子，*例如*，MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6，*例如*，ARF6.Q67L 及感興趣的蛋白質。例如，但不作為限制，藉由本文揭示之方法所產生的 EV 包含 ARF6，*例如*，ARF6.Q67L，及感興趣的蛋白質。在某些實施例中，藉由本文揭示之方法所產生的 EV 包含 MLGag 及感興趣的蛋白質。在某些實施例中，藉由本文揭示之方法所產生的 EV 包含 Acyl.Hrs 及感興趣的蛋白質。在某些實施例中，藉由本文揭示之方法所產生的 EV 包含 ARRDC1 及感興趣的蛋白質。

【0072】 在某些實施例中，囊泡因子為 Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6 中的一種或多種。在某些實施例中，使用 Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6 中的一種或多種是有利的，因為使用 Gag 作為囊泡因子與抗 Gag 抗體的產生相關。抗 Gag 抗體的產生可影響被免疫動物的免疫系統產生抗感興趣的蛋白質之抗體的能力，此可能導致抗感興趣的蛋白質的抗體力價降低。

【0073】 如表 2 所示，Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6 產生的 EV 數量與 MLGag 相似。表 2 中顯示的結果令人驚訝，因為 Gag 已經在細胞表面出芽病毒的背景形成，因此有望有效地產生 EV，而其他囊泡因子，*例如*，Acyl.Hrs、ARRDC1 和 ARF6，在該情況下沒有形成，仍然導致 EV 的高產量。

【0074】 在某些實施例中，囊泡因子 (*例如*，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自用藉由表現囊泡因子所產生之 EV 免疫的相同物種。使用來自同一物種的囊泡因子是有利的，該物種以經表達囊泡因子所產生的 EV 進行免

疫，因為其可降低對囊泡因子而不是免疫動物中感興趣的蛋白質的免疫反應的風險。例如，但不作為限制，若要免疫小鼠以產生抗感興趣的蛋白質的抗體，則囊泡因子 (例如，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自小鼠，例如，小鼠 Acyl.Hrs、小鼠 ARRDC1 及/或小鼠 ARF6。在某些實施例中，若要免疫大鼠以產生抗感興趣的蛋白質的抗體，則囊泡因子 (例如，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自大鼠，例如，大鼠 Acyl.Hrs、大鼠 ARRDC1 及/或大鼠 ARF6。在某些實施例中，若要免疫兔以產生抗感興趣的蛋白質的抗體，則囊泡因子 (例如，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自兔，例如，兔 Acyl.Hrs、兔 ARRDC1 及/或兔 ARF6。在某些實施例中，若要免疫駱馬以產生抗感興趣的蛋白質的抗體，則囊泡因子 (例如，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自駱馬，例如，駱馬 Acyl.Hrs、駱馬 ARRDC1 及/或駱馬 ARF6。在某些實施例中，若要免疫人類以產生抗感興趣的蛋白質的抗體，則囊泡因子 (例如，Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6) 可來自人類，例如，人類 Acyl.Hrs、人類 ARRDC1 及/或人類 ARF6。

【0075】 在某些實施例中，細胞被修飾以表現囊泡因子。例如，但不作為限制，將編碼囊泡因子的多核苷酸導入細胞以表現囊泡因子。在某些實施例中，用編碼囊泡因子的多核苷酸轉染細胞以在細胞中表現囊泡因子。

【0076】 在某些實施例中，細胞在適於表現囊泡因子的條件下培養。在某些實施例中，細胞在適於產生 EV 的條件下培養。例如，但不作為限制，細胞在細胞培養基中培養以表現囊泡因子及/或產生 EV。

【0077】 在某些實施例中，將表現囊泡因子的細胞孵育適當時間以產生 EV。在某些實施例中，將表現囊泡因子的細胞孵育約 12 小時至約 72 小時以產生 EV。在某些實施例中，將表現囊泡因子的細胞孵育約 24 小時至約 64 小時

以產生 EV。在某些實施例中，將表現囊泡因子的細胞孵育約 48 小時以產生 EV。

【0078】 在某些實施例中，藉由孵育表現囊泡因子的細胞所產生的 EV 隨後被純化。在某些實施例中，EV 是從細胞培養基純化。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 24 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 12 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 5 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 4 小時完成，*例如*，約 1 小時至約 4 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 3 小時完成。在某些實施例中，使用超速離心從細胞培養基中分離 EV。

【0079】 在某些實施例中，本文所述使用囊泡因子產生 EV 的方法能夠產生的純化 EV 約 0.5 mg 或更多，*例如*，0.5-1.0 mg；約 1.0 mg 或更多，*例如*，1.0-1.5 mg；約 1.5 mg 或更多，*例如*，1.5-2.0 mg；約 2.0 mg 或更多，*例如*，2.0-3.0 mg；約 2.5 mg 或更多，*例如*，2.5-3.0 mg；約 3.0 mg 或更多，*例如*，3.0-4.0 mg；約 3.5 毫克或更多，*例如*，3.5-4.0 mg；約 4.0 mg 或更多，*例如*，4.0-5.0 mg；約 4.5 mg 或更多，*例如*，4.5-5.0 mg；約 5.0 mg 或更多，*例如*，5.0-6.0 mg；或約 5.5 mg 或更多，*例如*，5.5-6.0 mg。在某些實施例中，本文所述使用囊泡因子產生 EV 的方法能夠產生約 3.0 mg 或更多的純化 EV，*例如*，3.0-5.0 mg。在某些實施例中，本文所述使用囊泡因子產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的細胞的約 24-72 小時內產生上述量的 EV。在某些實施例中，本文所述使用囊泡因子產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的細胞的約 24-48 小時內產生上述量的 EV。在某些實施例中，本文所述使用囊泡因子產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的細胞的約 48-72 小時內產生上述量的 EV。

【0080】 在某些實施例中，用於本文所揭示 EV 產生之方法中的細胞為哺乳動物細胞。在某些實施例中，細胞為人類細胞。在某些實施例中，細胞為遺傳修飾的人類細胞。在某些實施例中，細胞為黏附細胞。例如，但不作為限制，細胞可為黏附生長的 HEK293 細胞。HEK293 為一種源自組織培養中所生長的人類胚胎腎細胞的細胞株。在某些實施例中，細胞為 CHO 細胞。例如，但不作為限制，細胞為 ExpiCHO™ 細胞 (ThermoFisher Scientific)。

【0081】 在某些實施例中，本文所揭示用於 EV 產生之方法中的細胞不是黏附細胞。在某些實施例中，本文所揭示用於 EV 產生之方法中的細胞為非黏附細胞，例如，生長於懸浮液的細胞。在某些實施例中，非黏附細胞為已適應懸浮培養的 HEK293 細胞。例如，但不作為限制，細胞為 293S 細胞，其為適應懸浮培養的 HEK293 細胞。在某些實施例中，細胞為 Expi293F™ 細胞 (ThermoFisher Scientific)，其源自 HEK293 細胞並維持在懸浮培養中。如實例 2 所示，與黏附細胞 (例如，HEK293 細胞) 相比，非黏附細胞 (例如，293S 細胞和 Expi293F™ 細胞) 產生最高產量的 EV。

【0082】 對於 EV 產生，使用非黏附細胞而不是黏附細胞有很多好處。例如，使用非黏附細胞簡化了 EV 產生，因為與生長相同數量的黏附細胞所需的大量組織培養盤相比，在單個搖瓶中生長非黏附細胞顯然較為容易。與黏附細胞相比，培養非黏附細胞亦更容易且成本更低，需要較少的耗材，且更容易從培養基中分離出來。此外，使用非黏附細胞株，諸如 Expi293F™ 細胞株，即使在不存在囊泡因子的情況下，也令人驚訝地導致高產量的囊泡。如圖 7B 所示，與黏附 HEK293 細胞株相比，使用非黏附細胞株 (諸如 293S 細胞株和 Expi293F™ 細胞株) 令人驚訝地導致較高產量的 EV。

【0083】 在某些實施例中，非黏附細胞被修飾以表現感興趣的蛋白質。例如，但不作為限制，將編碼感興趣的蛋白質的多核苷酸導入非黏附細胞以表

現感興趣的蛋白質。在某些實施例中，非黏附細胞以編碼感興趣的蛋白質的多核苷酸轉染，以在細胞中表現感興趣的蛋白質。

【0084】 在某些實施例中，非黏附細胞在適於表現感興趣的蛋白質的條件下培養。在某些實施例中，非黏附細胞在適於 EV 產生的條件下培養。例如，但不作為限制，非黏附細胞在細胞培養基中培養以表現感興趣的蛋白質及/或產生 EV。

【0085】 在某些實施例中，將表現感興趣的蛋白質的非黏附細胞孵育適當時間以產生 EV。在某些實施例中，將表現感興趣的蛋白質的非黏附細胞孵育約 12 小時至約 72 小時以產生 EV。在某些實施例中，將表現感興趣的蛋白質的非黏附細胞孵育約 24 小時至約 64 小時以產生 EV。在某些實施例中，將表現感興趣的蛋白質的非黏附細胞孵育約 48 小時以產生 EV。

【0086】 在某些實施例中，藉由孵育表現感興趣的蛋白質的非黏附細胞所產生的 EV 隨後被純化。在某些實施例中，EV 是從細胞培養基純化。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 24 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 12 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 5 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 30 分鐘至約 4 小時完成，*例如*，約 1 小時至約 4 小時完成。在某些實施例中，EV 的純化需要約 3 小時完成。在某些實施例中，使用超速離心從培養基中分離 EV。

【0087】 在某些實施例中，本文所述使用非黏附細胞株產生 EV 的方法，*例如*，在沒有囊泡因子的情況下，能夠產生的純化 EV 約 0.1 mg 或更多，*例如*，0.1-1.0 mg、0.1-2.0 mg、0.1-3.0 mg、0.1-4.0 mg、0.1-5.0 mg 或 0.1-6.0 mg；約 0.2 mg 或更多；約 0.3 mg 或更多；約 0.4 mg 或更多；約 0.5 mg 或更多；約 0.6 mg 或更多；約 0.7 mg 或更多；約 0.8 mg 或更多；約 0.9 mg 或更多；約 1.0 mg 或更多，*例如*，1.0-2.0 mg、1.0-3.0 mg、1.0-4.0 mg、1.0-5.0 mg

或 1.0-6.0 mg；約 1.1 mg 或更多；約 1.2 mg 或更多；約 1.3 mg 或更多；約 1.4 mg 或更多；約 1.5 mg 或更多；約 1.6 mg 或更多；約 1.7 mg 或更多；約 1.8 mg 或更多；約 1.9 mg 或更多；約 2.0 mg 或更多，*例如*，2.0-3.0 mg、2.0-4.0 mg、2.0-5.0 mg 或 2.0-6.0 mg；約 3.0 mg 或更多，*例如*，3.0-4.0 mg、3.0-5.0 mg 或 3.0-6.0 mg；約 4.0 mg 或更多，*例如*，4.0-5.0 mg 或 4.0-6.0 mg；或約 5.0 mg 或更多，*例如*，5.0-6.0 mg。在某些實施例中，本文所述使用非黏附細胞株產生 EV 的方法能夠產生的純化 EV 約 1.0 mg 或更多，*例如*，1.0-6.0 mg。在某些實施例中，本文所述使用非黏附細胞株產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的非黏附細胞約 24-72 小時內產生上述量的 EV。在某些實施例中，本文所述使用非黏附細胞產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的非黏附細胞的約 24-48 小時內產生上述量的 EV。在某些實施例中，本文所述使用非黏附細胞產生 EV 的方法能夠在培養表現異源蛋白質的非黏附細胞的約 48-72 小時內產生上述量的 EV。

【0088】 在某些實施例中，本文所揭示的方法進一步包括從培養基中分離 EV，*例如*，複數個 EV。在某些實施例中，使用超速離心從培養基中分離 EV。在某些實施例中，使用 PEG 沉澱從培養基中分離 EV。在某些實施例中，使用基於鹽的沉澱從培養基中分離 EV。例如，但不作為限制，一種產生 EV 的方法包括：*(a)* 在暴露於囊泡因子的細胞中表現感興趣的蛋白質，*例如*，藉由在細胞中表現囊泡因子；*(b)* 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個 EV；及 *(c)* 藉由超速離心、PEG 沉澱及/或基於鹽的沉澱從培養基中分離 EV。在某些實施例中，用於產生 EV 的方法包含：*(a)* 在暴露於囊泡因子的細胞中表現感興趣的蛋白質，*例如*，藉由在細胞中表現囊泡因子；*(b)* 在培養基中活體外培養細胞以產生複數個 EV；及 *(c)* 藉由超速離心從培養基中分離 EV。

【0089】 在某些實施例中，在分離 EV 之前將細胞培養至少 12 小時、至少 24 小時、至少 36 小時或至少 48 小時。在某些實施例中，在分離 EV 之前將細胞培養至少 24 小時。在某些實施例中，在分離 EV 之前將細胞培養至少 48 小時。例如，但不作為限制，一種產生 EV 的方法包括：(a) 在暴露於囊泡因子的細胞中表現感興趣的蛋白質，*例如*，藉由在細胞中表現囊泡因子；(b) 在培養基中活體外培養細胞至少約 24 小時或至少約 48 小時以產生複數個 EV；及 (c) 藉由超速離心、PEG 沉澱及/或基於鹽的沉澱從培養基中分離 EV。

【0090】 在某些實施例中，感興趣的蛋白質或膜結合抗原 (*例如*，膜蛋白) 並不與靶向多肽或肽的胞外體融合。在某些實施例中，感興趣的蛋白質或膜結合抗原 (*例如*，膜蛋白) 並不與靶向多肽或肽的胞外體交聯。

【0091】 在某些實施例中，囊泡因子並不是 Gag 蛋白。在某些實施例中，囊泡因子並不是 MLV Gag 蛋白。在某些實施例中，囊泡因子並不是未切割的 Gag 蛋白。在某些實施例中，囊泡因子並不是未修飾的 Gag 蛋白。在某些實施例中，囊泡因子並不是非嵌合 Gag 蛋白。

【0092】 在某些實施例中，細胞培養物或細胞懸浮液不包含 Gag 蛋白。在使用非黏附細胞的某些實施例中，在不存在囊泡因子的情況下培養細胞，*例如*，在不存在 Gag 蛋白的情況下。在某些實施例中，使用不包含表現囊泡因子的多核苷酸的非黏附細胞。在某些實施例中，使用不包含表現 Gag 蛋白的多核苷酸的非黏附細胞，*例如* 293S 細胞或 Expi293 細胞，無論該 Gag 蛋白為 MLV Gag 蛋白、未切割的 Gag 蛋白、非嵌合 Gag 蛋白或未修飾的 Gag 蛋白。

III. 基於 EV 的 ELISA 測定和套組

【0093】 本揭示亦提供基於 EV 的酶聯免疫吸附測定 (ELISA)。在某些實施例中，本揭示的基於 EV 的 ELISA 測定具有偵測樣品中抗體含量的優點，其中該抗體能夠結合抗原的天然形式。在某些實施例中，本揭示提供用於偵測

樣品中的抗體之方法，其包含：(a) 孵育樣品與捕獲試劑以將抗體與捕獲試劑結合，其中捕獲試劑包含複數個表現抗原的 EV，且抗體與抗原特異性結合；(b) 藉由將結合的抗體與可偵測抗體接觸來偵測與捕獲試劑結合的抗體，其中可偵測抗體與抗體特異性結合。在某些實施例中，該方法進一步包含 (c) 測量在 (b) 中所檢測到的抗體的量，其中使用標準曲線對該量進行定量。在某些實施例中，捕獲試劑固定化於固相上。

【0094】 在某些實施例中，抗原為膜蛋白或其片段。在某些實施例中，膜蛋白為單程膜蛋白。在某些實施例中，膜蛋白為脂質錨定蛋白。在某些實施例中，膜蛋白為多程膜蛋白。本技術領域已知的用於產生 EV 的任何適當方法都可與目前揭示的測定一起使用。在某些實施例中，抗原呈現 EV 根據部分 II 中所揭示的方法產生。例如，但不作為限制，用於本文所揭示之基於 EV 的 ELISA 測定之 EV 可包含囊泡因子 (例如，MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1 及/或 ARF6，例如，ARF6.Q67L) 和抗原。

【0095】 在某些實施例中，本文所揭示之捕獲試劑在測定之前固定化於固相上。固定化可藉由在測定程序之前不溶解捕獲試劑、藉由吸附到水不溶性基質或表面 (美國專利號 3,720,760) 或非共價或共價偶合 (例如，使用戊二醛或碳二亞胺交聯，預先使用或不使用例如硝酸和還原劑活化支持物來完成，如美國專利號 3,645,852 或 Rotmans 等人，J. Immunol. Methods 57:87-98 (1983) 中所述)。固定化可藉由在測定程序之後不溶解捕獲試劑來完成，例如，藉由免疫沉澱。

【0096】 用於固定化的固相可為任何惰性支持物或載劑，其基本上不溶於水且可用於免疫測定。惰性支持物可為例如，表面、顆粒、多孔基質等形式。支持物的非限制性實例包括小片、葡聚糖凝膠 (Sephadex)、聚氯乙烯、塑料珠和測定盤 (例如，96 孔微量滴定盤) 或由聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯等製成

的試管，以及微粒材料，諸如濾紙、瓊脂糖、交聯葡聚糖和其他多醣。另外地，反應性非水溶性基質 (諸如經溴化氰活化的碳水化合物) 及美國專利號 3,969,287；3,691,016；4,195,128；4,247,642；4,229,537 和 4,330,440 中所述的反應性受質可與本揭示一起用於捕獲試劑固定化，其內容藉由引用整體併入。在某些實施例中，固定化的捕獲試劑塗布於微量滴定盤上。在某些實施例中，固相為可用於一次分析數個樣品的多孔微量滴定盤。在某些實施例中，固相為 96 孔 ELISA 盤。

【0097】 在某些實施例中，捕獲試劑藉由非共價或共價相互作用或所需之物理連接而連接至該固相上，以形成塗布盤。適當的連接技術包括在美國專利號 4,376,110 及其中所引用之參考文獻所述的技術，其全部內容藉由引用整體而併入。

【0098】 在某些實施例中，將盤或其他固相與交聯劑和捕獲試劑一起孵育，以將捕獲試劑連接至固相。交聯劑的非限制性實例包括例如，1,1-雙(重氮乙醯基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羥基琥珀醯亞胺酯，例如具有 4-疊氮水楊酸的酯類、同雙官能醯亞胺酯，包括二琥珀醯亞胺酯，諸如 3,3'-二硫代雙(琥珀醯亞胺丙酸酯)和雙官能馬來亞醯胺，諸如雙-N-馬來亞醯胺-1,8-辛烷。諸如 3-[(對疊氮苯基)二硫代]丙亞胺酸酯的衍化劑產生能夠在光存在下形成交聯的光活化中間體。

【0099】 在某些實施例中，然後以阻斷劑處理塗布盤，該阻斷劑與結合位點非特異性結合並使結合位點飽和，以防止游離配體與盤孔上的過量位點發生不需要的結合。適當之阻斷劑的非限制性實例包括明膠、牛血清白蛋白、血清蛋白、酪蛋白和脫脂牛奶。

【0100】 在某些實施例中，在將樣品與經固定化的捕獲試劑一起孵育後，將經固定化的捕獲試劑與可偵測抗體接觸。在某些實施例中，可偵測抗體

為單株抗體。在某些實施例中，可偵測抗體為多株抗體。在某些實施例中，可偵測抗體為可直接偵測的。在某些實施例中，可偵測抗體包含螢光標記或比色標記。在某些實施例中，可偵測抗體是生物素化的，且偵測方法是卵白素或鏈黴親和素- β -半乳糖苷酶和 MUG。

【0101】 本揭示亦提供用於進行目前揭示的基於 EV 的 ELISA 測定的套組。在某些實施例中，用於偵測樣品中抗體含量的套組，其包含：(a) 含複數個抗原呈現 EV 的捕獲試劑，其中抗原與抗體特異性結合；及 (b) 與捕獲的抗體結合的可偵測抗體。

【0102】 在某些實施例中，該套組進一步包含用於捕獲試劑的固體支持物。在某些實施例中，固體支持物以單獨的元素提供。在某些實施例中，所提供的固體支持物已藉由捕獲試劑塗布。因此，套組中包含膜結合抗原之 EV 可已經固定化於固體支持物上，或者其可固定化於套組中包含的或與套組分開提供的支持物上。在某些實施例中，捕獲試劑包被塗布於微量滴定盤上。在某些實施例中，可偵測抗體為可直接偵測的經標記抗體。在某些實施例中，可偵測抗體為未標記抗體，其可藉由針對在不同物種中產生的可偵測抗體的經標記抗體進行偵測。在某些實施例中，標記為酶，且套組進一步包含酶所需的受質和輔因子。在某些實施例中，標記為螢光團，且套組進一步包含提供可偵測發色團的染料前體。在某些實施例中，可偵測抗體是未標記的，且該套組進一步包含用於可偵測抗體的偵測工具，例如針對未標記抗體的經標記抗體，較佳地為螢光偵測形式。

【0103】 在某些實施例中，套組進一步包含進行測定的指令及/或抗體標準品 (例如，純化的抗體，較佳為重組產生的抗體)，以及其他添加劑，諸如穩定劑、洗滌和孵育緩衝劑等。

【0104】 在某些實施例中，套組的組分以預定比例提供，各種試劑的相對量適當變化以獲得所需的測定靈敏度。在某些實施例中，試劑以乾粉形式提供(例如，凍乾的形式)。

IV. 使用EV產生抗體的方法

【0105】 在另一方面，本揭示提供用於抗體產生之方法。製造抗某些抗原(例如，膜結合抗原)的抗體可具有挑戰性，因為難以產生足夠數量的正確折疊的抗原，部分可由該等抗原的細胞毒性、低表現產量、聚集和折疊不當引發。參見，例如，Katzen 等人，Trends Biotech. 27(8):455-460 (2009)。例如，由於聚集和二硫化物錯誤配對，富含二硫鍵(>2 個二硫化物)的蛋白質的表現可被限制(參見，例如，Saez 等人，Meth. Mol. Biol. 1586:155-180 (2017); Crook 等人，Nat Comm.8:2244 (2017))。此外，膜蛋白複合物(例如，同型二聚體、異二聚體和同型三聚體複合物)的表現可能具有挑戰性，因為複合物中一種或多種蛋白質的跨膜域通常會穩定高階複合物，且複合物的蛋白質之間的相互作用可為虛弱的。進一步地，該等膜蛋白複合物在洗滌劑中的溶解可很苛刻，會破壞天然複合物的相互作用或去除與脂質環境的關鍵相互作用(參見，例如，Birnbbaum 等人，PNAS 111(49):17576-17581 (2014); Henrich 等人，eLife 6:e20954 (2017))。因此，已經測試了各種免疫方法來產生抗該等挑戰性抗原的抗體，包括以編碼該等抗原的 DNA、表現該等抗原的細胞、大腸桿菌(*E. Coli*)產生的變性抗原或 CHO 細胞產生的 Fc 融合抗原來免疫小鼠。在某些實施例中，本揭示的標的針對以包含膜結合抗原(例如，多程膜蛋白)的 EV 免疫動物，此可導致產生對挑戰性抗原具有所需結合特性的抗體。

【0106】 在某些非限制性實施例中，本揭示提供用於免疫動物的方法，包含投予動物複數個包含膜結合抗原之 EV 以產生與抗原特異性結合的抗體。

【0107】 在某些實施例中，抗原為膜蛋白或其片段。在某些實施例中，抗原為膜蛋白的片段。在某些實施例中，膜蛋白為單程膜蛋白、脂質錨定蛋白或多程膜蛋白。可與本文揭示的方法一起使用的蛋白質類別的非限制性實例包括受體，*例如*，G-蛋白偶聯受體 (GPCR)、GPI-錨定蛋白、離子通道、多跨膜蛋白、富含二硫鍵的細胞外域 (extracellular domain, ECD)、不穩定的 ECD、多組分複合物 (*例如*，同型二聚體蛋白質複合物、異二聚體蛋白質複合物、多蛋白質複合物等)。在某些實施例中，抗原可為與膜蛋白相關的蛋白質，*例如*，多蛋白質複合物的蛋白質部分。例如，但不作為限制，與膜蛋白相關的蛋白質可為輔因子。

【0108】 在某些實施例中，膜蛋白為多程膜蛋白。例如，但不作為限制，膜蛋白跨越膜至少約兩次、至少約三次、至少約四次、至少約五次、至少約六次、至少約七次、至少約八次、至少約九次、至少約十次、至少約十一次或至少約十二次。在某些實施例中，膜蛋白跨越膜至少七次，*例如*，GPCR。

【0109】 在某些實施例中，膜蛋白具有細胞內結構域，其包含 700 個胺基酸或更少、650 個胺基酸或更少、600 個胺基酸或更少、550 個胺基酸或更少、500 個胺基酸或更少、450 個胺基酸或更少、400 個胺基酸或更少、350 個胺基酸或更少、300 個胺基酸或更少、250 個胺基酸或更少、200 個胺基酸或更少、150 個胺基酸或更少、100 個胺基酸或更少、95 個胺基酸或更少、90 個胺基酸或更少、85 個胺基酸或更少、80 個胺基酸或更少、75 個胺基酸或更少、70 個胺基酸或更少、65 個胺基酸或更少、60 個胺基酸或更少、55 個胺基酸或更少、50 個胺基酸或更少、45 個胺基酸或更少、40 個胺基酸或更少、35 個胺基酸或更少、30 個胺基酸或更少、25 個胺基酸或更少、20 個胺基酸或更少、15 個胺基酸或更少、10 個胺基酸或更少或 5 個胺基酸或更少。例如，但不作為限制，膜蛋白具有包含 400 個胺基酸或更少的細胞內結構域。在某些實施例

中，若使用 Gag (例如，MLGag) 囊泡因子產生展現感興趣的膜蛋白 (例如，感興趣的膜蛋白) 的 EV，則膜蛋白具有包含 700 個胺基酸或更少、600 個胺基酸或更少、500 個胺基酸或更少、400 個胺基酸或更少、300 個胺基酸或更少、200 個胺基酸或更少或 100 個胺基酸或更少的細胞內結構域。在某些實施例中，若使用 Gag (例如，MLGag) 囊泡因子來產生展現感興趣的膜蛋白 (例如，感興趣的膜蛋白) 的 EV，則膜蛋白具有包含 200 個胺基酸或更少的細胞內結構域。

【0110】 在某些實施例中，膜蛋白為離子通道。在某些實施例中，離子通道為陽離子通道。例如，但不作為限制，膜蛋白為鉀離子通道、鈉離子通道或鈣離子通道。在某些實施例中，離子通道為鈉離子通道。

【0111】 本技術領域已知的用於製造 EV 之方法可與本文所揭示之方法一起使用。例如，但不作為限制，本技術領域已知的用於製造展現包含抗原之感興趣的蛋白質的 EV 的方法可與本文所揭示的抗體產生方法一起使用。在某些實施例中，使用本揭示的部分 II 中所揭示之方法產生 EV。在某些實施例中，抗原位於 EV 的膜上，其中抗原的構形與其在細胞膜上的構形 (例如，天然構形) 實質上相似。

【0112】 在某些非限制性實施例中，本揭示提供產生抗感興趣的蛋白質之抗體的方法。在某些實施例中，該方法包括藉由對動物投予複數個包含抗原 (例如，感興趣的蛋白質，例如，感興趣的膜蛋白) 之 EV 以產生與抗原特異性結合的抗體來免疫動物。

【0113】 在某些實施例中，免疫動物包含將 EV 注射至動物體內。免疫可涉及向動物投予一次或多次 EV。在某些實施例中，該方法包含向動物投予 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 或更多次 EV。在某些實施例中，向動物投

予約 3 至約 6 次 EV。在某些實施例中，在第 0 週、第 2 週和第 4 週向動物投予 EV。

【0114】 在某些實施例中，動物的免疫可藉由 FACS 監測以偵測產生的靶特異性抗體的含量。若偵測到適當的力價 (例如，藉由在 1:1000 血清稀釋度下偵測 FACS 反應)，單株抗體的產生可如本文所述開始，例如，藉由 B 細胞選殖或融合瘤產生。

【0115】 在某些實施例中，該方法進一步包含在投予 EV 後，從動物收集抗血清，其中抗血清包含由動物產生的抗體。

【0116】 在某些實施例中，EV 與佐劑一起投予動物。佐劑的非限制性實例包括弗氏佐劑 (視情況包含分枝桿菌或其組分以形成弗氏完全佐劑 (FCA))、Ribi 佐劑、Titermax 佐劑、specol 佐劑和鋁鹽佐劑。在某些實施例中，佐劑為 Ribi 佐劑。Ribi 佐劑為水包油乳劑，其中抗原 (例如，抗原呈現 EV) 與可代謝油 (角鯊烯) 混合，該可代謝油在含油酸聚醇山梨酯 (Tween 80) 的食鹽溶液中乳化。在某些實施例中，Ribi 佐劑亦包含用作免疫刺激劑的精製分枝桿菌產物和革蘭氏陰性細菌產物單磷醯脂質 A。在某些實施例中，Ribi 與免疫細胞的膜相互作用導致細胞因子誘導，從而增強抗原攝取、加工和呈遞。在某些實施例中，產生抗感興趣蛋白質之抗體的方法包括對動物投予展現感興趣的蛋白質的複數個 EV 與佐劑之組合。

【0117】 在某些實施例中，該方法進一步包含對動物投予追加接種。例如，但不作為限制，產生抗感興趣蛋白質之抗體的方法包括對動物投予展現感興趣的蛋白質的複數個 EV 與追加接種之組合。追加接種可增強動物的免疫反應，因此增加動物產生的抗體之數量和質量。在某些實施例中，追加接種包含編碼抗原或抗原片段的多核苷酸。在某些實施例中，多核苷酸為 DNA。在某些實施例中，追加接種包含多肽或蛋白質，該多肽或蛋白質包含抗原或其片段。

在某些實施例中，追加接種與 EV 同時投予。在某些實施例中，在對動物投予 EV 後約 1 天、約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天、約 7 天、約 8 天、約 9 天、約 10 天、約 11 天、約 12 天，約 13 天，約 14 天，約 15 天，約 16 天，約 17 天，約 18 天，約 19 天，約 20 天，約 21 天，約 22 天，約 23 天、約 24 天、約 25 天、約 26 天、約 27 天、約 28 天、約 29 天及/或約 30 天，進行追加接種。在某些實施例中，在對動物投予第一劑量之 EV 後約 1 天、約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天、約 7 天、約 8 天、約 9 天、約 10 天、約 11 天、約 12 天，約 13 天，約 14 天，約 15 天，約 16 天，約 17 天，約 18 天，約 19 天，約 20 天，約 21 天，約 22 天，約 23 天、約 24 天、約 25 天、約 26 天、約 27 天、約 28 天、約 29 天及/或約 30 天，進行追加接種。例如，但不作為限制，在對動物投予 EV (例如，第一劑量之 EV) 後約 14 天，進行追加接種。在某些實施例中，在對動物投予 EV (例如，第一劑量之 EV) 後約 21 天，進行追加接種。在某些實施例中，EV 可與佐劑和追加接種組合投予動物。

【0118】 本技術領域已知的用於免疫及抗體產生的任何動物皆可與本文所揭示的方法一起使用。可與本文所揭示之方法一起使用的動物的非限制性實例包括諸如舊大陸猴 (Old-World monkey) 的非人類靈長類動物 (例如，狒狒或獼猴，包括恒河猴 (Rhesus monkey) 和食蟹猴 (cynomolgus monkey)，參見美國專利號 5,658,570)、鳥類 (例如，雞)、兔、山羊、綿羊、牛、馬、豬、驢、駱馬、羊駝和犬。在某些實施例中，該動物為嚙齒動物。「嚙齒動物」屬於胎盤哺乳動物的嚙齒目。可用於本文的嚙齒動物的非限制性實例包括小鼠、大鼠、豚鼠、松鼠、倉鼠和雪貂。在某些實施例中，用於免疫的動物為小鼠。

【0119】 包含膜結合抗原的 EV 可遞送至動物體的各种細胞，包括例如肌肉、皮膚、腦、肺、肝臟、脾臟，或遞送至血液細胞。投予包含膜結合抗原

的 EV 並不限於特定途徑或位置。投予途徑的非限制性實例包括肌肉內、皮內、表皮、耳廓內、口腔、陰道和鼻內。在某些實施例中，將包含膜結合抗原的 EV 經肌肉內、皮內或表皮投予動物。在某些實施例中，EV 被遞送至肌肉、皮膚或黏膜組織。

【0120】 在某些實施例中，本文所揭示之方法進一步包含由上述揭示之免疫動物獲得免疫細胞，其中該免疫細胞產生或能夠產生多株抗體。然後可使用合適的融合劑 (例如聚乙二醇或仙台病毒 (Sendai virus))，將該等免疫細胞與骨髓瘤細胞融合，以形成融合瘤細胞 (Godmg, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 頁，學術出版社 (Academic Press)，1986 年)。可替代地或另外地，本文所揭示之方法可包含藉由 B 細胞培養選殖或免疫噬菌體庫的產生來產生抗體。參見，例如，Bazan 等人，Hum. Vaccin.Immunother.

8(12):1817-1828 (2012); Carbonetti 等人，J. Immunol. Methods 448:66-73 (2017)，其內容藉由引用併入本文。

【0121】 如此製備的融合瘤細胞可接種並生長於適當培養基中，該培養基較佳含有一種或多種抑制未融合的親代骨髓瘤細胞生長或存活的物質。例如，若親代骨髓瘤細胞缺乏次黃嘌呤-鳥嘌呤磷醣基核甘轉換酵素(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT 或 HPRT)，則融合瘤的培養基通常包括次黃嘌呤、胺蝶呤 (aminopterin) 和胸苷 (thymidine) (HAT 培養基)，這會阻止 HGPRT 缺陷細胞的生長。骨髓瘤細胞株的非限制性實例為鼠骨髓瘤細胞株，諸如源自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠腫瘤的那些，以及 P3X63AgU.1、SP-2 或 X63-Ag8-653 細胞；大鼠骨髓瘤細胞株 210-RCY3.Agl.2.3；及人類骨髓瘤和小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株。

【0122】 可替代地，融合瘤細胞株可在其他方法中從經免疫之動物的免疫細胞製備，例如，藉由以病毒 (例如，以艾司坦-巴爾病毒 (Epstein Barr

Virus)) 或以致癌基因使免疫細胞永生化，以產生製造感興趣的單株抗體的永生化細胞株。亦可見於 Babcock 等人，PNAS (USA), 93:7843-7848 (1996)，關於藉由從產生特異性抗體的單細胞選殖免疫球蛋白 cDNA 來產生單株抗體，此為使用經免疫動物的免疫細胞製備單株抗體的另一種策略。

【0123】 在某些實施例中，本文所揭示之方法進一步包含篩選步驟以鑑定能夠結合每種抗原的一種或多種單株抗體。在某些實施例中，該方法進一步包含篩選與抗原結合的經免疫動物的抗體。在某些實施例中，可使用來自選殖的融合瘤細胞的培養上清液及/或純化的抗體進行篩選。例如，融合瘤細胞產生的單株抗體的結合特異性可例如在免疫測定中確定。免疫測定的非限制性實例包括 ELISA、放射免疫測定 (RIA) 和 FACS 測定。在某些實施例中，本文所揭示之基於 EV 的 ELISA 可用於抗體篩選。

【0124】 在某些實施例中，本文所揭示之方法允許分選產生抗體的細胞。例如，在某些實施例中，產生抗體的細胞可與複數個 EV 一起孵育，其中該複數個 EV 包含：(1) 第一 EV 群，其包含膜結合抗原及第一可偵測標記，其中該產生抗體的細胞的子組與該膜結合抗原特異性結合；及 (2) 第二 EV 群，其缺乏第一 EV 群的膜結合抗原，但包含與第一標記可區分的第二可偵測標記。在某些實施例中，然後可基於產生抗體的細胞與含第一標記的第一 EV 群或與含第一標記的第一 EV 群和含第二標記的第二 EV 群之組合的結合來分選產生抗體的細胞。在某些實施例中，第一和第二可偵測標記為螢光標記。在某些實施例中，第一和第二螢光標記為螢光蛋白。在某些實施例中，該分選是藉由 FACS 進行。在某些實施例中，產生抗體的細胞為 B 細胞。在某些實施例中，產生抗體的細胞為融合瘤細胞。

V. 用於診斷和偵測之方法及組成物

【0125】 在某些實施例中，本文所揭示之抗體，*例如*，藉由本文所揭示之方法產生的抗體，可用於偵測生物樣品中抗原的存在。如本文所用的術語「偵測」，涵蓋定量或定性偵測。

【0126】 在某些實施例中，提供用於診斷或偵測方法的抗體，*例如*，使用本文所揭示之方法產生的抗體。在另一方面，提供了一種偵測生物樣品中是否存在抗原的方法。在某些實施例中，該方法包括在允許抗體與其對應抗原結合的條件下，使生物樣品與本文所述之抗體接觸，並偵測抗體與相關抗原之間是否形成複合物。該等方法可為活體外或活體內方法。在某些實施例中，使用抗體來選擇適合使用抗體治療的受試者，*例如*，其中抗原為用於選擇患者的生物標記。

【0127】 在某些實施例中，提供經標記的抗體。標記包括但不限於直接偵測的標記或部分 (諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光和放射性標記)，以及間接偵測 (例如，透過酶促反應或分子相互作用) 的部分，例如酶或配體。例示性標記包括但不限於：放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，例如稀土螯合物或螢光素及其衍生物；玫瑰紅及其衍生物；丹磺醯基；繖形酮；螢光素酶，*例如*，螢火蟲螢光素酶和細菌螢光素酶 (美國專利號 4,737,456)；螢光素；2,3-二氫吡啶二酮；山葵過氧化酶 (HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖苷酶；葡萄糖澱粉酶；溶菌酶；醣類氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶和黃嘌呤氧化酶，與採用過氧化氫氧化染料前體 (諸如 HRP、乳過氧化酶或微過氧化酶) 的酶結合使用；生物素/卵白素；旋轉標記；噬菌體標記；穩定自由基等。

VI. 醫藥組成物

【0128】 在另一方面，本揭示提供包含本文所揭示之任何抗體的醫藥組成物，*例如*，用於以下任何治療方法。例如，但不作為限制，使用本文所揭示

之方法產生抗體。在一個方面，醫藥組成物包含本文所提供之任何抗體和醫藥上可接受之載劑。在另一方面，醫藥組成物包含本文所提供之任何抗體及至少一種另外治療劑，*例如*，如下所述。

【0129】 藉由混合具有所需純度的該等抗體與一種或多種視情況的醫藥上可接受之載劑，來製備如本文所述抗體的呈凍乾組成物或水溶液形式的醫藥組成物 (*Remington's Pharmaceutical Sciences*，第 16 版，Osol, A. 主編，1980 年)。醫藥上可接受之載劑在採用的劑量和濃度下通常對接受者無毒，其包括但不限於：緩衝劑，諸如組胺酸、磷酸鹽、檸檬酸鹽、醋酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸和蛋氨酸；防腐劑 (諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苄烷銨；氯化苯索寧；苯酚、丁醇或苄醇；對羥苯甲酸烷基酯，如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇和間甲酚)；低分子量 (小於約 10 個殘基) 多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑 (諸如 EDTA)；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；金屬複合物 (*例如*，鋅蛋白複合物)；及/或非離子表面活性劑，諸如聚乙二醇 (PEG)。本文中例示性醫藥上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑，*例如*可溶性中性活性透明質酸酶醣蛋白 (sHASEGP)，*例如*，人類可溶性 PH-20 透明質酸酶醣蛋白，諸如 rHuPH20 (HYLENEX[®]，Halozyme, Inc.)。某些例示性 sHASEGP 及使用方法 (包括 rHuPH20) 敘述於美國專利公開號 2005/0260186 和 2006/0104968 中。在一個方面，sHASEGP 與一種或多種另外的糖胺聚醣酶諸如軟骨素酶結合在一起。

【0130】 例示性凍乾抗體組成物敘述於美國專利號 6,267,958。水溶性抗體組成物包括美國專利號 6,171,586 和 WO2006/044908 中所述的那些，後者所述之組成物包括組胺酸-醋酸鹽緩衝劑。

【0131】 本文所述之醫藥組成物亦可包含適於所治療之特定適應症的多於一種活性成分，較佳為相互無不利影響的具有互補活性成分的那些。該等活性成分適宜地以對預期目的有效的量組合存在。

【0132】 活性成分可包載在例如透過凝聚技術或透過介面聚合製備的微膠囊 (例如，分別為羥甲基纖維素微膠囊或明膠微膠囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊) 中、膠體藥物遞送系統 (例如脂質體、白蛋白微球、微乳劑、奈米顆粒和奈米膠囊) 中或粗滴乳液中。該等技術公開於 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (第 16 版，Osol, A. 主編，1980 年)。

【0133】 可製備用於緩釋之醫藥組成物。緩釋製劑的適宜的實例包括含有抗體的固體疏水聚合物的半透性基質，該基質是成形物品的形式，例如膜或微膠囊。

【0134】 用於活體內投予之醫藥組成物通常為無菌的。無菌性可易於例如藉由無菌濾膜過濾來達成。

VII. 治療方法及投予途徑

【0135】 本文提供之任何抗體均可用於治療方法中。例如，但不作為限制，本揭示提供藉由本揭示的方法所產生的用於治療方法的抗體。

【0136】 在一個方面，提供本文所揭示之用為藥物的抗體，例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體。在其他方面，提供用於治療疾病的本文所揭示之抗體，例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體。在某些實施例中，提供用於治療方法中的本文所揭示之抗體。

【0137】 在某些實施例中，本揭示提供本文所揭示之抗體 (例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體) 用於治療患有疾病之個體的方法。在某些實施例中，該方法包括對個體投予有效量的本文所揭示之抗體。在某些實施例中，該方法進一步包含將有效量的至少一種另外治療劑 (例如，一種、兩種、三種、四種、五種或六種另外治療劑) 投予該個體。

【0138】 在另一方面，本揭示提供本文所揭示之抗體 (例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體) 在製造或製備藥物上的用途。在某些實施例中，該藥物用於治療疾病。在某些實施例中，該藥物用於治療疾病的方法中，該方法包含對患有疾病的個體投予有效量的藥物。在某些實施例中，該方法進一步包含將有效量的至少一種另外治療劑投予個體。

【0139】 在另一方面，本揭示提供一種治療疾病的方法。在某些實施例中，該方法含括向患有該等疾病的個體投予有效量的本文所揭示之抗體。在某些實施例中，該方法進一步包含將有效量的至少一種另外治療劑投予個體。

【0140】 根據上述任一實施例的「個體」可以是人類。

【0141】 在另一方面，本揭示提供包含本文所提供之任何抗體的醫藥組成物，例如，用於以上任何的治療方法。在某些實施例中，醫藥組成物包含本文所提供之任何抗體和醫藥上可接受之載劑。在某些實施例中，醫藥組成物包含本文所提供之任何抗體及至少一種另外治療劑，例如，如下所述。

【0142】 本揭示的抗體可單獨或與其他藥劑組合用於治療。例如，本揭示之抗體可與至少一種另外治療劑共同投予。

【0143】 上述提及的該組合療法涵蓋組合投予 (其中兩種或多種治療劑包含在同一或單獨的醫藥組成物中)，以及分開投予，在這種情況下，本揭示之抗體的投予可在投予另外的一種或多種另外治療劑之前、同時及/或之後發生。在某些實施例中，投予本揭示之抗體與投予另外治療劑彼此發生在約一個月

內，或發生在約一週、兩週或三週內，或發生在約一天、兩天、三天、四天、五天、或六天內。在某些實施例中，在治療之第 1 天將本揭示之抗體及另外治療劑投予患者。本揭示之抗體亦可與放射療法組合使用。

【0144】 本揭示之抗體 (及任何另外治療劑) 可藉由任何適當方式投予，包括腸胃道外、肺內和鼻內投予，且若需要局部治療，則可採用病灶內投予。腸胃道外輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投予。可透過任何適當途徑給藥，*例如*，透過注射，諸如靜脈內或皮下注射，部分取決於短暫投予還是長期投予。本文中考慮各種給藥方案，其包括但不限於在多種時間點單次或多次投予、快速注射投予和脈衝輸注。

【0145】 本揭示之抗體將按照與良好醫學實踐一致的方式進行調配、給藥及投予。此背景中考慮的因素包括待治療的具體障礙、待治療的具體哺乳動物、個別患者的臨床病症、障礙的原因、遞送藥物的部位、投予方法、投予日程及醫療從業者已知的其他因素。該抗體並非必須、但可以視情況與一種或多種目前用於預防或治療所述疾病之藥劑一起配製。該等其他藥物的有效量視醫藥組成物中存在之抗體的量、疾病或治療的類型以及上文討論的其他因素而定。這些藥物通常以與本文中所述相同的劑量和投予途徑，或本文中所述劑量的約 1% 至 99%，或以經驗上/臨床上確定為適當的任意劑量和透過任意途徑使用。

【0146】 對於疾病的預防或治療，本揭示之抗體的適當劑量 (單獨使用或與一種或多種其他另外治療劑組合使用) 將取決於待治療疾病的類型、抗體的類型、疾病的嚴重程度及病程、為了預防或是治療目的投予該抗體、之前的治療、患者的臨床病史及對該抗體的反應及主治醫師的判斷。在一次或一系列的治療中適宜地對患者投予抗體。根據疾病的類型和嚴重程度不同，約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 15 mg/kg (*例如*，0.1 mg/kg 至 10 mg/kg) 的抗體可為例如透過一次或多次分

開投予或藉由連續輸注來對患者投予的初始候選劑量。根據上述因素，一種典型的日劑量可在約 1 µg/kg 至 100 mg/kg 或更多的範圍內。對於在幾天或更長時間內重複投予，視病症而定，治療通常將持續直至出現所需的疾病症狀抑制。抗體的一種例示性劑量將在從 0.05 mg/kg 至約 10 mg/kg 的範圍內。因此，可對患者投予約 0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg 或 10 mg/kg (或它們的任意組合) 的一種或多種劑量。該等劑量可間歇投予，例如每週或每三週投予 (例如，使得患者接受約 2 個至約 20 個，或例如，約 6 個劑量的抗體)。可投予初始較高的負荷劑量，然後投予一個或多個較低的劑量。例示性的給藥方案包括投予。然而，可使用其他給藥方案。藉由習用技術和測定很容易監測此治療的進展。

VIII. 製品

【0147】 在本揭示的另一方面，提供包含用於治療、預防及/或診斷上述疾病的製品。製成品包括容器及容器上或與容器相關的標籤或藥品仿單。合適的容器包括例如，瓶、小瓶、注射器、IV 溶液袋等。該等容器可由多種材料形成，例如，玻璃或塑膠。該容器可容納組成物，該組成物本身或與有效治療、預防及/或診斷症狀的另一組成物結合使用，並可具有無菌入口 (例如，容器可為具有可透過皮下注射針頭穿孔的塞子的靜脈內溶液袋或小管)。

【0148】 組成物中的至少一種活性劑為本揭示的抗體，例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體。標籤或藥品仿單指示該組成物用於治療所選擇的疾病。此外，該製品可包含 (a) 其中含有組成物的第一容器，其中該組成物包含本揭示的抗體，例如，藉由本揭示的方法所產生的抗體；及 (b) 其中含有組成物的第二容器，其中該組成物包含其他細胞毒性劑或其他治療劑。本揭示的此實施例中的製品可進一步包含指示組成物可以用於治療特定症狀的藥品仿單。可替代地或另外地，製品可進一步包含第二 (或第三) 容器，該容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌注射用水 (bacteriostatic water for injection, BWFI)、

磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏 (Ringer) 溶液和葡萄糖溶液。從商業和使用者的角度來看，可進一步包含其他材料，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

IX. 例示性實施例

【0149】 A. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種產生與蛋白質特異性結合的抗體的方法，其中該方法包含：

(a) 產生複數個包含異源蛋白質之細胞外囊泡 (EV)，該產生是藉由 (i) 在暴露於囊泡因子的細胞中表現該異源蛋白質，(ii) 在培養基中培養該細胞，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個包含異源蛋白質之 EV，其中該囊泡因子選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組；

(b) 藉由向動物投予該複數個 EV 來免疫該動物；及

(c) 從動物中分離與蛋白質結合的抗體。

【0150】 A1.如前述 A 之方法，其中該細胞為非黏附細胞。

【0151】 A2.如前述 A 及 A1 之方法，其中在細胞中表現該囊泡因子和該蛋白質包括在該細胞中導入一種或多種編碼該囊泡因子及該蛋白質的多核苷酸。

【0152】 A3.如前述 A2 之方法，其中該囊泡因子和該蛋白質由單個多核苷酸編碼。

【0153】 A4.如前述 A2 之方法，其中該囊泡因子由第一多核苷酸編碼且蛋白質由第二多核苷酸編碼。

【0154】 B. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種產生與蛋白質特異性結合的抗體的方法，其中該方法包含：(a) 產生複數個包含異源蛋白質之細胞外囊泡 (EV)，該產生是藉由 (i) 在細胞中表現該異源蛋白質，(ii) 在培養基中培養該細胞，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個包含異源蛋白質之

EV，其中該細胞為非黏附細胞；(b) 藉由向動物投予該複數個 EV 來免疫該動物；及 (c) 從該動物中分離與該異源蛋白質結合的抗體。

【0155】 B1.如前述 B 之方法，其中產生該複數個 EV 進一步包含在該細胞中表現異源囊泡因子。

【0156】 B2.如前述 B1 之方法，其中該囊泡因子選自由 MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組。

【0157】 B3.如前述 A-B2 之方法，其中該異源蛋白質為膜蛋白。

【0158】 B4.如前述 B3 之方法，其中該膜蛋白為單程膜蛋白。

【0159】 B5.如前述 B3 之方法，其中該膜蛋白為多程膜蛋白。

【0160】 B6.如前述 B3 之方法，其中該膜蛋白為蛋白質複合物的成員。

【0161】 B7.如前述 B3 之方法，其中該膜蛋白並不是跨膜蛋白而是蛋白質複合物的成員。

【0162】 B8.如前述 A1-B7 之方法，其中該非黏附細胞為 293S 細胞或 Expi293F™ 細胞。

【0163】 B9.如前述 A-B8 之方法，其中藉由超速離心從該培養基中分離該 EV。

【0164】 B10.如前述 A-B9 之方法，其中在第 0 週、第 2 週及第 4 週向該動物投予該複數個 EV。

【0165】 B11.如前述 A-B10 之方法，其進一步包含將佐劑與該 EV 同時投予至該動物。

【0166】 B12.如前述 B11 之方法，其中該佐劑為 Ribi 佐劑。

【0167】 B13.如前述 A-B12 之方法，其進一步包含對該動物投予追加接種以增強該動物對該蛋白質的免疫反應。

【0168】 B14.如前述 B13 之方法，其中該追加接種包含該蛋白質、編碼該蛋白質的多核苷酸或它們的組合。

【0169】 B15.如前述 B14 之方法，其中該追加接種包含該蛋白質。

【0170】 B16.如前述 B14 之方法，其中該追加接種包含編碼該蛋白質的多核苷酸。

【0171】 B17.如前述 A-B16 之方法，其中該抗體為單株抗體。

【0172】 B18.如前述 A-B17 之方法，其中該抗體為人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體。

【0173】 C. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供藉由 A-B18 中任一種的方法所產生的分離抗體或其抗原結合部分。

【0174】 D. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供編碼 C 的抗體或其抗原結合部分的分離核酸。

【0175】 E. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供包含 D 的核酸的宿主細胞。

【0176】 F. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供產生抗體或其抗原結合部分之方法，其中該方法包含在適合表現抗體的條件下培養 E 的宿主細胞。

【0177】 F1. 如前述 F 之方法，其進一步包含從該宿主細胞回收該抗體。

【0178】 G. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種醫藥組成物，其包含 C 的分離抗體或其抗原結合部分及醫藥上可接受之載劑。

【0179】 G1. 如前述 G 之醫藥組成物，其進一步包含另外治療劑。

【0180】 H. 用為藥物的前述 C 的分離抗體或其抗原結合部分。

【0181】 I. 用於治療疾病的前述 C 的分離抗體或其抗原結合部分。

【0182】 J. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供 C 的分離抗體或其抗原結合部分在藥物製造上的用途。

【0183】 K. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供治療患有疾病的個體之方法，其中該方法包含對該個體投予有效量的 C 的分離抗體或其抗原結合部分。

【0184】 K1. 如前述 K 之方法，其進一步包含對該個體投予另外治療劑。

【0185】 L. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供治療患有疾病的個體的方法，包括對該個體投予 G 或 G1 的醫藥組成物。

【0186】 M. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種偵測樣品中的抗體之方法，其中該方法包含：

(a) 以捕獲試劑孵育樣品，其中該捕獲試劑包含複數個包含膜結合抗原之 EV，且該抗體與該膜結合抗原特異性結合；及

(b) 將與該捕獲試劑結合的該抗體與可偵測抗體接觸以偵測經結合的抗體，其中該可偵測抗體與該抗體特異性結合，

其中該複數個 EV 的產生是藉由 (i) 在細胞中表現該膜結合抗原，(ii) 在培養基中活體外培養該細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，且

其中將該細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子，及/或該細胞為非黏附細胞。

【0187】 M1. 如前述 M 之方法，其進一步包含 (c) 測量在 (b) 中所檢測到的該抗體的量，其中使用標準曲線對該量進行定量。

【0188】 M2. 如前述 M 或 M1 之方法，其中該樣品為血漿、血清或尿液樣品。

【0189】 M3. 如前述 M-M2 之方法，其中該捕獲試劑固定化於固體支持物上。

【0190】 M4. 如前述 M3 之方法，其中該固體支持物為微量滴定盤。

【0191】 M5. 如前述 M-M4 之方法，其中該可偵測抗體是經螢光標記的。

【0192】 M6. 如前述 M-M5 之方法，其中該膜結合抗原為膜蛋白或其片段。

【0193】 N. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種分選產生抗體的細胞之方法，其中該方法包含：

(a) 將該產生抗體的細胞與複數個 EV 一起孵育，其中該複數個 EV 包含：第一 EV 群，其包含膜結合抗原及第一可偵測標記，其中該產生抗體的細胞的子組與該膜結合抗原特異性結合；及 ii. 第二 EV 群，其缺乏該膜結合抗原但包含與該第一標記可區分的第二可偵測標記；及

(b) 基於該產生抗體的細胞是與該第一 EV 群結合還是與該第一 EV 群及該第二 EV 群之組合結合來分選該產生抗體的細胞，

其中該第一 EV 群的產生是藉由 (i) 在第一細胞中表現該膜結合抗原及該第一可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第一細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，

其中該第二 EV 群的產生是藉由 (i) 在第二細胞中表現該第二可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第二細胞以產生該複數個包含第二可偵測標記之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現第二可偵測標記之 EV，且

其中 (i) 將第一細胞及/或第二細胞與選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子接觸，及/或 (ii) 該第一及/或第二細胞為非黏附細胞。

【0194】 N1. 如前述 N 之方法，其中該第一可偵測標記和該第二可偵測標記為螢光標記。

【0195】 N2. 如前述 N1 之方法，其中該第一螢光標記和該第二螢光標記為螢光蛋白。

【0196】 N3. 如前述 N-N2 之方法，其中該分選是藉由螢光活化細胞分選進行。

【0197】 N4. 如前述 N-N3 之方法，其中該產生抗體的細胞為 B 細胞。

【0198】 N5. 如前述 N-N4 之方法，其中該產生抗體的細胞為融合瘤細胞。

【0199】 O. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種用於產生複數個展現異源蛋白質的細胞外囊泡 (EV) 之方法，其中該方法包含：

- (a) 在細胞中表現異源蛋白質；
- (b) 在培養基中培養該細胞；及
- (c) 從該培養基中分離該複數個包含異源蛋白質之 EV，

其中將細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子及/或該細胞為非黏附細胞。

【0200】 O1. 如前述 O 之方法，其中該異源蛋白質為膜蛋白。

【0201】 O2. 如前述 O1 之方法，其中該膜蛋白為單程膜蛋白。

【0202】 O3. 如前述 O1 之方法，其中該膜蛋白為多程膜蛋白。

【0203】 O4. 如前述 O1-O3 之方法，其中該膜蛋白為蛋白質複合物的成員。

【0204】 O5. 如前述 M-O4 之方法，其中該非黏附細胞為 293S 細胞或 Expi293F™ 細胞。

【0205】 O6. 如前述 M-O5 之方法，其中藉由超速離心從該培養基中分離該複數個 EV。

【0206】 P. 在某些非限制性實施例中，目前揭示的標的提供一種偵測樣品中的抗體之套組，其中該套組包含：

(a) 捕獲試劑，其包含複數個包含膜結合抗原之 EV，其中待測的該抗體與該抗原特異性結合；及

(b) 可偵測抗體，其與待測的抗體特異性結合，

其中該複數個 EV 的產生是藉由 (i) 在細胞中表現該膜結合抗原，(ii) 在培養基中活體外培養該細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，且

其中將該細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及它們的組合所組成之群組的囊泡因子，及/或該細胞為非黏附細胞。

【0207】 P1. 如前述 P 之套組，其中該複數個 EV 固定化於固體支持物上。

【0208】 P2. 如前述 P 或 P1 之套組，其中該固體支持物為微量滴定盤。

【0209】 P3. 如前述 P-P2 之套組，其中該可偵測抗體是經螢光標記的。

【0210】 P4. 如前述 P-P3 之套組，其中該膜結合抗原為膜蛋白或其片段。

實例

【0211】 藉由參考以下實例將更好地理解目前揭示的標的，這些實例是作為目前揭示的標的的例示而不是作為限制而提供的。

實例 1：以 MP-X 鑑定產生囊泡的囊泡因子

第 54 頁，共 63 頁(發明說明書)

【0212】 以靶蛋白人類 G 蛋白偶聯受體 (膜蛋白 (MP)-X) 及選自 hARRDC1、Acyl-Hrs、ARF6.Q67L、RhoA.F30L、持續性活化 ROCK、MemPro 及 MLGag 的囊泡因子共轉染 293T 細胞。EV 的產生如圖 3 所示。收集細胞溶胞產物用於測試靶蛋白和囊泡因子的表現。收集和處理培養基。藉由超速離心從培養基中收集 EV。使用抗 FLAG 抗體 (1:1000 稀釋 M2 Sigma F3165) 經西方墨點法分析純化的 EV。

【0213】 如圖 4 所示，MP-X 在由囊泡因子 hARRDC1、Acyl.Hrs、ARF6.Q67L 或 MLGag 轉染的細胞所產生的 EV 中表現，但在由囊泡因子 RhoA.F30L、持續性活化 ROCK 及 MemPro 轉染的細胞所產生的 EV 中不表現。此外，動態光散射 (DLS) 顯示由 hARRDC1、Acyl.Hrs 或 MLGag 轉染的細胞所產生的 EV 具有均勻的囊泡大小 (圖 5)。

【0214】 接下來，用鼠細胞測試這些囊泡因子在誘導 EV 方面的有效性。以 MP-X 和選自 MLGag、Acyl.Hrs 及 mARRDC1 的囊泡因子共轉染小鼠結腸癌細胞 MC38 和小鼠肌母細胞 C2C12，以產生 EV。藉由超速離心機從培養基中純化 EV 後，藉由西方墨點法 (抗 FLAG 初級抗體，1:1000 稀釋 M2 Sigma F3165) 分析 EV，以偵測 MP-X 的存在。圖 6 顯示 MP-X 含量在由囊泡因子 MLGag、Acyl.Hrs 或 mARRDC1 轉染的細胞所產生的 EV 中較高。在由未轉染囊泡因子的細胞產生的 EV 中未偵測到 MP-X。

實例 2：改良方法實現高產量的快速 EV 產生

【0215】 EV 產生的一項挑戰是有效地從培養基中純化 EV (圖 7A)。PEG 沉澱法回收率很差，沒有明顯的沉澱物產生，且需要隔夜的步驟。基於鹽的沉澱只需要一個小時，但產生不溶性顆粒。本研究發現，超速離心純化在所有三種方法中的純化效率最高，且僅需要 3 小時。

【0216】 EV 產生的另一挑戰是選擇具有足夠產量的細胞株。在比較多種細胞株的產量後，本研究發現 Expi293F™ 和 293S 細胞在所有四種細胞株中產生最高產量 (圖 7B)。JetPEI 用作轉染方法。

【0217】 本研究亦比較了 Expi293F™ 細胞株和 293S 細胞株之間的 EV 產量和靶蛋白 (即，感興趣的蛋白質) 表現。圖 8A 至 圖 8B 顯示，當使用 MLGag 作為囊泡因子時，Expi293 細胞株比 293S 細胞株具有更高的平均產量。圖 8C 顯示，Expi293F™ 細胞株中的細胞活力優於 293S 細胞株中的細胞活力。

【0218】 Expi293F™ 細胞株和 293S 細胞株的倍增時間非常相似，大約為 24 小時。兩種細胞株的轉染後細胞生長均降低。293S 細胞株在產生階段期間可有一個倍增，而 Expi293F™ 細胞株在產生階段期間有數個倍增。

【0219】 另外地，使用 ELISA 測量 EV 中每種靶蛋白的存在。圖 9A 至 圖 9C 顯示，來自 Expi293F™ 細胞株的 EV 比來自 293S 細胞株的 EV 具有更高的靶蛋白濃度。

【0220】 本研究亦測試了大鼠 RBA 細胞是否可用於 EV 產生。RBA 細胞株是來源於 SD 大鼠的乳腺腺癌細胞株。發現 RBA 細胞可產生 EV，但與 293S 細胞株相比，產量非常低 (圖 13)。

實例 3：EV 實現基於 ELISA 的抗複合物膜蛋白的 FACS+ 抗體偵測

【0221】 本研究發現，囊泡因子 MLGag、Acyl.Hrs、ARRDC1 及 ARF6 有助於使用 Expi293F™ 細胞株產生明確定義的顆粒 (直徑為 184 ± 40 nm) (圖 10A)。另外地，EV 能實現使用抗被 EV 摻入的那些蛋白質的 FACS+ 抗體，對單程膜蛋白和多程膜蛋白進行基於 ELISA 的偵測 (圖 10B 至圖 10C)。

實例 4：鑑定用於篩選來自 Expi293F™ EV 免疫的大鼠、兔、駱馬和小鼠的抗體的細胞株

【0222】 本研究篩選了兔、駱馬/駱駝、大鼠及小鼠細胞株的轉染效率及其與 EV 免疫的大鼠或小鼠抗血清的結合能力。SD 大鼠、兔、駱馬和小鼠在第 0 週、第 2 週及第 4 週以 Expi293F™ 產生的 EV 進行免疫。從動物免疫前 (預抽血樣品) 和免疫後 (抗血清樣品) 收集血清樣品 (圖 11A, 圖 12A)。藉由 FACS 測量收集的預抽血樣品和抗血清樣品與不同細胞株的結合, 包括 Expi293F™ 細胞株、RK13 細胞株、Dubca 細胞株、RBA 細胞株和 3T3 細胞株。收集的大鼠抗血清與 293 細胞株高度結合, 但不與源自 SD 大鼠的乳腺腺癌細胞株之 RBA 細胞株高度結合。收集的小鼠抗血清與 RBA 細胞株高度結合, 但不與源自 Balb/c 小鼠的胚胎纖維母細胞株之 3T3 細胞株高度結合 (圖 11B)。RBA 細胞是高度可轉染的 (圖 11C), 且 3T3 細胞亦可合理地轉染 (圖 11D)。收集的兔抗血清不結合 RK13 細胞, 且收集的駱馬抗血清不結合 Dubca 細胞, 但結合 3T3 細胞 (圖 12B)。RK13 細胞和 Dubca 細胞亦為可轉染的 (圖 12C)。因此, RBA 細胞株和 3T3 細胞株可用於篩選 Expi293F™ EV 免疫的 SD 大鼠和小鼠之抗體, RK13 細胞株和 Dubca 細胞株可用於篩選 Expi293F™ EV 免疫的兔和駱馬之抗體。

實例 5：開發抗具有 EV 抗原的挑戰性膜蛋白的功能性單株抗體

【0223】 以囊泡因子 MLGag 和膜蛋白-1 (MP-1, 一種多程膜蛋白) 構建體共轉染 Expi293F™ 細胞株 4 天, 並從培養基中收集 EV。西方墨點法證實 MP-1 存在於 EV 及全細胞溶胞產物中 (圖 14)。

【0224】 亦以囊泡因子 MLGag 或 ARF6 及膜蛋白 2 (MP-2, 一種不具有包含超過 110 個胺基酸的細胞內結構域的多程膜蛋白) 構建體共轉染 Expi293F™ 細胞株 4 天。西方墨點法證實 MP-2 存在於 EV 及全細胞溶胞產物中 (圖 15)。

【0225】 亦以囊泡因子 MLGag 或 ARF6 及膜蛋白 3 (MP-3，一種具有包含超過 700 個胺基酸的細胞內結構域的多程膜蛋白) 構建體共轉染 Expi293F™ 細胞株 4 天。西方墨點法證實 MP-3 存在於 ARF6 中，該 ARF6 具有由 ARF6 轉染的細胞所產生的 EV，但不存在 MLGag (圖 16)。不受特定理論的限制，該結果的原因可能是 Gag 殼體在空間上阻斷 MP 與大細胞內結構域的結合 (圖 17)。

實例 6：基於 EV 的 ELISA 篩選抗天然形式抗原的初級抗體

【0226】 本研究比較了使用基於 EV 的 ELISA 和基於細胞的 FACS 來篩選抗天然形式之膜蛋白的初級抗體的方法。蛋白質 ELISA、基於 EV 的 ELISA 和 FACS 的工作機制顯示於圖 18。

【0227】 兩種膜蛋白 MP-4 和 MP-5 用作本研究的結合抗原。MP-4 為單程膜蛋白，而 MP-5 為多程膜蛋白。

【0228】 抗 MP-4 融合瘤是使用蛋白質免疫由以 MP-4 免疫的小鼠所產生的。使用基於 EV 的 ELISA 之 MLGag 產生包含膜結合 MP-4 的 EV。圖 19A 至圖 19D 顯示，基於 EV 的 ELISA 力價與針對 MP-4 的 FACS 力價具有很好的相關性，且基於 EV 的 ELISA 的結果與 FACS 的結果一致。相較之下，基於蛋白質的 ELISA 與基於 EV 的 ELISA 或 FACS 之間的相關性非常差。

【0229】 抗 MP-5 血清和融合瘤是使用 DNA 免疫法從以 MP-5 免疫的小鼠所產生的。類似地，基於 EV 的 ELISA 與 FACS 具有良好的相關性 (圖 20A 至圖 20B、圖 21)。

【0230】 因此，本研究顯示，EV 能夠基於 ELISA 偵測抗複合物膜蛋白的抗體，且基於 EV 的 ELISA 可用於篩選抗天然形式抗原的初級抗體。

實例 7：使用抗原表現 EV 來發現抗挑戰性抗原 MP-6 的單株抗體。

【0231】 MP-6 是用於多種癌症的高價值抗體-藥物結合物 (antibody-drug-conjugate, ADC) 目標，且為開發抗 MP-6 抗體的具有挑戰性的目標。包含膜結合 MP-6 的 EV 藉由以 MLGag、Acyl.Hrs、ARF6 或 ARRDC1 和 MP-6 構建體的囊泡因子共轉染 293S 細胞所產生的。藉由超速離心分離 EV。EV 的產量顯示於表 2。MP-6 的相對含量以西方墨點法測量。

表 2. 以每種囊泡因子轉染細胞中 EV 之產量

	產量 (mg)	Rel. MP-6 含量
MLGag	5.9	1.27
Acyl.Hrs	4.7	1
ARF6	4.46	0.58
ARRDC1	3.33	1.92

【0232】 對初始批次 MP-6 EV 的分析顯示在分離的 EV 中表現 MP-6 (圖 22A)。另外地，西方墨點法分析證實每個囊泡因子亦被併入囊泡中 (圖 22B)。將使用重組蛋白標準品的定量西方墨點法用於測量併入囊泡中的 MP-6 的絕對量 (圖 22C)。

【0233】 SD 大鼠用產生的 EV 以及 DNA 或蛋白質追加接種免疫。用於免疫的 EV 在 PBS 或 Ribic (佐劑) 中製備。免疫方案顯示於圖 23。在 DNA 或蛋白質追加接種之前或之後從大鼠收集抗血清。從收集的抗血清中純化抗體，最終濃度為 250、50、10 或 2 μ g/ml。藉由 FACS 或西方墨點法測量純化的抗體中抗 MP-6 抗體的含量。使用 Lipofectamine 3000 (Lipofectamine : DNA=3 : 1)，以或不以 MP-6 表現構建體轉染 RBA 細胞 2 天。這些 RBA 細胞用於 FACS 分析。

【0234】 西方墨點法顯示，在 DNA 或蛋白質追加接種後，從大鼠收集的抗血清中抗 MP-6 抗體和抗 Gag 抗體的含量 (圖 24A)。發現在 DNA 或蛋白質追加接種後，從大鼠收集的抗血清與 RBA 細胞沒有顯著結合 (圖 24B)。本研究亦使用基於 RBA 的 FACS 測量收集的抗血清中的抗體含量。FACS 結果與西方墨點法資料具有很好的相關性 (圖24C 和圖 24D) 因此，其表明免疫的初級抗體不顯示與 RBA 細胞的背景結合，且天然 SD 大鼠的 IgG 不與以 MP-6 轉染的 RBA 結合。只有從以表現 MP-6 的 EV 免疫的大鼠所收集的抗體顯示出與以 MP-6 轉染的 RBA 結合。因此，基於 RBA 的 FACS 可用於篩選經 EV 免疫大鼠所產生的 MP-6 抗體。

【0235】 本研究發現，是 DNA 追加接種而不是蛋白質追加接種增加了以表現 EV 的 MP-6 免疫的大鼠的抗 MP-6 抗體力價 (圖24A 至圖 24D、圖 26)。另外地，在免疫過程中併入佐劑 (Ribi) 亦增加抗 MP-6 抗體的力價 (圖24A 至圖 24D、圖 25A 至圖 25B)。

【0236】 該研究顯示，Ribi 作為佐劑增加了抗體力價，且 Acyl.Hrs EVs 產生的抗體反應弱於 MLGag EV (圖 25A)。圖 25B 顯示血清適於以 FACS 檢測抗體力價，而不需要純化 IgG。

實例 8：使用抗原表現 EV 來發現抗 MP-7 的單株抗體。

【0237】 本研究使用實例 7 中開發的免疫方法來發現並產生抗膜蛋白 MP-7 (一種多程膜蛋白) 的單株抗體。由以包含 MP-7 的 EV 免疫的剔除小鼠產生小鼠抗 MP-7 初級抗體，並藉由 FACS 篩選。抗 MP-7 融合瘤選自小鼠，其中抗血清在 FACS 中顯示出與 MP-7 表現細胞的顯著結合 (圖27A 至圖 27C)。藉由 FACS 進一步篩選融合瘤以選擇抗 MP-7 抗體殖株，該殖株在 COS7 穩定細胞和內源性細胞中顯示出與 MP-7 的強結合 (圖 28 至圖 30)。

實例 9：使用包含抗原的 EV 用於發現抗 MP-1 的單株抗體。

【0238】 本研究使用實施例 7 中開發的免疫方法來產生抗膜蛋白 MP-1 的單株抗體。以包含膜結合 MP-1 或 MP-1 DNA 的 EV 免疫大鼠，以蛋白質或 DNA 追加接種。產生另外的 EV，其中 MP-1 與來自破傷風類毒素 (MP-8 TCE4) 的通用 T 細胞表位的 4 次重複融合 (Demotz 等人，J Immunol 1989; 142)。藉由表現 MLGag 作為囊泡因子來產生 EV。

【0239】 從大鼠收集的抗血清藉由 FACS 篩選 (圖31A 至圖 31B)。顯示 DNA 追加接種總體上比蛋白質追加接種在增加抗體力價上較為有效，且 T 細胞表位的添加並無效果。蛋白質追加接種增加了 DNA 免疫的大鼠的 FACS 力價，表明蛋白質追加接種與細胞表面 MP-1 之間的表位有一些重疊。藉由 FACS 篩選大鼠抗 MP-1 融合瘤 (圖 32)。以具有 Lipofectamine 3000 的 MP-1 DNA 轉染 RBA 細胞 1 天，然後以大鼠抗 MP-1 融合瘤上清液染色，然後以 AF647 抗大鼠 IgG 染色。

實例 10：使用包含膜結合抗原的 EV 來發現抗 MP-8 的單株抗體。

【0240】 本研究使用實施例 7 中開發的免疫方法來發現並產生抗膜蛋白 MP-8 (一種單程膜蛋白) 的單株抗體。僅以蛋白質、編碼 MP-8 的 DNA 或包含膜結合 MP-8 的 EV (藉由使用 MLGag 作為囊泡因子產生的) 免疫大鼠。ELISA 和 FACS 結果顯示於圖 33。結果顯示，雖然 EV 免疫導致比蛋白質免疫更少的 ELISA+ 殖株，但 EV 免疫可產生比蛋白質免疫更高百分比的 FACS+ 抗體。

實例 11：使用包含膜結合抗原的螢光 EV 從經免疫的動物中分選 B 細胞。

【0241】 本研究使用實施例 7 中開發的免疫方法來發現並產生抗膜蛋白 MP-9 (一種多程膜蛋白) 的單株抗體。將大鼠和兔以包含 MP-9 和 MP-9 DNA 之 EV 免疫。藉由表現 MLGag 作為囊泡因子來產生 EV。

【0242】 PBMC 取自大鼠和兔，並以含 EV 的 GFP 標記之 MP-9 和不含 MP-9 的 RFP 標記之 EV 染色。IgG+ B 細胞的染色顯示於圖 34。結果顯示被

EV 染色的兩群 B 細胞。GFP/RFP+ 群代表偵測 EV 中非 MP-9 蛋白的 B 細胞。僅 GFP 標記的群 (以框表示) 代表特異性偵測 MP-9 的 B 細胞。使用兩種其他 MP (MP-10 及 MP-11)，其顯示免 IgG+ B 細胞可用 RFP 標記的 MP EV 和 GFP 標記的空 EV 染色 (圖 35)。在每種情況下，都有可特異性偵測 MP 的僅 RFP 標記之 B 細胞明確群體。

實例 12：使用 EV 產生抗蛋白質複合物膜蛋白的單株抗體。

【0243】 本研究使用實例 7 中開發的免疫方法來發現並產生抗蛋白質複合物中膜蛋白的單株抗體。蛋白質複合物包含 6 種不同的膜蛋白 (MP-12、MP-13、MP-14 的 2 種拷貝、MP-15、MP-16 及 MP-17 的 2 種拷貝)。MP-12 和 MP-13 二聚化以形成受體 (在本文中稱為受體「A」，在圖 36A 至圖 36B 中)，而 MP-14、MP-15、MP-16 和 MP-17 形成複合物 (在本文中稱為輔受體「B」，在圖 36A 至圖 36B 中)，作為由 MP-12 與 MP-13 所形成之受體的輔受體。產生兩種多順反子表現的載體，編碼 MP-12 及 MP-13 二者或 MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17 的所有四種。為了確認在細胞表面處形成複合物，以 (i) 編碼 MP-12 及 MP-13 之 cDNA，(ii) 編碼 MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17 之 cDNA，或 (i) 和 (ii) 瞬時轉染 Expi293 細胞。當所有蛋白質共表現時，藉由流式細胞術偵測 MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17 的表現與 MP-12 及 MP-13 的表現，證實了完整複合物的組裝 (圖 36A)。產生含完整蛋白質複合物的 EV，並藉由 ELISA 確認併入 (圖 36B)。藉由 MLGag 的表現產生 EV。

【0244】 以包含 6 種膜蛋白 (MP-12、MP-13、MP-14、MP-15、MP-16 及 MP-17) 的複合物的 EV 免疫大鼠。隨後對源自大鼠的單株抗體的表徵顯示成功發現與複合物中蛋白質 (例如，MP-12/MP-13、MP-14、MP-14/MP-16 或 MP-14/MP-15) 結合的 FACS+ 抗體 (表 3)。這些資料顯示，EV 可用於產生抗膜蛋白的抗體，該膜蛋白存在於蛋白質複合物中。

表 3.複合物特異性結合抗體的鑑定

特異性	MP-14/MP-16 或 MP-14/MP-15 蛋白上的 ELISA ⁺	內源性表現複合物的細胞上的 FACS ⁺
MP-12/ MP-13	n.d.	>50
MP-14	30	18
MP-14/ MP-16	20	1
MP-14/ MP-15	15	3

* * * * *

【0245】 儘管已詳細描述目前揭示之標的及其優點，但應理解，在不脫離本揭示的精神和範圍的情況下，可在本文中進行各種改變、替換和變更。此外，本案的範圍不意圖限於說明書中所述的製程、機器、製造和物質組成、手段、方法和步驟的特定實施例。本技術領域中具有通常知識者將容易地從目前揭示之標的的發明中輕易理解，可根據目前揭示的標的，利用目前存在或今後將開發的執行與在本文描述的對應實施例基本上相同的功能或實現基本上相同的結果的製程、機器、製造、物質組成、手段、方法或步驟。因此，所附的申請專利範圍旨在將該等製程、機器、製造、物質組成、手段、方法或步驟包括在該申請專利範圍的範圍內。

【0246】 本案通篇引用了各種專利、專利申請案、出版物、產品說明、方案和序列登錄號，出於所有目的，其發明藉由引用整體而併入本文。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種偵測樣品中的抗體之方法，其包含：

(a) 以捕獲試劑孵育樣品，其中該捕獲試劑包含複數個包含膜結合抗原之細胞外囊泡 (EV)，且該抗體與該膜結合抗原特異性結合；及

(b) 將與該捕獲試劑結合的該抗體與可偵測抗體接觸以偵測經結合的抗體，其中該可偵測抗體與該抗體特異性結合，

其中該複數個 EV 的產生是藉由 (i) 在細胞中表現該膜結合抗原，其中該膜結合抗原為單程 (single-pass) 或多程 (multi-pass) 膜蛋白或其片段，(ii) 在培養基中活體外培養該細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，且

其中將該細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及其組合所組成之群組的囊泡因子，及該細胞為非黏附細胞。

【請求項2】

如請求項 1 之方法，其進一步含包含 (c) 測量在 (b) 中所偵測到的該抗體的量，其中使用標準曲線對該量進行定量。

【請求項3】

如請求項 1 之方法，其中該樣品為血漿、血清或尿液樣品。

【請求項4】

如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中該捕獲試劑固定化於固體支持物上。

【請求項5】

如請求項 4 之方法，其中該固體支持物為微量滴定盤。

【請求項6】

如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中該可偵測抗體是經螢光標記的。

【請求項7】

一種分選產生抗體的細胞之方法，其包含：

- (a) 將該等產生抗體的細胞與複數個細胞外囊泡 (EV) 一起孵育，其中該複數個 EV 包含：
- i. 第一 EV 群，其包含膜結合抗原及第一可偵測標記，其中該等產生抗體的細胞的子組與該膜結合抗原特異性結合；及
 - ii. 第二 EV 群，其缺乏該膜結合抗原但包含與該第一標記可區分的第二可偵測標記；及
- (b) 基於該等產生抗體的細胞是與該第一 EV 群結合還是與該第一 EV 群及該第二 EV 群之組合結合來分選該等產生抗體的細胞，

其中該第一 EV 群的產生是藉由 (i) 在第一細胞中表現該膜結合抗原及該第一可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第一細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，

其中該第二 EV 群的產生是藉由 (i) 在第二細胞中表現該第二可偵測標記，(ii) 在培養基中活體外培養該第二細胞以產生該複數個包含第二可偵測標記之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現第二可偵測標記之 EV，且

其中 (i) 將該第一細胞及/或該第二細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及其組合所組成之群組的囊泡因子，及 (ii) 該第一細胞及該第二細胞為非黏附細胞，

其中該膜結合抗原為單程 (single-pass) 或多程 (multi-pass) 膜蛋白或

其片段，且

其中該等產生抗體的細胞為 B 細胞。

【請求項8】

如請求項 7 之方法，其中該第一可偵測標記及該第二可偵測標記為螢光標記。

【請求項9】

如請求項 8 之方法，其中第一螢光標記及第二螢光標記為螢光蛋白。

【請求項10】

如請求項 7 至 9 中任一項之方法，其中該分選是藉由螢光活化細胞分選進行。

【請求項11】

如請求項 7 至 9 中任一項之方法，其中該等產生抗體的細胞為融合瘤細胞。

【請求項12】

一種偵測樣品中的抗體之套組，其包含：

(a) 捕獲試劑，其包含複數個包含膜結合抗原之細胞外囊泡 (EV)，其中待測的該抗體與該抗原特異性結合；及

(b) 可偵測抗體，其與待測的該抗體特異性結合，

其中該複數個 EV 的產生是藉由 (i) 在細胞中表現該膜結合抗原，其中該膜結合抗原為單程 (single-pass) 或多程 (multi-pass) 膜蛋白或其片段，(ii) 在培養基中活體外培養該細胞以產生該複數個展現膜結合抗原之 EV，及 (iii) 從該培養基中分離該複數個展現膜結合抗原之 EV，且

其中將該細胞暴露於選自由 Acyl.Hrs、ARRDC1、ARF6 及其組

合所組成之群組的囊泡因子，及該細胞為非黏附細胞。

【請求項13】

如請求項 12 之套組，其中該複數個 EV 固定化於固體支持物上。

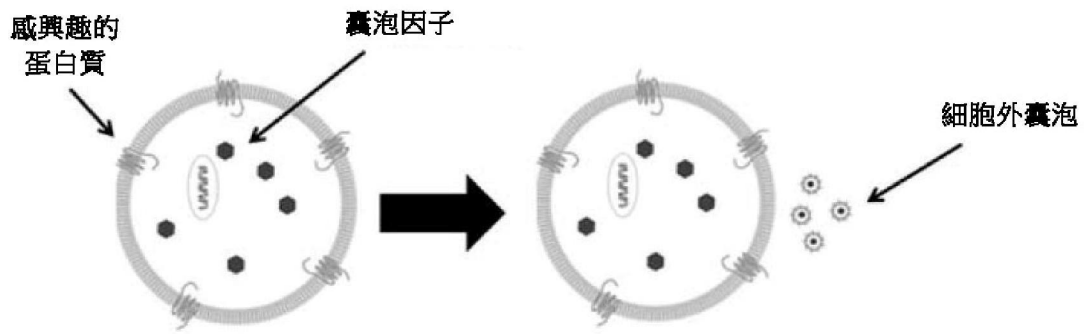
【請求項14】

如請求項 12 之套組，其中該固體支持物為微量滴定盤。

【請求項15】

如請求項 12 至 14 中任一項之套組，其中該可偵測抗體是經螢光標記的。

【發明圖式】



【圖1】

一般 EV 成形物



包含於 ESCRT 的
Hrs 補充至胞內體



Acyl.Hrs

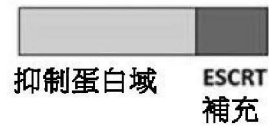


【圖2A】

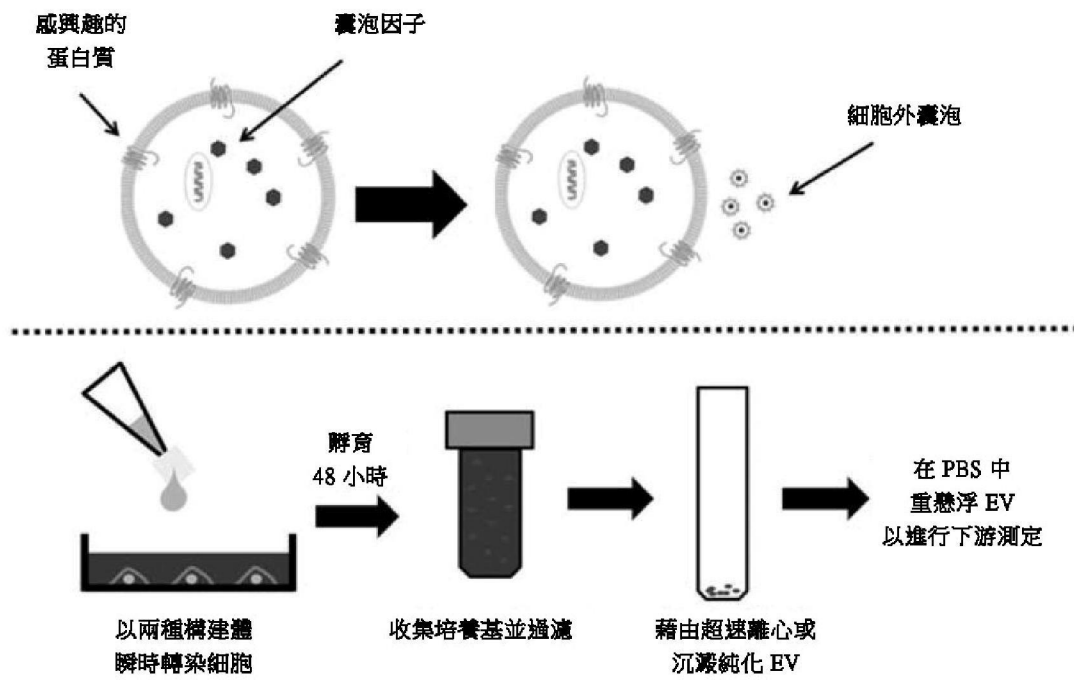
MLGag



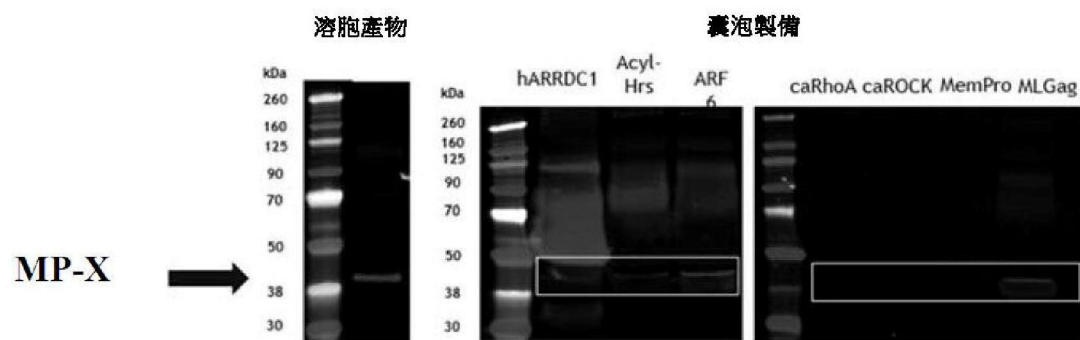
ARRDC1



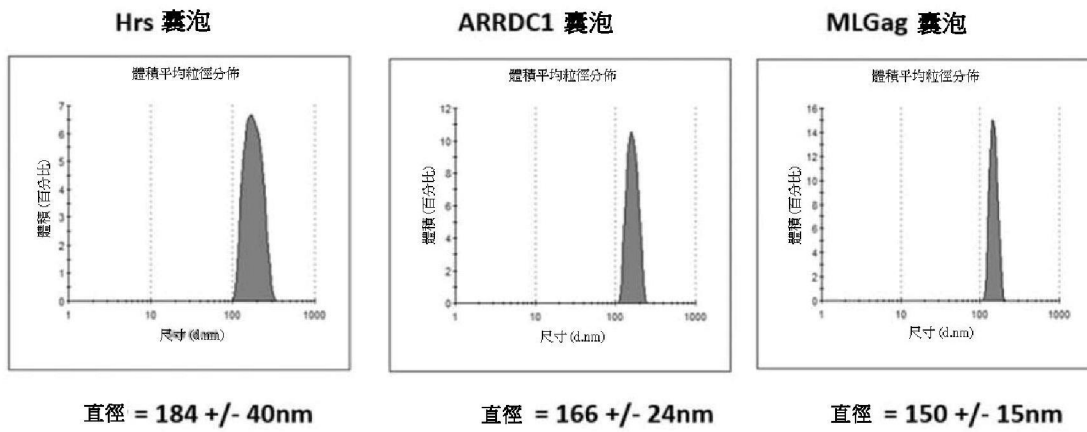
【圖2B】



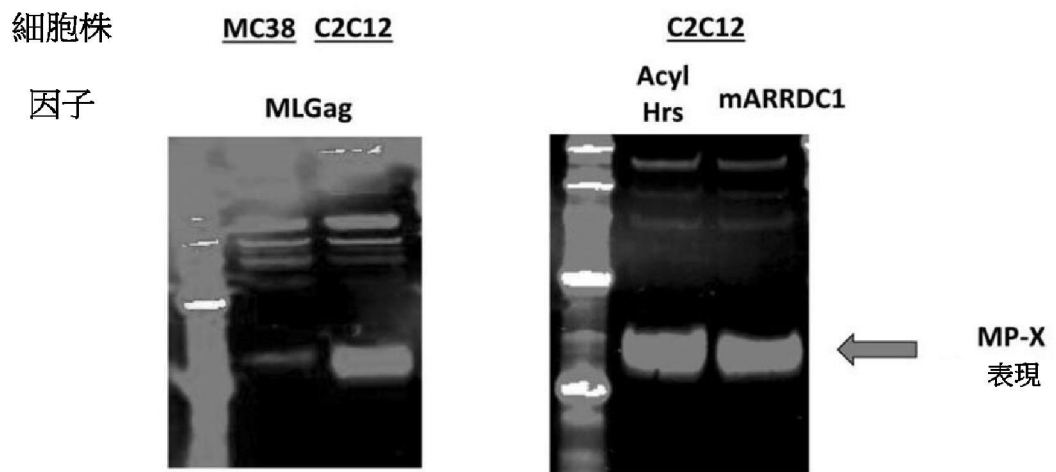
【圖3】



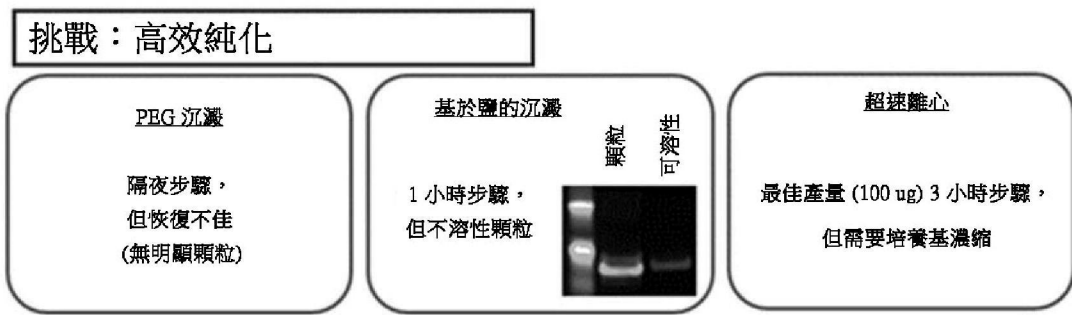
【圖4】



【圖5】



【圖6】

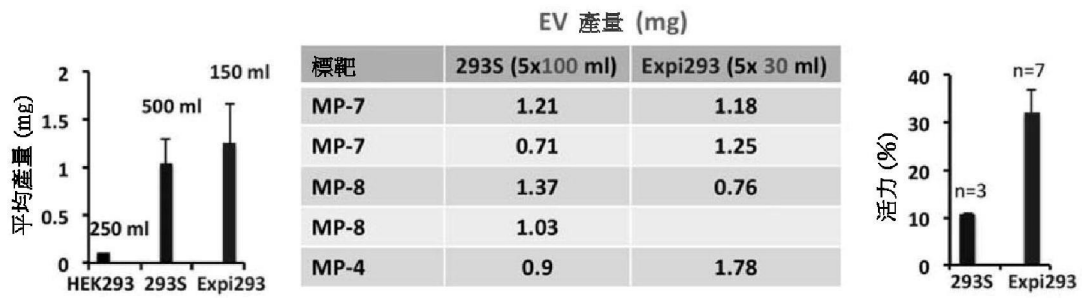


【圖7A】

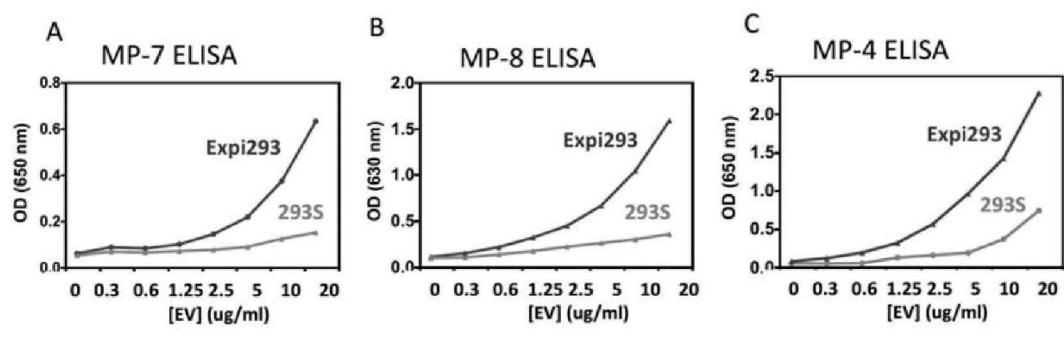
挑戰：獲得足夠產量

細胞株	HEK293	HEK293	293S	Expi293
形式	10x 15cm 盤 (250mL)	Integra 燒瓶 (150mL)	燒瓶 (500mL)	燒瓶 (150mL)
產量	~100 ug	~10 ug	1.2 mg	1.2 mg

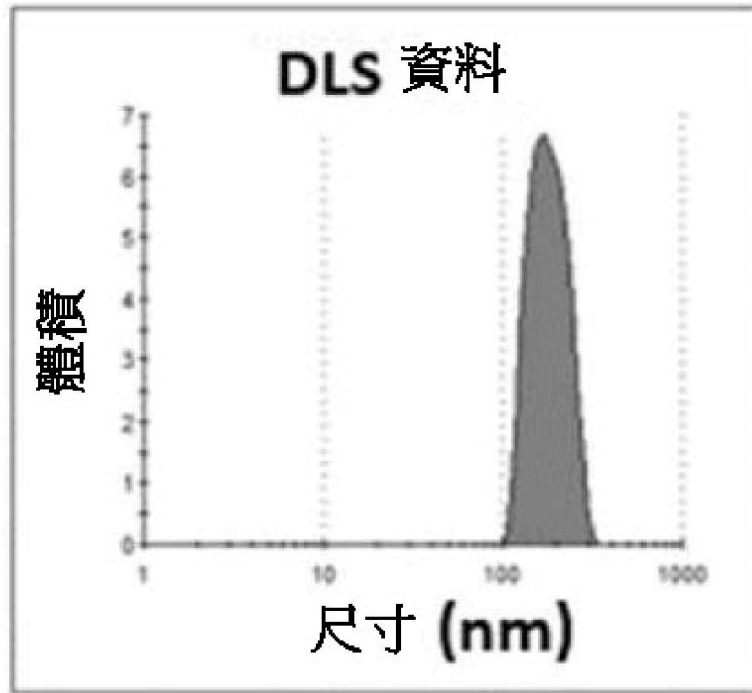
【圖7B】



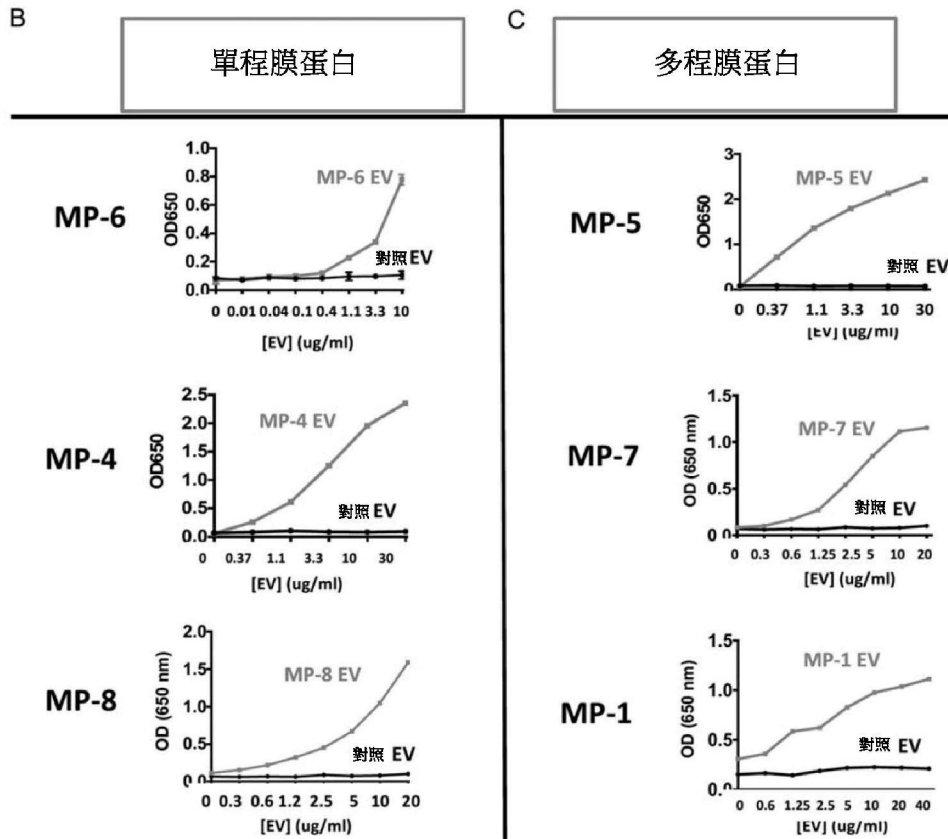
【圖8A-8C】



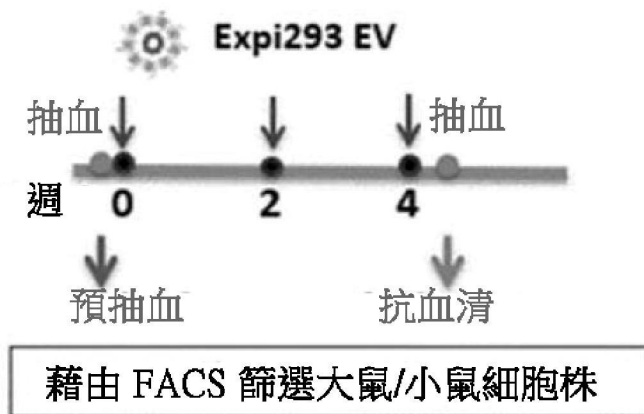
【圖9A-9C】



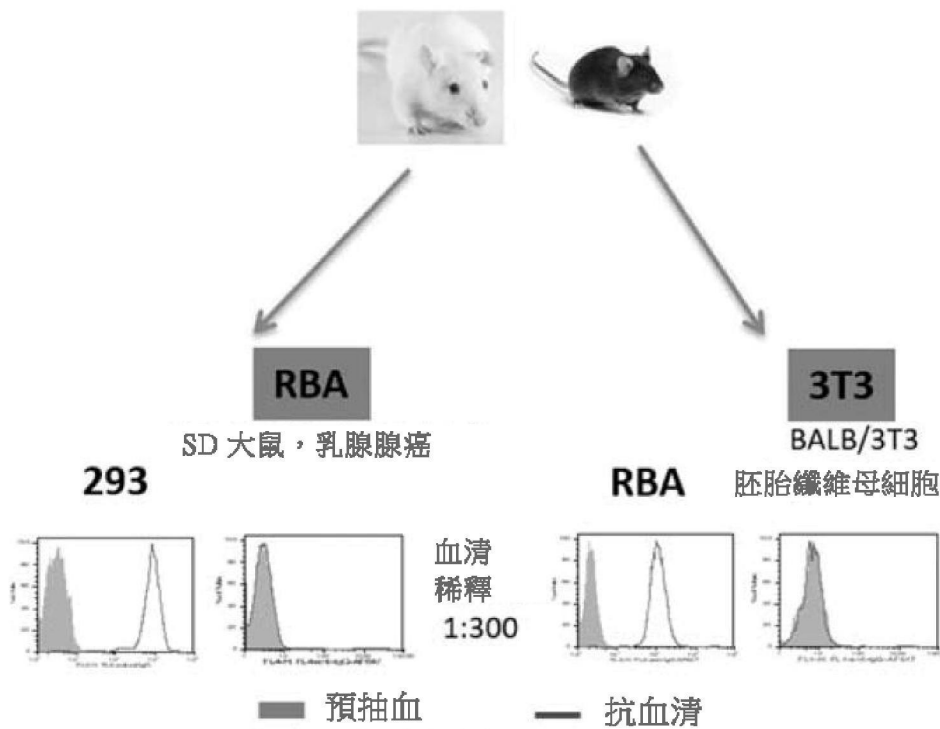
【圖10A】



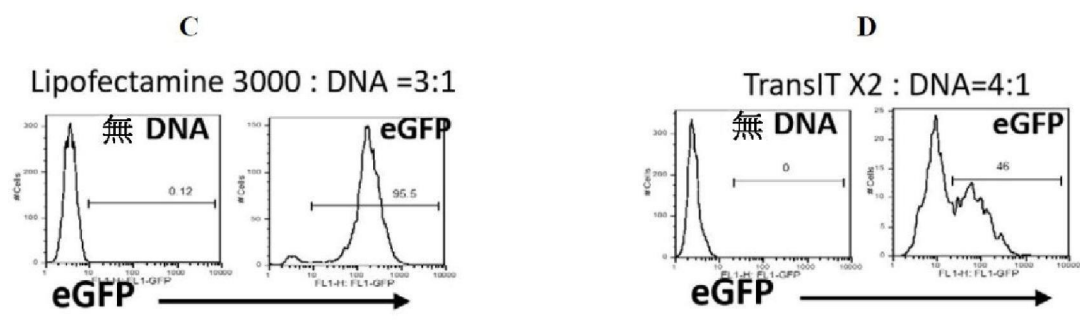
【圖10B-10C】



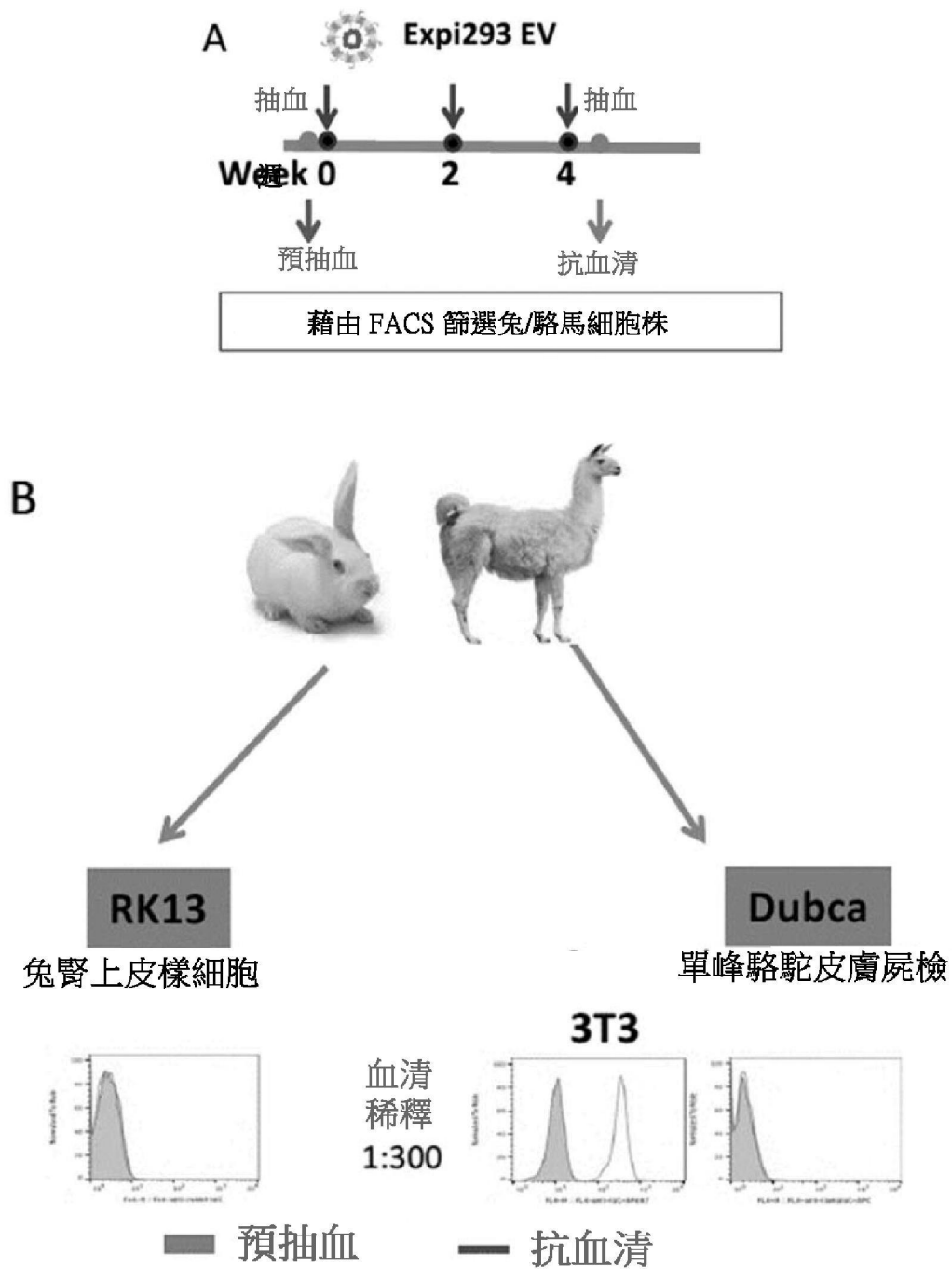
【圖11A】



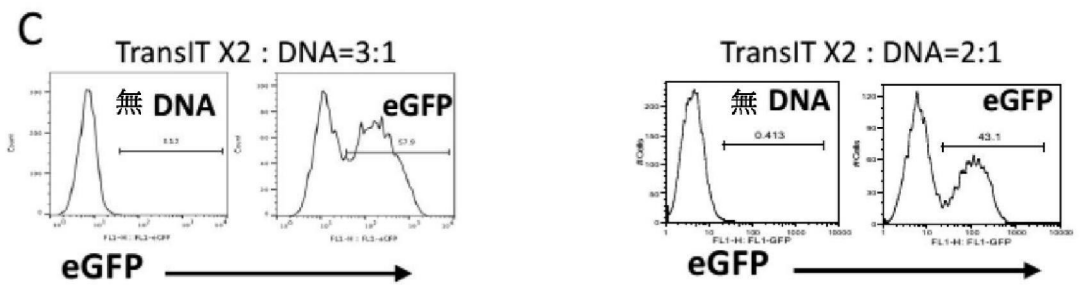
【圖11B】



【圖11C-11D】



【圖12A-12B】



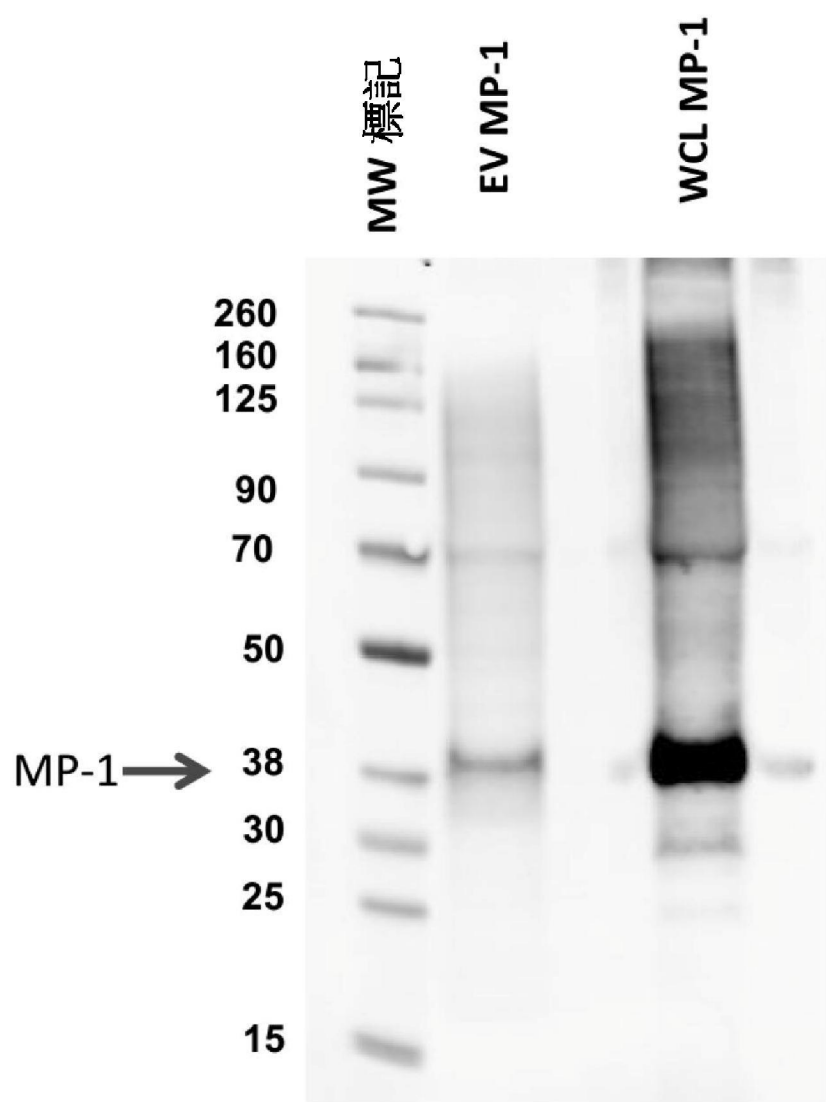
【圖12C】

EV 產量比較 (ug)

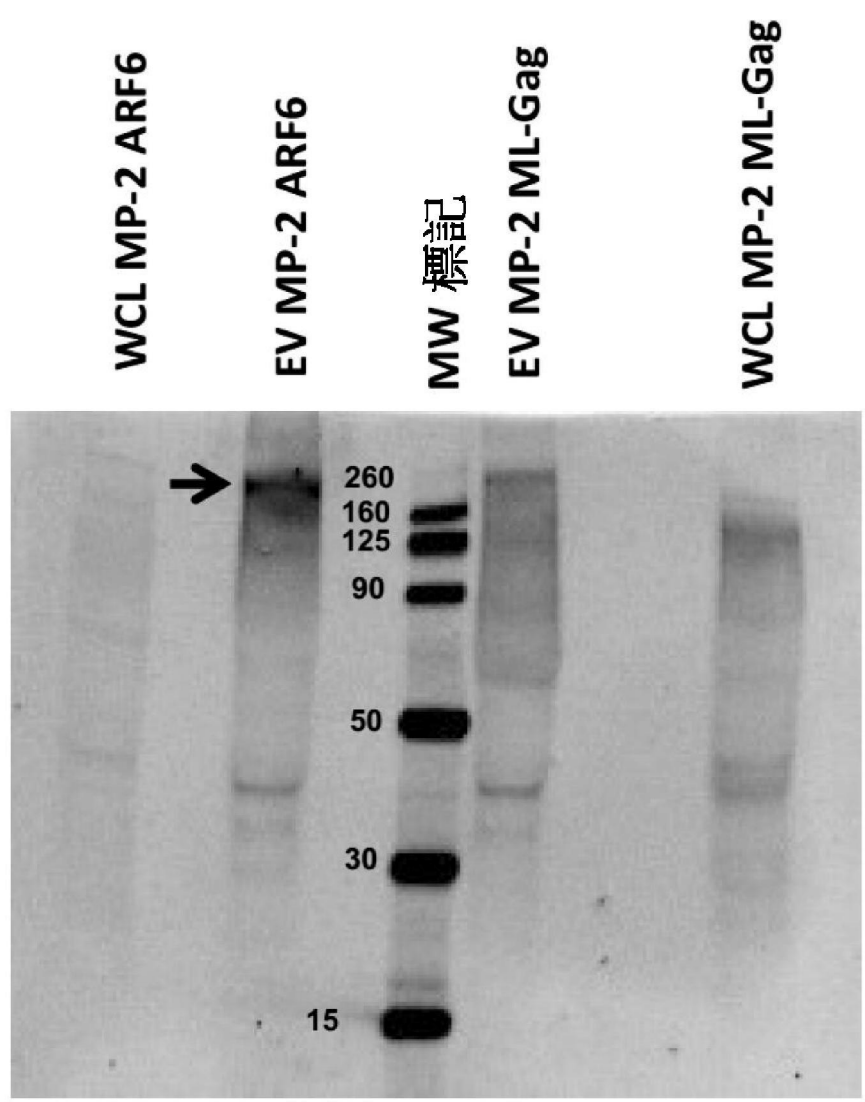
	293S 500 ml 7 天	RBA 14X15-cm 盤 700 ml, 4 天	RBA Integra 燒瓶 700 ml, 2 天
ML Gag EV	1237	122	
mHrs EV	767	109	46
MP6-mHrs EV	940	130	
RBA EV			11

較差的活力

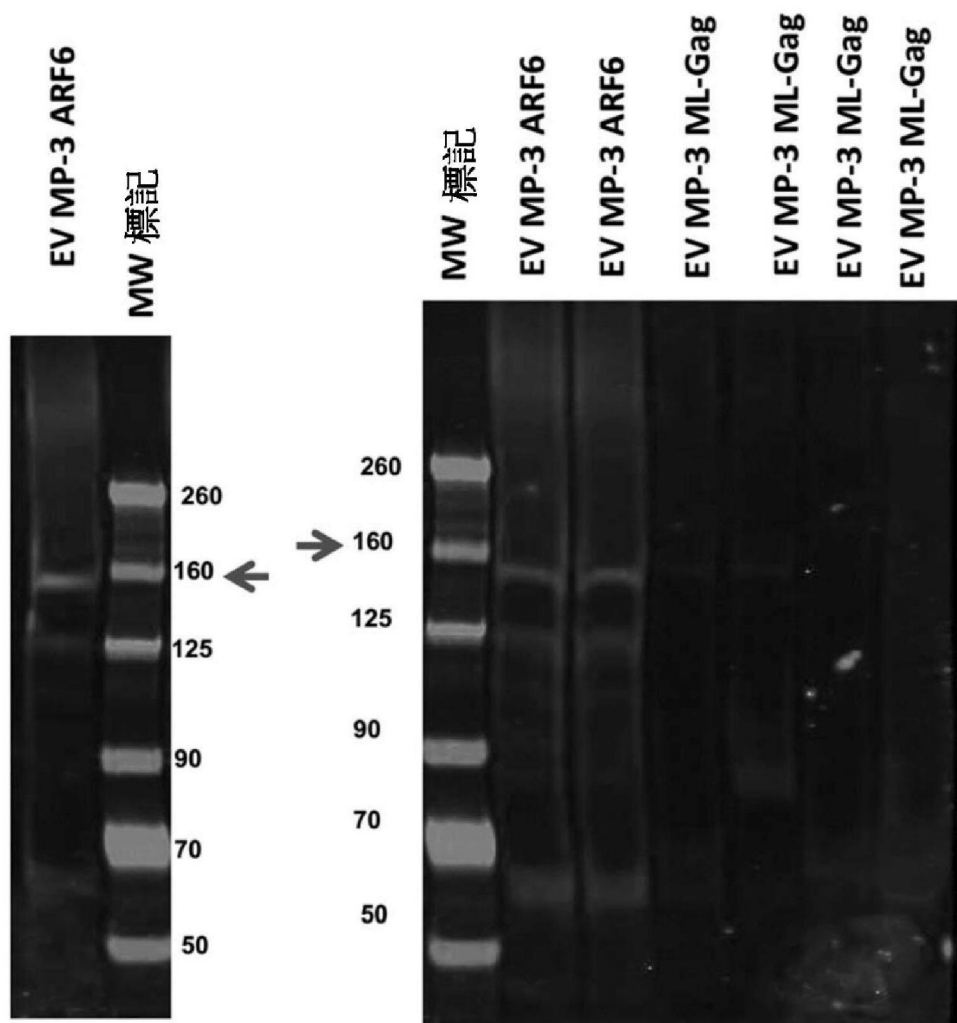
【圖13】



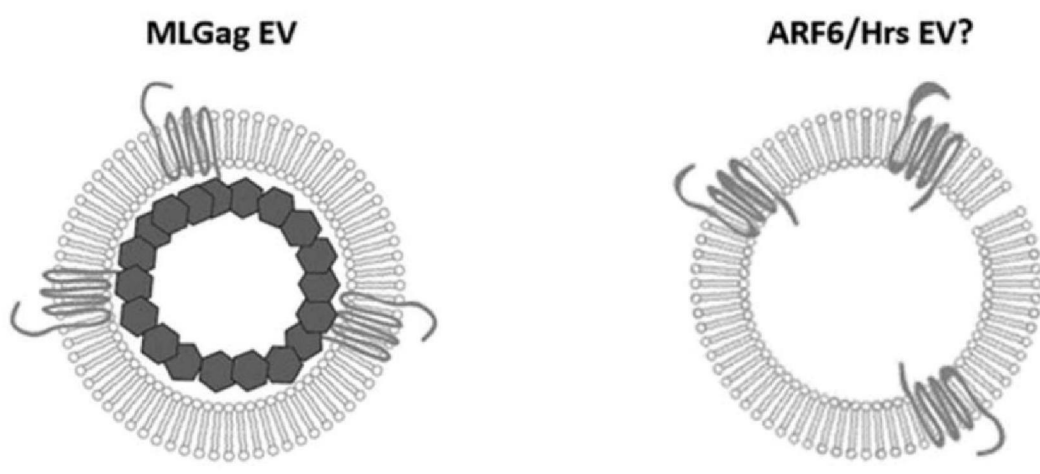
【圖14】



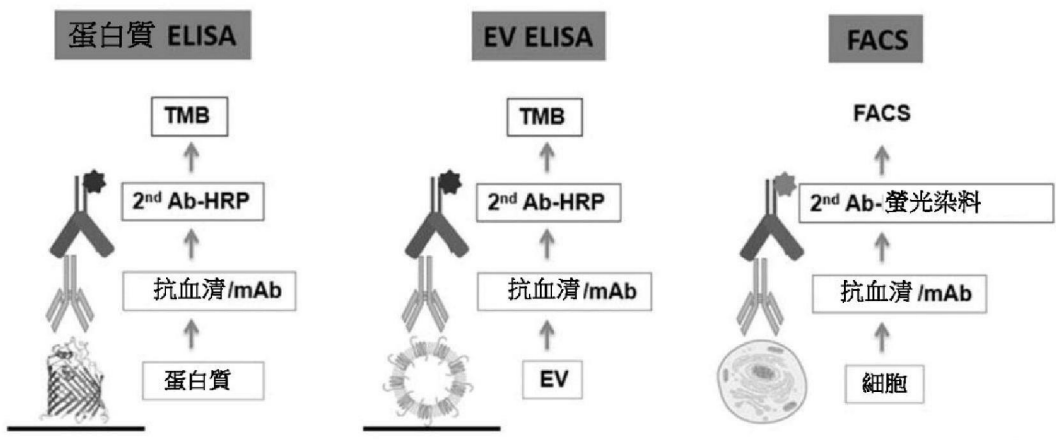
【圖15】



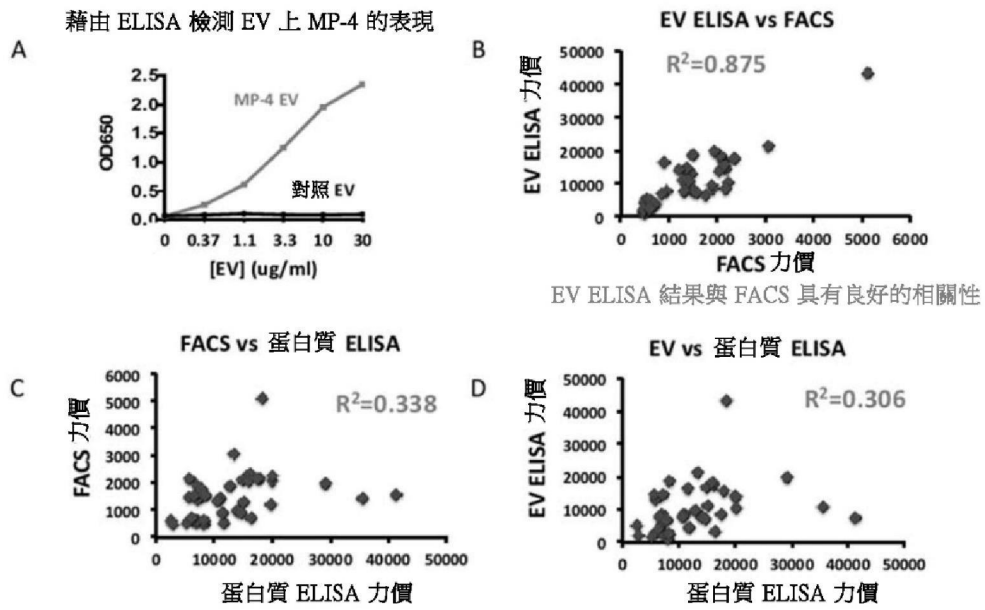
【圖16】



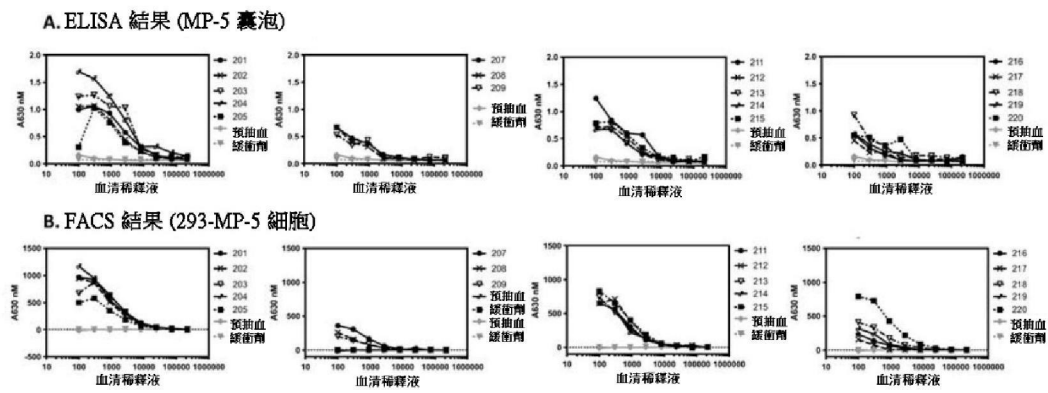
【圖17】



【圖18】

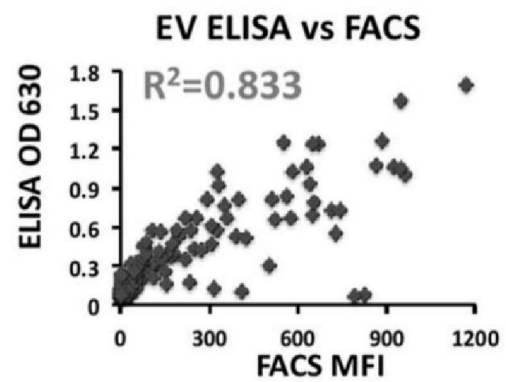
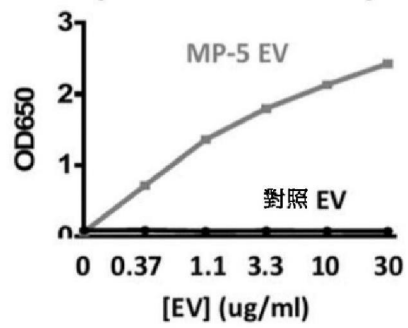


【圖19A-19D】

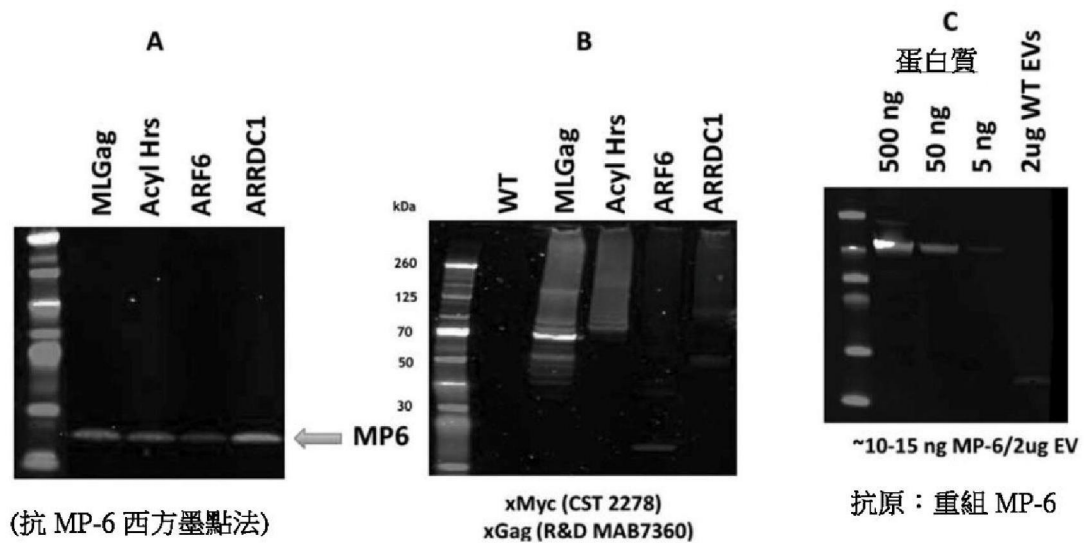


【圖20A-20B】

藉由 ELISA 檢測 EV 上 MP-5 的表現



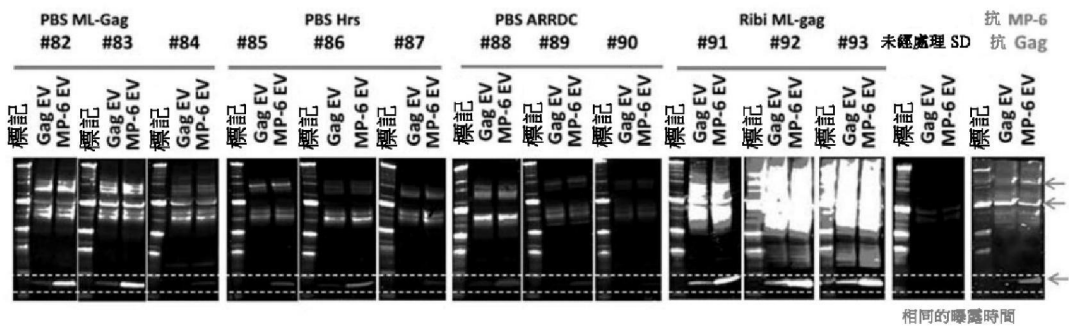
【圖21】



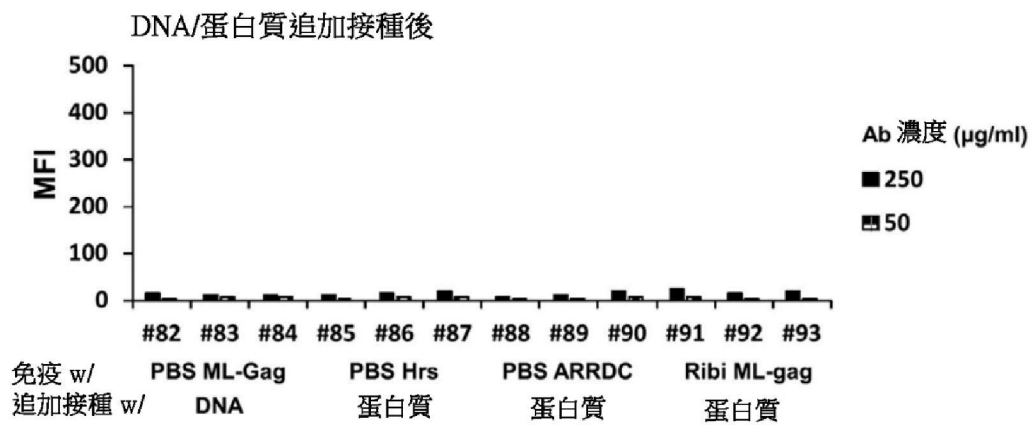
【圖22A-22C】

免疫	追加接種	大鼠#
PBS 中的 MP-6-MLGag EV	DNA	76-78
PBS 中的 MP-6-MLGag EV	蛋白質	79-81
Ribi 中的 MP-6-MLGag EV	蛋白質	82-84
Ribi 中的 MP-6-MLGag EV	DNA	91-93
PBS 中的 MP-6-mHRS EV		88-90
Ribi 中的 MP-6-mHRS EV	DNA	85-87

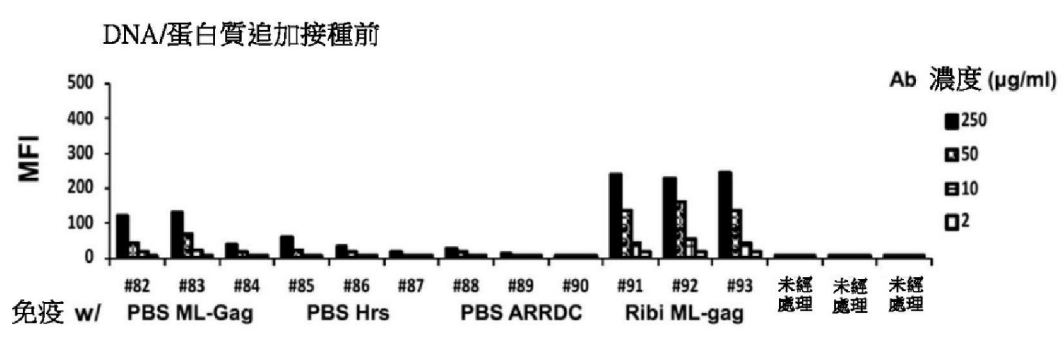
【圖23】



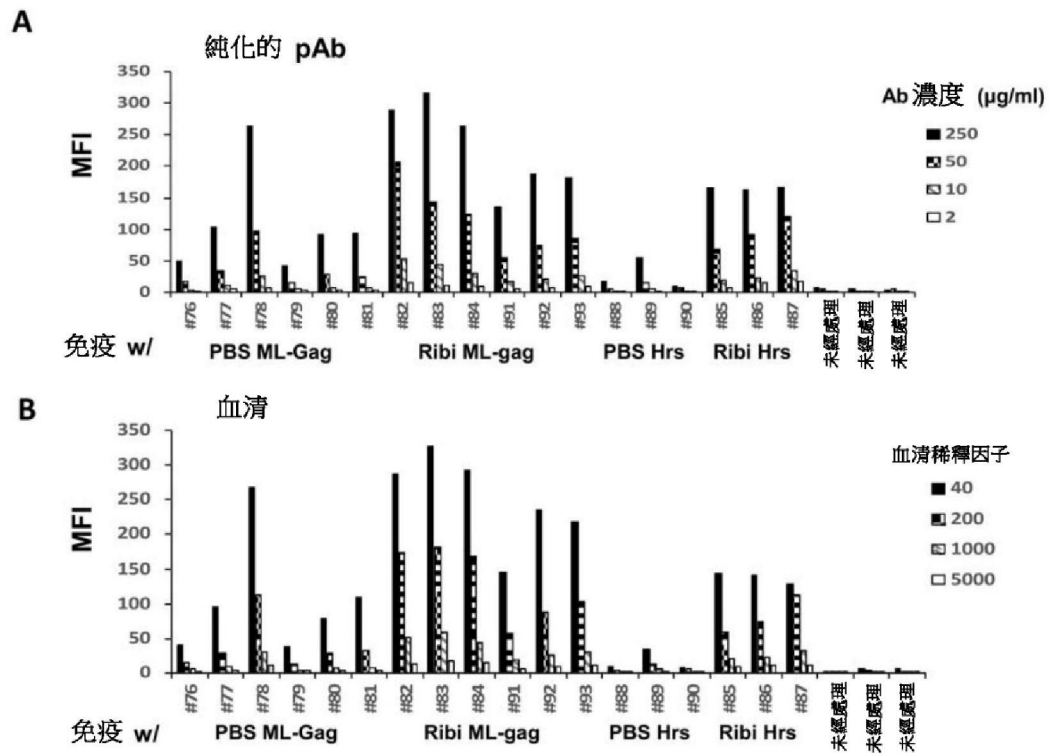
【圖24A】



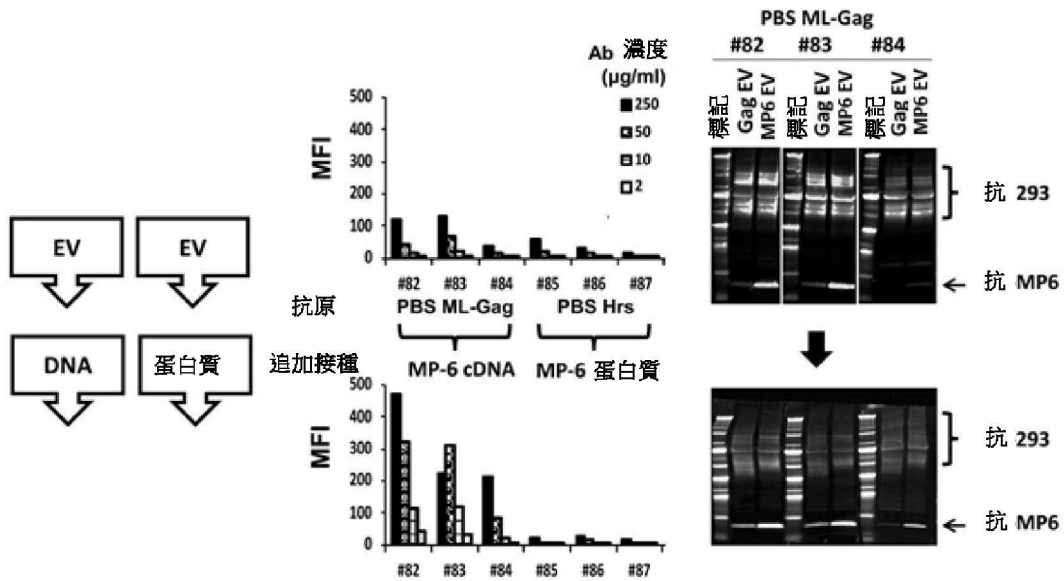
【圖24B】



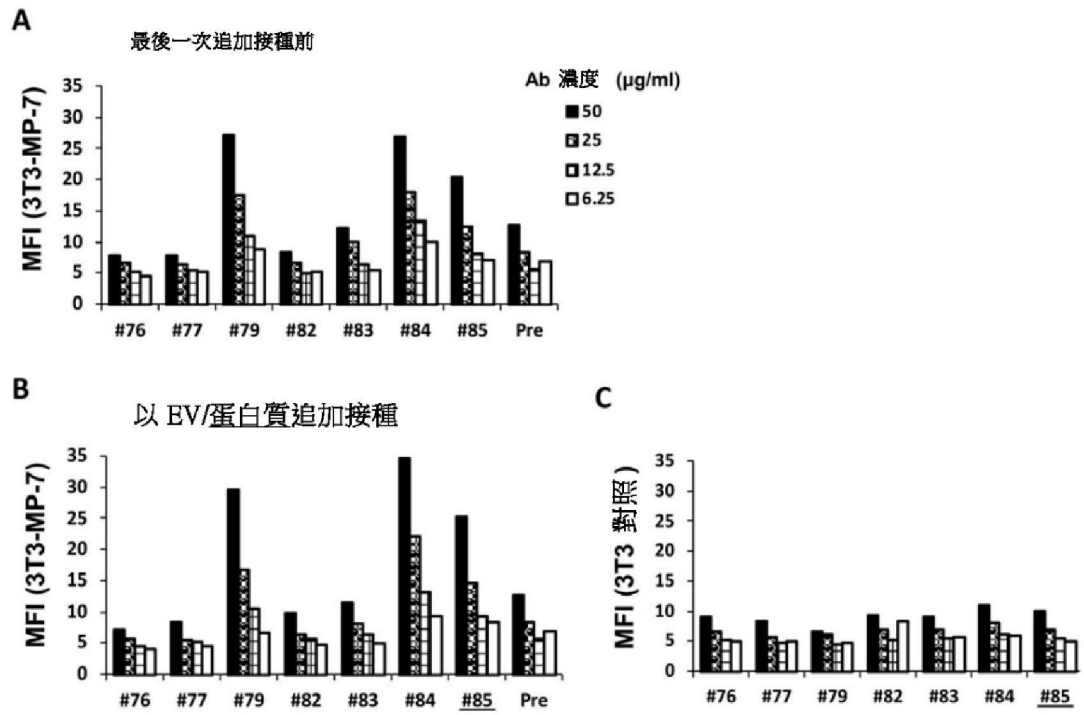
【圖24C】



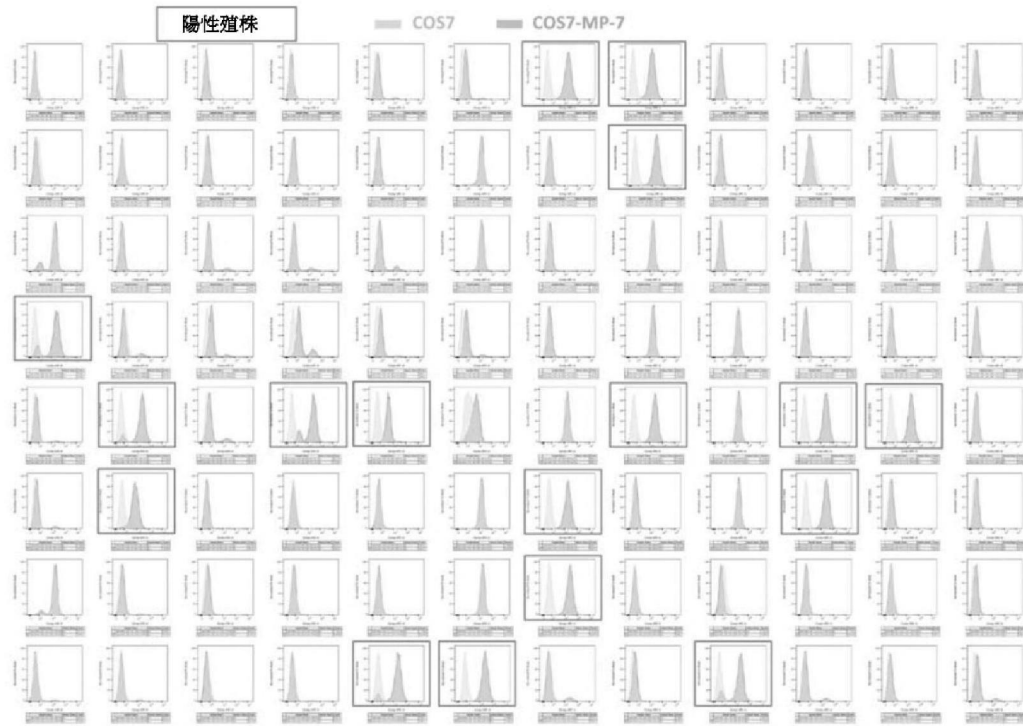
【圖25A-25B】



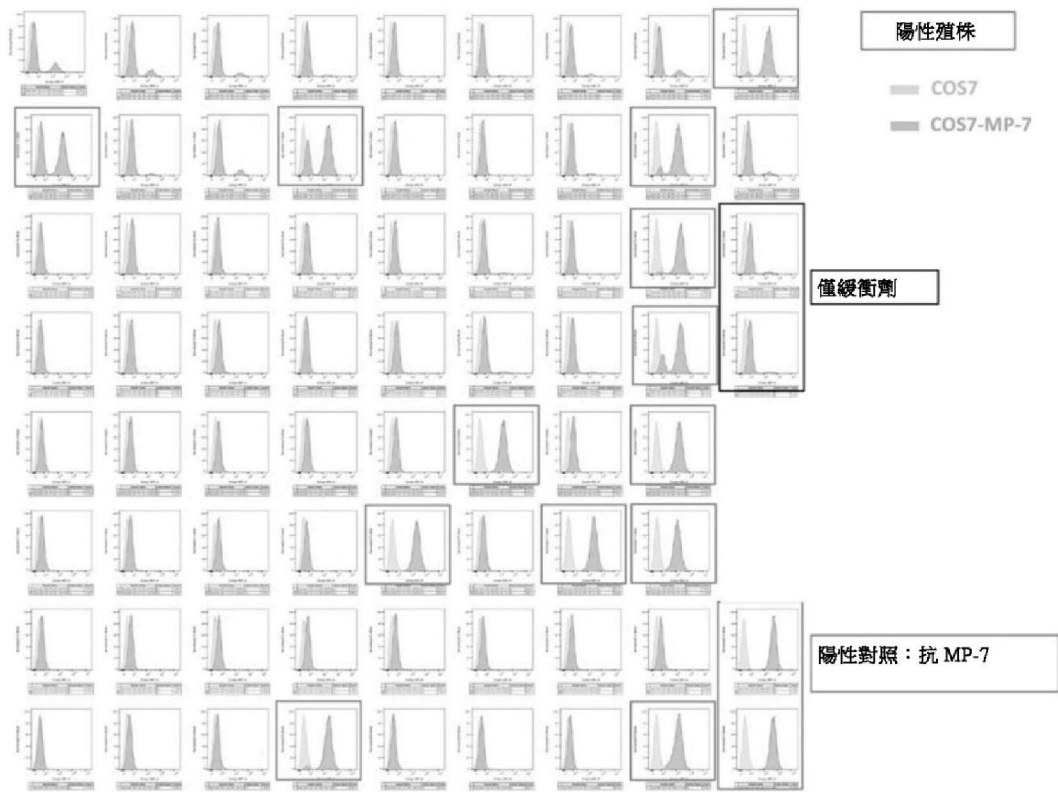
【圖26】



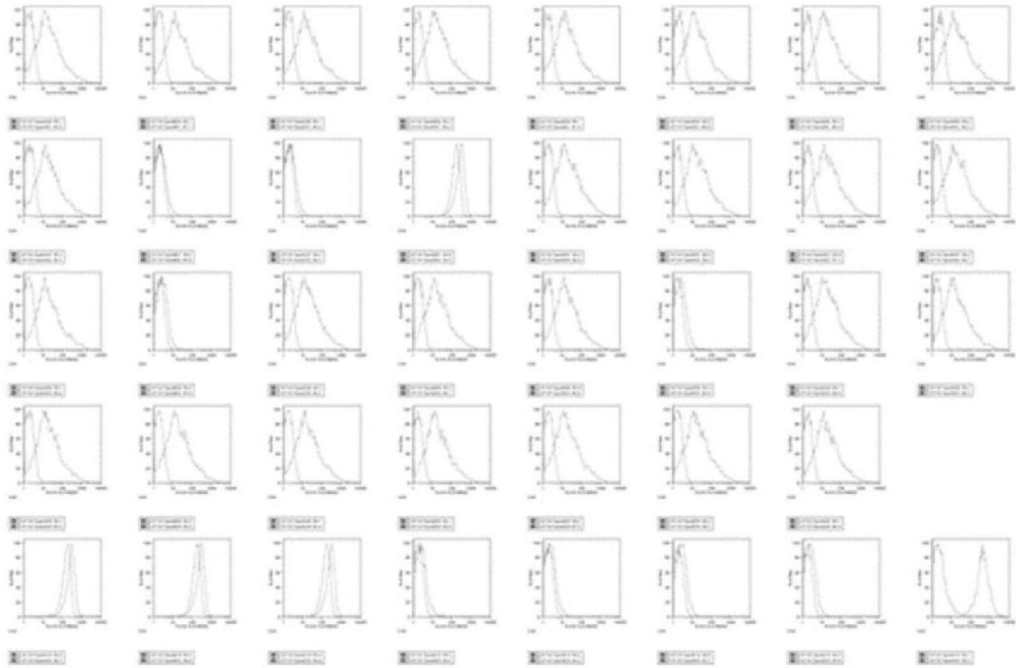
【圖27A-27C】



【圖28】

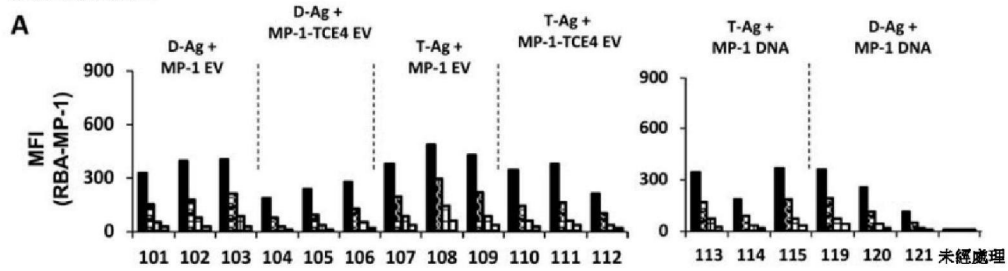


【圖29】

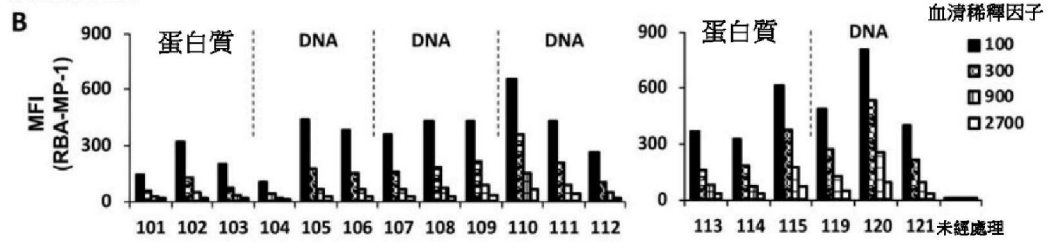


【圖30】

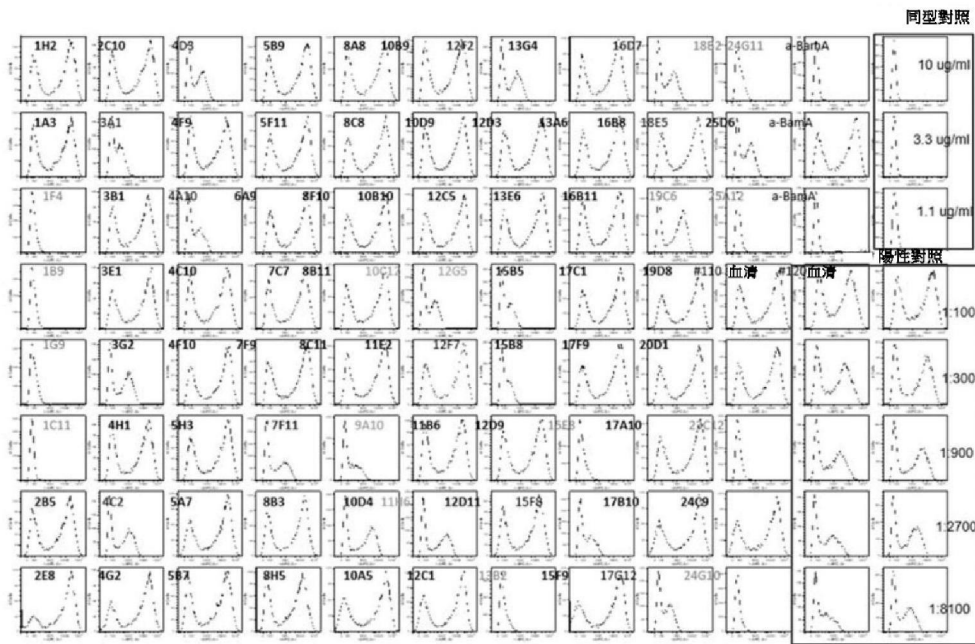
追加接種前



追加接種後



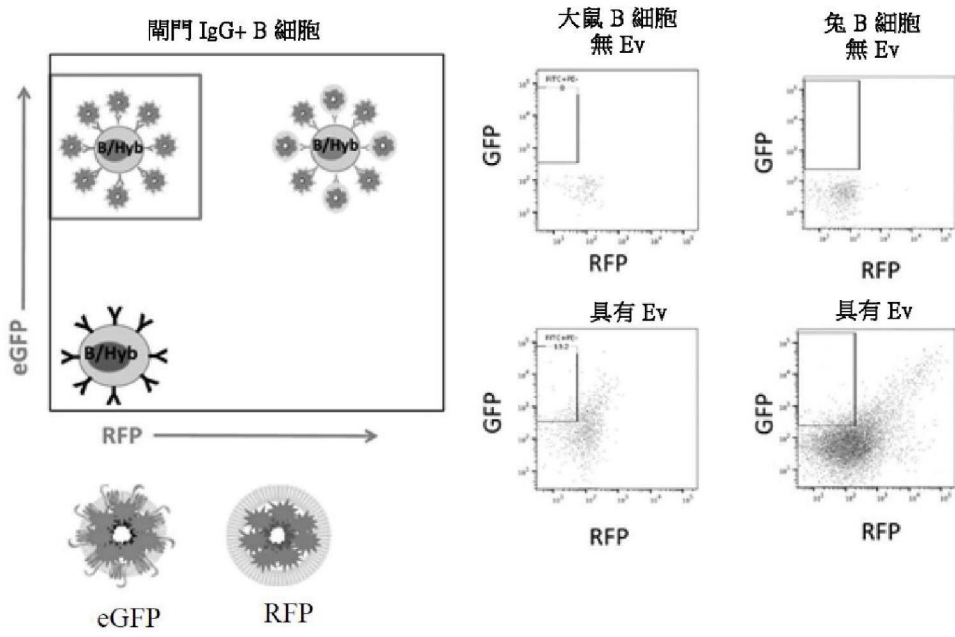
【圖31A-31B】



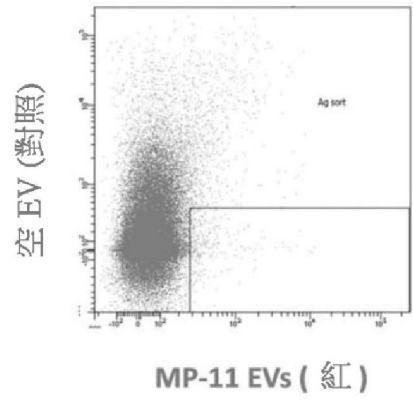
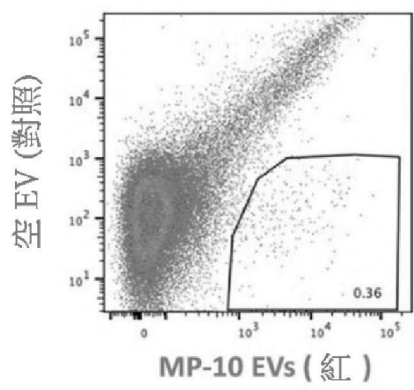
【圖32】

抗原	# ELISA+	# FACS+	% FACS+
蛋白質	1185	411	35
EV	373	273	73
DNA	377	313	83

【圖33】

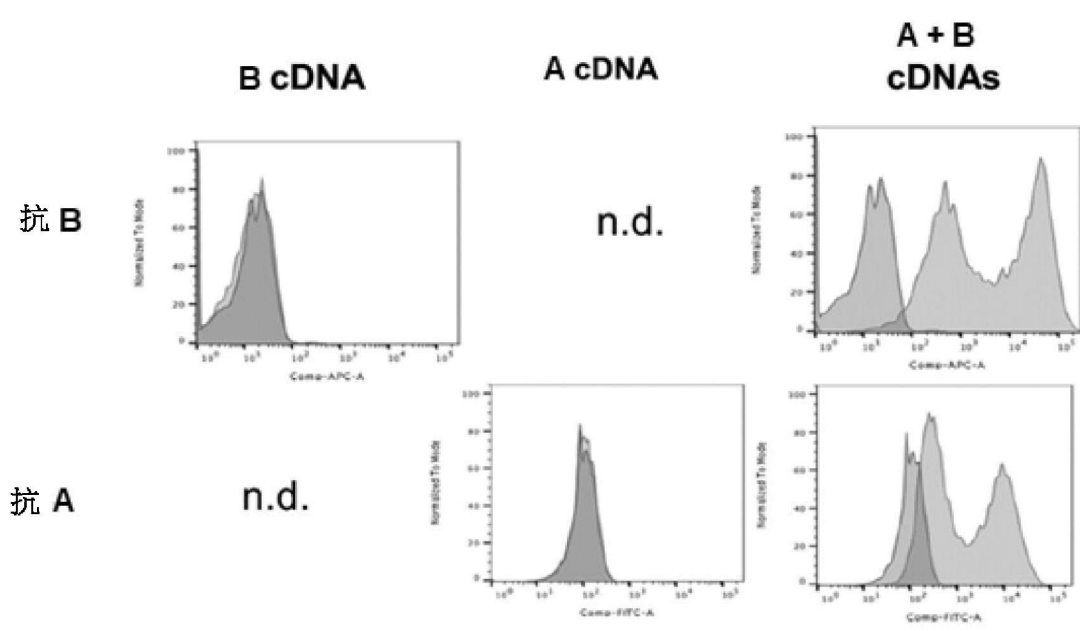


【圖34】

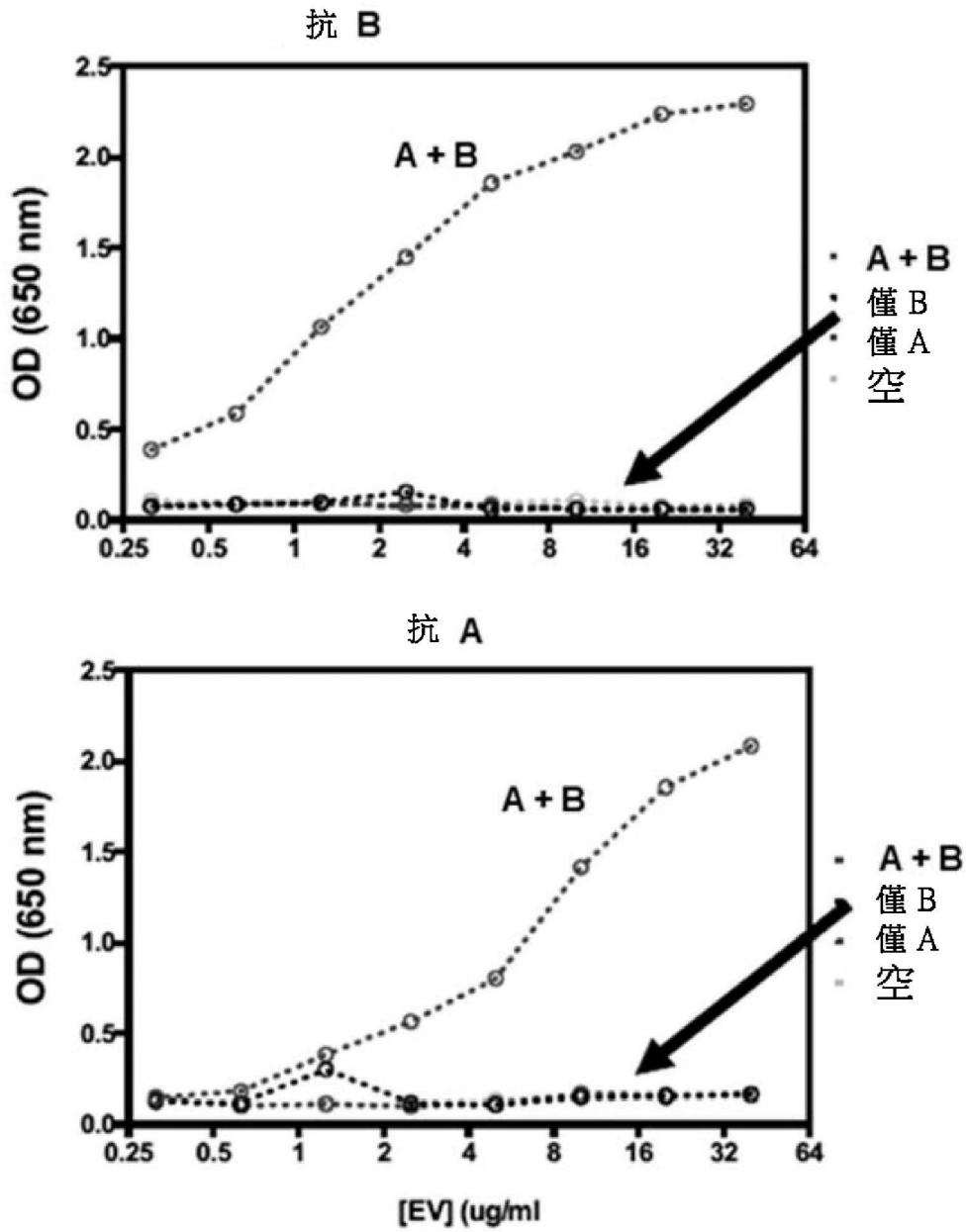


IgG+ 兔 B 細胞染色圖

【圖35】



【圖36A】



【圖36B】