



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201429506 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：103114085

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl.：

A61K9/08 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K38/47 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/09/11

歐洲專利局

09170110.2

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：亞德勒 麥可 ADLER, MICHAEL (DE)；瑪勒 漢斯 克里斯 MAHLER, HANNS-CHRISTIAN (DE)；史陶奇 奧利佛 波里斯 STAUCH, OLIVER BORIS (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 94 頁

(54)名稱

包含抗-CD20 抗體之高濃縮醫藥調配物及其用途

HIGHLY CONCENTRATED PHARMACEUTICAL FORMULATIONS COMPRISING ANTI-CD20 ANTIBODY AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於醫藥活性抗-CD20 抗體(例如利妥昔單抗(Rituximab)、奧瑞珠單抗(Ocrelizumab)或 HuMab < CD20 >)、或該等抗體分子之混合物之高濃縮穩定醫藥調配物，其用於皮下注射。具體而言，本發明係關於一種調配物，其中除了適量抗-CD20 抗體外，亦包含有效量之至少一種透明質酸酶，其作為組合調配物或以共調配物形式使用。該等調配物額外包含至少一種緩衝劑(例如組胺酸緩衝液)、穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物(例如，糖類，例如， α,α -海藻糖二水合物或蔗糖，及視情況選用甲硫胺酸作為第二穩定劑)、非離子型表面活性劑及有效量之至少一種透明質酸酶。本發明亦提供製備該等調配物之方法及其用途。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201429506 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：103114085

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl.：

A61K9/08 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61K38/47 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/09/11

歐洲專利局

09170110.2

(71)申請人：赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

瑞士

(72)發明人：亞德勒 麥可 ADLER, MICHAEL (DE)；瑪勒 漢斯 克里斯 MAHLER, HANNS-CHRISTIAN (DE)；史陶奇 奧利佛 波里斯 STAUCH, OLIVER BORIS (DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：0 共 94 頁

(54)名稱

包含抗-CD20 抗體之高濃縮醫藥調配物及其用途

HIGHLY CONCENTRATED PHARMACEUTICAL FORMULATIONS COMPRISING ANTI-CD20 ANTIBODY AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於醫藥活性抗-CD20 抗體(例如利妥昔單抗(Rituximab)、奧瑞珠單抗(Ocrelizumab)或 HuMab < CD20 >)、或該等抗體分子之混合物之高濃縮穩定醫藥調配物，其用於皮下注射。具體而言，本發明係關於一種調配物，其中除了適量抗-CD20 抗體外，亦包含有效量之至少一種透明質酸酶，其作為組合調配物或以共調配物形式使用。該等調配物額外包含至少一種緩衝劑(例如組胺酸緩衝液)、穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物(例如，糖類，例如， α,α -海藻糖二水合物或蔗糖，及視情況選用甲硫胺酸作為第二穩定劑)、非離子型表面活性劑及有效量之至少一種透明質酸酶。本發明亦提供製備該等調配物之方法及其用途。

發明摘要

※ 申請案號： 103114085 (由 99130758 分割)

※ 申請日：

99.9.10

※IPC 分類： A61K 9/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

包含抗-CD20抗體之高濃縮醫藥調配物及其用途

HIGHLY CONCENTRATED PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

COMPRISING ANTI-CD20 ANTIBODY AND USES THEREOF

○【中文】

本發明係關於醫藥活性抗-CD20抗體(例如利妥昔單抗(Rituximab)、奧瑞珠單抗(Ocrelizumab)或HuMab <CD20>)、或該等抗體分子之混合物之高濃縮穩定醫藥調配物，其用於皮下注射。具體而言，本發明係關於一種調配物，其中除了適量抗-CD20抗體外，亦包含有效量之至少一種透明質酸酶，其作為組合調配物或以共調配物形式使用。該等調配物額外包含至少一種緩衝劑(例如組胺酸緩衝液)、穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物(例如，糖類，例如， α,α -海藻糖二水合物或蔗糖，及視情況選用甲硫胺酸作為第二穩定劑)、非離子型表面活性劑及有效量之至少一種透明質酸酶。本發明亦提供製備該等調配物之方法及其用途。

【英文】

The present invention relates to a highly concentrated, stable pharmaceutical formulation of a pharmaceutically active anti-CD20 antibody, such as e.g. Rituximab, Ocrelizumab or HuMab<CD20>, or a mixture of such antibody molecules for subcutaneous injection. In particular, the present invention relates to formulations comprising, in addition to a suitable amount of the anti-CD20 antibody, an effective amount of at least one hyaluronidase enzyme as a combined formulation or for use in form of a co-formulation. The said formulations comprise additionally at least one buffering agent, such as e.g. a histidine buffer, a stabilizer or a mixture of two or more stabilizers (e.g. a saccharide, such as e.g. α,α -trehalose dihydrate or sucrose, and optionally methionine as a second stabilizer), a nonionic surfactant and an effective amount of at least one hyaluronidase enzyme. Methods for preparing such formulations and their uses thereof are also provided.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：(無)。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

包含抗-CD20抗體之高濃縮醫藥調配物及其用途

HIGHLY CONCENTRATED PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

COMPRISING ANTI-CD20 ANTIBODY AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明係關於醫藥活性抗-CD20抗體、或該等抗體分子之混合物之高濃縮穩定醫藥調配物，其用於皮下注射。除高量抗-CD20抗體或其混合物外，該等調配物亦包含緩衝劑、穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物、非離子型表面活性劑及有效量之至少一種透明質酸酶。本發明亦係關於製備該調配物之方法及該調配物之用途。

【先前技術】

在過去幾年中，抗體之醫藥用途已增加。在許多情況下，該等抗體係經由靜脈內(IV)路徑注射或輸注。不幸的是，可經由靜脈內路徑投與之抗體的量受限於抗體之物理-化學性質、具體而言其在適宜液體調配物中之溶解度及穩定性及輸注液之體積。替代投與途徑係皮下或肌內注射。該等注射途徑要求在欲注射之最終溶液中有高蛋白濃度 [Shire, S.J., Shahrokh, Z.等人，「Challenges in the development of high protein concentration formulations」，J. Pharm. Sci. 2004; 93(6): 1390-1402；Roskos, L.K., Davis C.G.等人，「The clinical pharmacology of therapeutic antibodies」，Drug Development Research 2004; 61(3): 108-120]。為增大可安全且舒適地皮下投與之體積且藉此增大治療劑量，已提出使用黏多糖酶以增大可注射抗體調配物之間質空間 [WO 2006/091871]。

目前市場上用於治療用途之醫藥活性抗體之穩定調配物的實例係如下：

RITUXAN®/MABTHERA®(利妥昔單抗)係結合B細胞上之CD20抗原的嵌合抗體。市售調配物係用於靜脈內(IV)投與之無菌、澄清、無色、無防腐劑之液體濃縮物。利妥昔單抗係以10 mg/mL (10 mL)之濃度在100 mg或500 mg (50 mL)一次性使用小瓶中供應。將該產品調配於9 mg/mL氯化鈉、7.35 mg/mL檸檬酸鈉二水合物、0.7 mg/mL聚山梨醇酯80及注射用水中。將pH調節至6.5。適於IV投與之利妥昔單抗之替代液體調配物揭示於美國專利第6,991,790號中。

HERCEPTIN™(曲司佐單抗(Trastuzumab))係針對HER2受體(抗-HER2)之單株抗體，其目前在歐洲以150 mg凍乾粉末(含有抗體、 α,α -海藻糖二水合物、L-組胺酸及L-組胺酸鹽酸鹽及聚山梨醇酯20)形式銷售，其應重構用於以注射用水輸注以產生約21 mg/ml之注射劑量。在美國及許多其他國家中，銷售含有440 mg曲司佐單抗之多劑量小瓶。

AVASTIN™(貝伐單抗(Bevacizumab))係針對血管內皮生長因子(VEGF)之單株抗體，其目前在歐洲以存於兩種類型之小瓶中的液體調配物形式銷售：分別為a) 100 mg貝伐單抗，存於4 ml中，及b) 400 mg貝伐單抗，存於16 ml中，其提供存於含有以下賦形劑之注射用水中之25 mg/ml的最終濃度：海藻糖二水合物、磷酸鈉及聚山梨醇酯20。

儘管已發現上述抗體調配物適用於靜脈內投與，但仍期望提供用於皮下注射之治療活性抗體的高濃縮之穩定醫藥調配物。皮下注射之優勢在於其可使醫務人員以對患者相當短干涉來執行。此外，可對患者進行訓練以自己實施皮下注射。通常，經由皮下路徑之注射限於約2 ml。對於需要多劑量之患者而言，可在身體表面之多個位點處注射

若干單位劑量調配物。

市場上已有以下兩種用於皮下投與之抗體產品。

HUMIRA™(阿達木單抗(Adalimumab))係針對腫瘤壞死因子 α (TNF α)之單株抗體，其目前在歐洲以存於0.8 ml用於皮下施加之注射體積中的40 mg劑量形式(濃度：50 mg抗體/ml注射體積)銷售。

XOLAIR™(奧馬珠單抗(Omalizumab))係針對免疫球蛋白E之單株抗體(抗-IgE)，其目前以150 mg凍乾粉末(含有抗體、蔗糖、組胺酸及組胺酸鹽酸鹽單水合物及聚山梨醇酯20)形式銷售，其將用皮下注射用水重構以得到125 mg/ml注射劑量。

目前市場上不可獲得適於皮下投與之高濃縮之穩定醫藥抗-CD20抗體調配物。因此，期望提供用於皮下注射之治療活性抗體的該等高濃縮之穩定醫藥調配物。

向下皮中注射非經腸藥物由於此對皮下(SC)組織中之導水率的黏彈性抗性及在注射時所產生背壓[Aukland K.及Reed R.,「Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume」, Physiology Reviews」, 1993; 73:1-78]以及由於感知到疼痛而通常限於小於2 ml之體積。

高濃度蛋白調配物之製備極具挑戰性且需要使每一調配物適於所用特定蛋白，此乃因每一蛋白具有不同聚集行為。懷疑聚集體在至少一些情形下可產生治療蛋白之免疫原性。針對蛋白或抗體聚集體之免疫原性反應可導致中和抗體，其可使得治療蛋白或抗體無效。似乎蛋白聚集體之免疫原性係與皮下注射有關之最大問題，藉此重複投與會增大免疫應答之風險。

儘管抗體具有極為類似總體結構，但該等抗體之胺基酸組成(具體而言負責結合抗原之CDR區)及糖基化模式不同。此外，可額外存在翻譯後修飾形式，例如電荷及糖基化變體。

【發明內容】

本發明提供醫藥活性抗-CD20抗體、或該等抗體分子之混合物之高濃縮之穩定醫藥調配物，其較佳用於皮下注射。

更具體而言，本發明之醫藥活性抗-CD20抗體調配物之高濃縮之穩定醫藥調配物包含：

- 約20 mg/ml至350 mg/ml抗-CD20抗體；
- 約1 mM至100 mM緩衝劑，其提供 5.5 ± 2.0 之pH；
- 約1 mM至500 mM穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物，

其中視情況較佳以5 mM至25 mM之濃度使用甲硫胺酸作為次要穩定劑；

- 0.01%至0.1%非離子型表面活性劑；及
- 較佳地，有效量之至少一種透明質酸酶。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

本文術語「抗體」係以最廣泛含義使用且尤其涵蓋全長抗體、經遺傳改造的抗體(如單株抗體、或重組抗體、多株抗體、自至少兩個全長抗體形成之多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)、嵌合抗體、人類化抗體、完全人類抗體)、以及該等抗體之片段，只要其展現期望生物活性即可。

本文所用術語「單株抗體」係指自實質上同源之抗體群獲得之抗體，即包含該群之個別抗體相同及/或結合相同抗原決定部位，除可在單株抗體生成期間產生之可能變體(例如通常以少量存在之變體)外。與通常包括針對不同決定簇(抗原決定部位)之不同抗體之多株抗體製品相反，每一單株抗體皆針對抗原上之單個決定簇。除其特異性外，單株抗體的優勢在於其可不受其他免疫球蛋白污染。修飾詞「單

株」意指抗體特徵係自實質上同源之抗體群獲得，且不應理解為需要藉由任一特定方法來生產該抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由首先由Köhler等人(Nature, 256:495(1975))闡述之雜交瘤方法製得或可藉由重組DNA方法製得(例如，參見美國專利第4,816,567號)。「單株抗體」亦可使用Clackson等人(Nature, 352:624-628 (1991))及Marks等人(J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))闡述之技術自噬菌體抗體文庫分離出來。本文所用之術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指具有單一胺基酸組成之抗體分子製品。因此，術語「人類單株抗體」係指具有衍生自人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區之展示單一結合特異性的抗體。在一個實施例中，人類單株抗體係藉由雜交瘤產生，該雜交瘤包括與無限增殖化細胞融合之自轉基因非人類動物(例如轉基因小鼠)獲得之B細胞，該轉基因非人類動物具有包含人類重鏈轉基因及人類輕鏈轉基因之基因組。本文術語「單株抗體」尤其包括所謂嵌合抗體，其中重鏈及/或輕鏈的一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體的對應序列相同或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體的對應序列相同或同源；以及此等抗體之片段，只要其展現期望生物活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984))。本文所關注之嵌合抗體包括包含源自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿等)之可變結構域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化(primatized)」抗體。

「抗體片段」包含全長抗體之一部分，一般言之，至少包含其抗原結合部位或其可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段；雙抗體；單鏈抗體分子；免疫毒素；及自抗體片段形成之多特異性抗體。另外，抗體片段包含具有VH鏈之特徵的單鏈多肽，即能

夠與結合CD20抗原之VL鏈組裝在一起。「抗體片段」亦包含此等片段，其本身不能提供效應功能(ADCC/CDC)，但在與適當抗體恆定結構域組合後可以本發明方式提供此功能。

「全長抗體」係包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定結構域(CL)及重鏈恆定結構域(CH1、CH2及CH3)者。該等恆定結構域可為天然序列恆定結構域(例如人類天然序列恆定結構域)或其胺基酸序列變體。較佳地，全長抗體具有一或多種效應子功能。

本文「胺基酸序列變體」抗體係具有不同於主要物種抗體之胺基酸序列的抗體。通常，胺基酸序列變體可具有與主要物種抗體至少約70%之同源性，且較佳地其具有與主要物種抗體至少約80%、更佳至少約90%之同源性。胺基酸序列變體在主要物種抗體之胺基酸序列內或其附近之某些位置處具有取代、缺失及/或添加。本文胺基酸序列變體之實例包括酸性變體(例如，去醯胺化抗體變體)、鹼性變體、在其一條或兩條輕鏈上具有胺基-末端前導延伸(例如，VHS-)之抗體、在其一條或兩條重鏈上具有C-末端離胺酸殘基之抗體等，且包括重鏈及/或輕鏈之胺基酸序列之變化組合。本文尤其關注之抗體變體係在其一條或兩條輕鏈上包含胺基-末端前導延伸、視情況進一步包含其他胺基酸序列及/或相對於主要物種抗體之糖基化差別的抗體。

本文之「糖基化變體」抗體係其上附接有一或多個不同於附接至主要物種抗體之一或多個碳水化合物部分之碳水化合物部分的抗體。本文糖基化變體之實例包括具有附接至其Fc區之G1或G2寡糖結構而非G0寡糖結構之抗體、具有附接至其一條或兩條輕鏈之一個或兩個碳水化合物部分的抗體、無附接至抗體之一條或兩條重鏈之碳水化合物的抗體等、及糖基化改變形式之組合。此外，術語「糖基化變體」亦包括糖改造之抗體，例如彼等闡述於WO 1'331'266及USP 7'517'670中者。

抗體「效應子功能」係指彼等可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變體Fc區)的生物學活性。抗體效應子功能之實例包括C1q結合；補體依賴細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞調介之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之減量調控等。

端視全長抗體重鏈中恆定結構域之胺基酸序列，可將全長抗體歸類為不同「種類」。全長抗體主要有五類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且可將此等中之數個種類進一步劃分成「亞類」(同種型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。對應於不同種類抗體之重鏈恆定結構域分別稱作 α [alpha]、 δ [delta]、 ϵ [epsilon]、 γ [gamma]及 μ [mu]。不同種類免疫球蛋白之亞單位結構及三維構型已為吾人所熟知。

本文中單株抗體之「生物活性」係指抗體結合抗原並產生可在活體外或活體內量測之可量測生物反應之能力。該活性可為拮抗性(例如，其中抗體係CD20抗體)或激動性。

術語「人類化抗體」係指框架或「互補決定區」(CDR)已修飾成包含與親本免疫球蛋白相比具有不同特異性之免疫球蛋白之CDR的抗體。在較佳實施例中，將鼠科動物CDR移植入人類抗體之框架區中以製備「人類化抗體」。尤佳CDR對應於彼等可識別嵌合及雙功能抗體之下述抗原之代表序列。在極大程度上，人類化抗體係如下的人類免疫球蛋白(接受者抗體)：來自接受者超變區之殘基由來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)超變區(供體抗體)之具有期望特異性、親和力及容量的殘基所代替。在某些情況下，人類免疫球蛋白框架區(FR)殘基經相應非人類殘基代替。此外，人類化抗體可包含接受者抗體或供體抗體中不存在之殘基。實施該等修飾可進一步改進抗體特性。通常，人類化抗體包含實質上全部的至少一個、且通

常兩個可變結構域，其中全部或實質上全部的超變環對應於非人類免疫球蛋白之超變環，且全部或實質上全部FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦包含免至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)、通常人類免疫球蛋白之至少一部分(參見，例如，Riechmann, L.等人，Nature 332 (1988) 323-327；及Neuberger, M.S.等人，Nature 314 (1985) 268-270)。

術語「嵌合抗體」係指包含來自一種來源或物種之可變區(即，結合區)及衍生自不同來源或物種之恆定區之至少一部分的單株抗體，其通常藉由重組DNA技術來製備。包含鼠科動物可變區及人類恆定區之嵌合抗體尤佳。此等鼠科動物/人類嵌合抗體係免疫球蛋白基因之表現產物，該等免疫球蛋白基因包含編碼鼠科動物免疫球蛋白可變區之DNA片段及編碼人類免疫球蛋白恆定區之DNA片段。本發明所涵蓋之其他形式「嵌合抗體」係彼等源自原始抗體者之經修飾或改變之類別或亞類。該等「嵌合」抗體亦稱為「經類別轉換之抗體」。產生嵌合抗體之方法包括現在已為熟習此項技術者所熟知之習用重組DNA及基因轉染技術(參見，例如，Morrison, S.L.等人，Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855；US 5,202,238及US 5,204,244)。

本文所用之術語「人類抗體」意欲包括具有衍生自人類種系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區之抗體。人類抗體已為當前技術領域所熟知(van Dijk, M.A.及van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374)。基於該技術，可製備抗多種靶標之人類抗體。人類抗體之實例闡述於(例如)Kellermann, S. A.等人，Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597中。

本文所用之術語「重組人類抗體」意欲包括所有可藉由重組手段製備、表現、產生或分離之人類抗體，例如分離自諸如NS0或CHO細胞等宿主細胞或分離自人類免疫球蛋白基因之轉基因動物(例如小鼠)

的抗體、或使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體。該等重組人類抗體具有衍生自人類種系免疫球蛋白序列之呈重排形式的可變區及恆定區。本發明之重組人類抗體已經受活體內體細胞超突變。因此，重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列係儘管衍生自人類種系VH及VL序列且與之相關但非天然存在於人類抗體種系譜活體內中之序列。

本文所用之「特異性結合(specifically binding或binds specifically to)」係指抗體與CD20抗原特異性結合。較佳地，結合親和力具有 10^{-9} mol/l或更低(例如 10^{-10} mol/l)之Kd值，較佳具有 10^{-10} mol/l或更低(例如 10^{-12} mol/l)之Kd值。利用標準結合分析(例如表面電漿共振技術(BIACORE®))測定結合親和力。

本文所用之術語「核酸分子」意欲包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單鏈或雙鏈，但較佳係雙鏈DNA。

「恆定結構域」並不直接參與抗體與抗原之結合，而是參與效應子功能(ADCC、補體結合、及CDC)。

本文所用之「可變區」(輕鏈之可變區(VL)、重鏈之可變區(VH))代表每一對直接參與抗體與抗原結合之輕鏈及重鏈。可變人類輕鏈及重鏈結構域具有相同之通用結構，且每一結構域包含四個序列高度保守之框架(FR)區，該等FR區經由三個「超變區」(或互補決定區，CDR)連接。框架區採用 β -摺疊構象且CDR可形成連接 β -摺疊結構之環。每一鏈中之CDR係藉由框架區來保持其三維結構，並與另一鏈中之CDR一起形成抗原結合位點。抗體重鏈及輕鏈之CDR3區在本發明抗體之結合特異性/親和力方面發揮特別重要之作用，且藉此可提供本發明之又一目的。

本文所用之術語「超變區」或「抗體之抗原結合部分」係指抗體中負責與抗原結合之胺基酸殘基。超變區包含來自「互補決定區」或

「CDR」之胺基酸殘基。「框架」或「FR」區係彼等除本文所定義的超變區殘基以外之可變結構域區。因此，抗體之輕鏈及重鏈自N-端至C-端包含結構域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。尤其而言，重鏈之CDR3係對抗原結合貢獻最大之區域。CDR及FR區係根據Kabat等人之標準定義(Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD.(1991))及/或彼等來自「超變環」之殘基來確定。

術語「CD20」與「CD20抗原」在本文中可互換使用，且包括由細胞天然表現或在經CD20基因轉染之細胞中表現之人類CD20的任何變體、異型體及物種同系物。本發明抗體與CD20抗原之結合藉由使CD20失活來調介殺死表現CD20之細胞(例如，腫瘤細胞)。表現CD20之細胞之殺死可藉由一或多種以下機制發生：抗體依賴性細胞毒性(ADCC)、補體依賴性細胞毒性(CDC)，包括細胞死亡及/或細胞凋亡、同型聚集等。

業內認識到，CD20之同義詞包括B-淋巴細胞抗原CD20、B-淋巴細胞表面抗原B1、Leu-16及Bp35。

本發明之術語「抗-CD20抗體」係與CD20抗原特異性結合之抗體。端視抗-CD20抗體與CD20抗原之結合特性及生物活性，根據Cragg, M.S.等人，Blood 103 (2004) 2738-2743；及Cragg, M.S.等人，Blood 101 (2003) 1045-1051，可分成兩種抗-CD20抗體類型(第I型及第II型抗-CD20抗體)，參見表1。

表1：第I型及第II型抗-CD20抗體之特性

第I型抗-CD20抗體	第II型抗-CD20抗體
第I型CD20抗原決定部位	第II型CD20抗原決定部位
將CD20限制在脂質筏區域	不將CD20限制在脂質筏區域
CDC增加(若IgG1同種型)	CDC降低(若IgG1同種型)
ADCC活性(若IgG1同種型)	ADCC活性(若IgG1同種型)
完整結合能力	降低之結合能力
同型聚集	同型聚集較為強烈
交聯後誘導細胞凋亡	無交聯時強烈誘導細胞死亡

第I型及第II型抗-CD20抗體之一個基本特性係其結合模式。因此，第I型及第II型抗-CD20抗體可藉由該抗-CD20抗體與利妥昔單抗之與Raji細胞(ATCC號：CCL-86)上之CD20的結合容量比來分類。

本文所用之「抗-CD20抗體」可為第I型或第II型抗體。較佳地，其係第I型抗體，最佳地其係利妥昔單抗。

對於第I型抗-CD20抗體而言，該抗-CD20抗體與利妥昔單抗之與Raji細胞(ATCC號：CCL-86)上之CD20的結合容量比為0.8至1.2，較佳為0.9至1.1。該第I型抗-CD20抗體之實例包括(例如)EP2000149B1(Anderson等人，參見，例如，圖4及5)中之利妥昔單抗、1F5 IgG2a (ECACC，融合瘤；Press等人，Blood 69/2:584-591 (1987))、HI47 IgG3 (ECACC，融合瘤)、2C6 IgG1(如WO 2005/103081中所揭示)、2F2 IgG1或奧法木單抗(ofatumumab)(如WO 2004/035607及WO 2005/103081中所揭示)及2H7 IgG1(如WO 2004/056312中所揭示)及WO 2006/084264(例如，表1及2中所揭示變體)。較佳地，該第I型抗-CD20抗體係與利妥昔單抗結合相同抗原決

定部位之單株抗體。

對於第II型抗-CD20抗體而言，該抗-CD20抗體與利妥昔單抗之與Raji細胞(ATCC號：CCL-86)上之CD20的結合容量比為0.3至0.6，較佳為0.35至0.55，更佳為0.4至0.5。該等第II型抗-CD20抗體之實例包括(例如)托西莫單抗(tositumomab) (B1 IgG2a)、人類化B-Ly1抗體IgG1(WO 2005/044859中揭示之嵌合人類化IgG1抗體)、11B8 IgG1(如WO 2004/035607中所揭示)、及AT80 IgG1。較佳地，該第II型抗-CD20抗體係與人類化B-Ly1抗體(如WO 2005/044859中所揭示)結合相同抗原決定部位之單株抗體。

「抗-CD20抗體與利妥昔單抗之與Raji細胞(ATCC號：CCL-86)上之CD20的結合容量比」係如在FACSArray (Becton Dickinson)中使用與Cy5偶聯之該抗-CD20抗體及與Cy5偶聯之利妥昔單抗使用Raji細胞(ATCC號：CCL-86)藉由直接免疫螢光量測來測定(量測平均螢光強度(MFI))，且如下進行計算：

與Raji細胞(ATCC編號CCL-86)上之CD20的結合能力比=

$$\frac{\text{MFI(Cy5-抗-CD20 抗體)}}{\text{MFI(Cy5-利妥昔單抗)}} \times \frac{\text{Cy5-標記比(Cy5-利妥昔單抗)}}{\text{Cy5-labeling ratio(Cy5- rituximab)}} \quad \text{)} \\ \text{Cy5-標記比(Cy5-抗-CD20 抗體)}$$

MFI係平均螢光強度。本文所用之「Cy5-標記比」意指每分子抗體之Cy5-標記分子的數量。

通常，對於該第I型抗-CD20抗體而言，該第一抗-CD20抗體與利妥昔單抗之與Raji細胞(ATCC號：CCL-86)上之CD20的結合容量比為0.8至1.2，較佳為0.9至1.1。

一般而言，對於該第II型抗-CD20抗體而言，該第II型抗-CD20抗體與利妥昔單抗相比與Raji細胞(ATCC編號CCL-86)上之CD20的結合能力比為0.3至0.6，較佳為0.35至0.55，更佳為0.4至0.5。

在一較佳實施例中，該第II型抗-CD20抗體(較佳為人類化B-Ly1抗體)具有增加之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

所謂「抗體具有增加之抗體依賴性細胞毒性(ADCC)」意指藉由熟習此項技術者所習知之任何適宜方法測定抗體(該術語如本文中所定義)具有增加之ADCC。一種普遍使用之活體外ADCC分析如下：

1)該分析使用已知表現藉由抗體之抗原結合區識別之靶抗原的靶細胞；

2)該分析使用自隨機選擇之健康供體血液分離之人類外周血單核細胞(PBMC)作為效應細胞；

3)按照以下方案來實施該分析：

i)使用標準密度離心程序分離出PBMC並以 5×10^6 個細胞/ml懸浮於RPMI細胞培養基中；

ii)藉由標準組織培養方法生長靶細胞，在生存能力高於90%之指數生長期收穫，在RPMI細胞培養基中洗滌，用100微居裏 ^{51}Cr 進行標記，用細胞培養基洗滌兩次，並以 10^5 個細胞/ml密度再懸浮於細胞培養基中；

iii)將100微升上文最終靶細胞懸浮液轉移至96-孔微量滴定板之每一孔中；

iv)將抗體自4000 ng/ml至0.04 ng/ml連續稀釋於細胞培養基中並將50微升所得抗體溶液添加至96-孔微量滴定板中之靶細胞中，一式三份測試涵蓋上文整個濃度範圍之多個抗體濃度；

v)對於最大釋放(MR)對照，板中含有經標記靶細胞之另外3個孔接受50微升非離子清潔劑(Nonidet, Sigma, St. Louis)之2% (VN)水溶液而非抗體溶液(上文第iv條)；

vi)對於自發釋放(SR)對照，板中含有經標記靶細胞之另外3個孔接受50微升RPMI細胞培養基而非抗體溶液(上文第iv條)；

vii)隨後將該96-孔微量滴定板在50×g下離心1分鐘並在4℃下培育1小時；

viii)將50微升PBMC懸浮液(上文第i條)添加至每一孔中以使效應子與靶細胞比為25:1並將板在培育箱中於5% CO₂氛圍及37℃下放置4小時；

ix)收穫每一孔之無細胞上清液，並使用γ計數器定量實驗釋放之放射性(ER)；x)根據式 $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ 計算每一抗體濃度之特異性溶解百分比，其中ER係該抗體濃度所定量(參見上文第ix條)之平均放射性，MR係MR對照(參見上文第V條)所定量(參見上文第ix條)之平均放射性，且SR係SR對照(參見上文第vi條)所定量(參見上文第ix條)之平均放射性；

4)「增加之ADCC」定義為在上文所測試之抗體濃度範圍內觀察到特異性溶解之最大百分比增加及/或達成在上文所測試之抗體濃度範圍內觀察到之特異性溶解之最大百分比的一半所需要之抗體濃度降低。ADCC之增加係相對於如下ADCC，該ADCC係用上述分析量測，由相同抗體調介，該相同抗體由相同類型宿主細胞產生，使用熟習此項技術者已知的相同標準方法製備、純化、調配及儲存，但已無法由經改造可過表現GnTIII之宿主細胞產生。

該「增加之ADCC」可藉由對該等抗體實施糖改造而獲得，即意指如Umana, P.等人，Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)及美國專利第6,602,684號中所述藉由對單株抗體之寡糖組份實施改造來增強該等單株抗體之該天然、細胞調介之效應子功能。

術語「補體依賴性細胞毒性(CDC)」係指在補體存在下本發明抗體對人類腫瘤靶細胞之溶解。較佳藉由在補體存在下用本發明抗-CD20抗體處理表現CD20之細胞製品來量測CDC。若於4小時後在100 nM濃度下抗體誘導20%或更多之腫瘤細胞溶解(細胞死亡)，則認為存

在CDC。該分析較佳用經 ^{51}Cr 或Eu標記之腫瘤細胞並量測所釋放之 ^{51}Cr 或Eu來實施。對照包括將靶腫瘤細胞與補體但不與抗體一起培育。

通常，IgG1同種型之第I型及第II型抗-CD20抗體顯示特徵性CDC特性。第I型抗-CD20抗體與第II型抗-CD20抗體相互比較，第I型抗-CD20抗體具有增加之CDC(若IgG1同種型)且第II型抗-CD20抗體具有降低之CDC(若IgG1同種型)。較佳地，第I型及第II型抗-CD20抗體二者均係IgG1同種型抗體。

「利妥昔單抗」抗體係含有經遺傳改造之嵌合人類 γ 1鼠科動物恆定結構域之針對人類CD20抗原的單株抗體。此嵌合抗體含有人類 γ 1恆定結構域且在EP2000149B1 (Anderson等人，參見，例如，圖4及5)中以名稱「C2B8」標識。利妥昔單抗已經批准用於治療患有復發性或難治性低級或濾泡狀且呈CD20陽性之B-細胞非霍奇金氏(non-Hodgkin's)淋巴瘤的患者。作用研究之活體外機制顯示利妥昔單抗呈現人類補體依賴性細胞毒性(CDC)(Reff等人，Blood 83(2): 435-445 (1994))。另外，其在量測抗體依賴型細胞毒性(ADCC)之分析中呈現顯著活性。

術語「人類化B-Ly1抗體」係指揭示於WO 2005/044859中之人類化B-Ly1抗體，其藉由與來自IgG1之人類恆定結構域嵌合及隨後人類化(參見WO 2005/044859)自鼠科動物單株抗-CD20抗體B-Ly1(鼠科動物重鏈可變區(VH)：SEQ ID NO: 1；鼠科動物輕鏈可變區(VL)：SEQ ID NO:2；參見Poppema, S.及Visser, L., Biotest Bulletin 3: 131-139 (1987))獲得。該等「人類化B-Ly1抗體」詳細揭示於WO 2005/044859中。

較佳地，「人類化B-Ly1抗體」具有選自SEQ ID No: 3至SEQ ID No: 20之群之重鏈可變區(VH)(WO 2005/044859之B-HH2至B-HH9及

B-HL8至B-HL17)。尤佳者係Seq. ID No. 3、4、7、9、11、13及15(WO 2005/044859之B-HH2、BHH-3、B-HH6、B-HH8、B-HL8、B-HL11及B-HL13)。最佳地，該VH係BHH6。較佳地，「人類化B-Ly1抗體」具有WO 2005/044859之SEQ ID No: 20之輕鏈可變區(VL) (B-KV1)。此外，人類化B-Ly1抗體較佳為IgG1抗體。較佳地，該等人類化B-Ly1抗體之Fc區按照闡述於WO 2005/044859、WO 2004/065540、Umana, P.等人，Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)及WO 99/154342中之程序實施糖改造(GE)。大多數經糖改造之人類化B-Ly1抗體之Fc區中之糖基化模式已經改變，較佳岩藻糖殘基含量降低。較佳地，Fc區之寡糖的至少40%或更多(在一個實施例中介於40%與60%之間，在另一實施例中至少50%，且在又一實施例中至少70%或更多)未經岩藻糖基化。此外，Fc區之寡糖較佳係平分型寡糖。最佳地，「人類化B-Ly1抗體」包含WO 2005/044859之VH B-HH6及VL B-KV1。如本文所用，該抗體亦稱作「HuMab<CD20>」。該抗體係以INN阿夫土珠(Afutuzumab)命名。在另一最佳實施例中，該抗體具有如上文所定義降低含量之岩藻糖殘基及/或Fc區之寡糖最佳係平分型寡糖。在又一最佳實施例中，該抗體展示增加之ADCC，如本文所定義。

寡糖組份能顯著影響與治療性糖蛋白之功效有關之特性，包括物理穩定性、蛋白酶攻擊抗性、與免疫系統之相互作用、藥物代謝動力學、及特異性生物活性。該等特性不僅取決於存在或不存在寡糖，且亦取決於寡糖之特定結構。在寡糖結構與糖蛋白功能之間可得到一些結論。舉例而言，某些寡糖結構經由與特定碳水化合物結合蛋白之相互作用來調介快速清除血流中之糖蛋白，而另一些則與抗體結合並引發不期望之免疫反應。(Jenkins等人，Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996))。

由於哺乳動物細胞能夠以對於人類應用最相容之形式使蛋白質糖

基化，故其係用於產生治療性糖蛋白之較佳宿主。(Cumming等人，*Glycobiology* 1:115-30 (1991)；Jenkins等人，*Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996))。細菌很少使蛋白質糖基化，且與諸如酵母、絲狀真菌、昆蟲及植物細胞等其他類型一般宿主一樣，所產生之糖基化模式與自血流中快速清除、不期望之免疫相互作用、及在一些特定情形下生物活性降低有關。在哺乳動物細胞中，在過去二十年中中國倉鼠卵巢(CHO)細胞使用最為普遍。除給出適宜糖基化模式外，該等細胞亦容許一致產生遺傳學上穩定的高產純系細胞系。可在簡單生物反應器中使用無血清培養基將其培養至較高密度，且允許實施安全且可重現之生物過程。其他常用動物細胞包括幼倉鼠腎(BHK)細胞、NS0-及SP2/0-小鼠骨髓瘤細胞。最近，亦對自轉基因動物之產生進行測試。(Jenkins等人，*Nature Biotechnol.* 14: 975-981 (1996))。

所有抗體皆在重鏈恆定區中之保守位置上含有碳水化合物結構，且每一同種型具有不同的N-連接碳水化合物結構陣列，其不同地影響蛋白質組裝、分泌或功能活性(Wright, A.及Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997))。端視處理程度而定，附接之N-連接碳水化合物的結構差異相當大，且可包括高甘露糖、多具支鏈以及雙觸角複雜寡糖。通常，在特定糖基化位點上附接之核心寡糖結構的處理不同，因此即使單株抗體亦以多種糖形存在。同樣，已顯示抗體糖基化之主要差異發生在細胞系之間，且甚至對於在不同培養條件下生長之給定細胞系亦可發現微小差異(Lifely, M. R.等人，*Glycobiology* 5(8):813-22 (1995))。

一種獲得效能之較大增加同時維持簡單產生過程且潛在地避免顯著不期望副作用之方式係如Umana, P.等人，*Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)及美國專利第6,602,684號中所述藉由對單株抗體之寡糖組份實施改造來增強該等單株抗體之天然、細胞調介之效應子功

能。IgG1型抗體為在癌症免疫療法中最為常用之抗體，其係在每一CH2結構域中之Asn297上具有保守N-連接糖基化位點之糖蛋白。與Asn297附接之兩種複雜雙觸角寡糖隱藏於CH2結構域之間，與多肽骨架形成廣泛接觸，且其存在為抗體調介諸如抗體依賴性細胞毒性(ADCC)等效應子功能所必需(Lifely, M. R.等人，*Glycobiology* 5: 813-822 (1995)；Jefferis, R.等人，*Immunol. Rev.* 163: 59-76 (1998)；Wright, A.及Morrison, S. L.，*Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997))。

先前已顯示， $\beta(1,4)$ -N-乙醯基葡糖胺轉移酶III (GnTIII)在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中過表現會顯著增加由經改造CHO細胞所產生之抗神經母細胞瘤嵌合單株抗體(chCE7)之活體外ADCC活性，該 $\beta(1,4)$ -N-乙醯基葡糖胺轉移酶III (GnTIII)係催化形成平分型寡糖之糖基轉移酶。(參見Umaña, P.等人，*Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)；及WO 99/154342，其全部內容以引用方式併入本文中)。抗體chCE7屬於非偶聯單株抗體大類，其具有高腫瘤親和力及特異性，但當在缺少GnTIII酶之標準工業細胞系中產生時其效能太低以致無法臨床使用(Umaña, P.等人，*Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999))。該研究最早顯示ADCC活性之較大增加可藉由對產生抗體之細胞實施改造以表現GnTIII來達成，此亦導致與恆定區(Fc)比例有關之平分型寡糖部分(包括平分型非岩藻糖基化寡糖)增加至超過天然存在抗體中所發現之含量。

術語「表現CD20」抗原意欲表示CD20抗原在細胞中以顯著程度表現，較佳在分別來自腫瘤或癌症(較佳為非實體腫瘤)之B-細胞、更佳B-細胞之表面上。患有「表現CD20之癌症」之患者可藉由熟習此項技術者所習知之標準分析來確定。「表現CD20」抗原亦較佳意欲表示CD20抗原在細胞中以顯著程度表現，較佳在自身免疫疾病中之B-細胞、更佳B-細胞之表面上。CD20抗原表現係使用(例如)免疫組織化

學(IHC)檢測、FACS或經由對應mRNA之基於PCR的檢測來量測。

較佳地，本文所用之術語「表現CD20之癌症」係指淋巴瘤(較佳為B-細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL))及淋巴細胞性白血病。該等淋巴瘤及淋巴細胞性白血病包括：例如，(a)濾泡淋巴瘤；(b)小無裂細胞淋巴瘤/伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)(包括地方性伯基特淋巴瘤、偶發性伯基特淋巴瘤及非伯基特淋巴瘤)；(c)邊緣帶淋巴瘤(包括結節外邊緣帶B細胞淋巴瘤(黏膜相關淋巴樣組織淋巴瘤，MALT)、結節邊緣帶B細胞淋巴瘤及脾臟邊緣帶淋巴瘤)；(d)外套細胞淋巴瘤(MCL)；(e)大細胞淋巴瘤(包括B-細胞彌漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、彌漫性混合細胞淋巴瘤、免疫母細胞性淋巴瘤、原發性縱隔B細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤-肺B-細胞淋巴瘤)；(f)多毛細胞白血病；(g)淋巴細胞性淋巴瘤、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症(waldenstrom's macroglobulinemia)；(h)急性淋巴細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、B-細胞早幼淋巴細胞性白血病；(i)漿細胞贅瘤、漿細胞性骨髓瘤、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤及(j)霍奇金氏病。

較佳地，該表現CD20之癌症係B-細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)。表現CD20之癌症的其他實例包括：外套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、B-細胞彌漫性大細胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特淋巴瘤、多毛細胞白血病、濾泡淋巴瘤、多發性骨髓瘤、邊緣帶淋巴瘤、移植後淋巴增殖性病變(PTLD)、HIV伴發之淋巴瘤、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症、或原發性CNS淋巴瘤。

本文所用「自身免疫疾病」係關於源於且針對個體之自身組織的疾病或病症。自身免疫疾病或病症之實例包括(但不限於)關節炎(類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、骨關節炎、乾癬性關節炎)、

乾癬、皮炎、多發性肌炎/皮肌炎、中毒性表皮壞死鬆解症、全身性硬皮病及硬化、與炎症性腸病有關之反應、克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、呼吸窘迫症候群、成人呼吸窘迫症候群(ARDS)、腦膜炎、腦炎、眼葡萄膜炎、結腸炎、腎小球腎炎、過敏病況、濕疹、哮喘、涉及T細胞浸潤及慢性炎症性反應之病況、動脈粥樣硬化、自身免疫心肌炎、白細胞黏附缺陷病、全身性紅斑狼瘡(SLE)、幼年發病型糖尿病、多發性硬化、變應性腦脊髓炎、與由細胞因子及T-淋巴細胞調介之急性及延遲性超敏反應有關的免疫應答、結核病、結節病、肉芽腫病(包括韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis))、粒性白血球缺乏症、血管炎(包括ANCA)、再生障礙性貧血、戴-布二氏貧血(Diamond Blackfan anemia)、免疫性溶血性貧血(包括自身免疫性溶血性貧血(AIHA))、惡性貧血、單純紅細胞再生障礙(PRCA)、因子VIII缺乏症、血友病A、自身免疫性嗜中性白血球減少症、全血細胞減少症、白血球減少、涉及白血球滲出之疾病、中樞神經系統(CNS)炎症性病變、多器官損傷症候群、重症肌無力、抗原-抗體複合體調介之疾病、抗腎小球基底膜病、抗磷脂抗體症候群、變應性神經炎、白塞病(Bechet disease)、卡斯爾曼氏症候群(Castleman's syndrome)、古德帕斯徹氏症候群(Goodpasture's syndrome)、蘭伯特肌無力症候群(lambert-eaton myasthenic syndrome)、雷諾氏症候群(Reynaud's syndrome)、薛格連氏症候群(Sjorgen's syndrome)、史蒂文斯-約翰遜症候群(Stevens Johnson syndrome)、大疱性類天皰瘡、天皰瘡、自身免疫性多發性內分泌病、腎病、IgM多發性神經病或IgM調介之神經病、特發性血小板減少性紫癜(ITP)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、自身免疫性血小板減少症、睪丸及卵巢之自身免疫疾病(包括自身免疫性睪丸炎及卵巢炎)、原發性甲狀腺機能減退；自身免疫性內分泌疾病，包括自身免

疫性甲狀腺炎、慢性甲狀腺炎(橋本甲狀腺炎(Hashimoto's Thyroiditis))、亞急性甲狀腺炎、特發性甲狀腺機能減退、阿狄森氏病(Addison's disease)、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、自身免疫性多腺症候群(或多腺內分泌病症候群)、I型糖尿病(亦稱作胰島素依賴性糖尿病(IDDM))及席漢症候群(Sheehan's syndrome)；自身免疫性肝炎、淋巴樣間質性肺炎(HIV)、閉塞性細支氣管炎(非移植)對NSIP、基蘭-巴瑞德症候群(Guillain-Barre syndrome)、大血管炎(包括風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))關節炎)、中血管炎(包括川崎病(Kawasaki's disease)及結節性多動脈炎)、強直性脊柱炎、貝格爾氏病(Berger's disease)(IgA腎病)、急進性腎小球性腎炎、原發性膽汁性肝硬化、口炎性腹瀉(麩質腸病)、冷球蛋白血症、肌萎縮性脊髓側索硬化症(ALS)、冠狀動脈疾病等。

本文所用之「生長抑制劑」係指抑制活體外及/或活體內細胞(尤其是表現CD20之癌細胞)生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低處於S期之表現CD20之細胞之百分比者。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進展(在除S期之外的時刻)之藥劑，例如可誘導G1阻滯及M期阻滯的藥劑。傳統M期阻斷劑包括長春花提取物(長春新鹼(vincristine)及長春花鹼(vinblastine))、紫杉烷及拓撲異構酶II抑制劑，例如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、依託泊苷(etoposide)及博萊黴素(bleomycin)。阻滯G1之彼等藥劑亦可阻滯S期，例如，DNA烷基化劑，例如他莫昔芬(tamoxifen)、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪(dacarbazine)、雙氯乙基甲胺(dacarbazine)、順鉑、胺甲蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)及ara-C。更多資訊可參見「The Molecular Basis of Cancer」(Mendelsohn及Israel編輯，第1章，標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」，Murakami等人(WB

Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其第13頁。

「治療」係指治療性治療及預防性(prophylactic或preventative)措施二者。需要治療之彼等包括已患有疾病之彼等以及其中需預防疾病之彼等。因此，本文擬治療之患者可已經診斷患有該疾病或具有患該疾病之傾向或易患該疾病。

本文所用之術語「細胞毒性劑」係指可抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²及Lu之放射性同位素)、化學治療劑及毒素，例如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之具有酶促活性之毒素，包括其片段及/或變體。

「化學治療劑」係可用於治療癌症之化學化合物。化學治療劑之實例包括烷基化試劑，例如，塞替派(thiotepa)及環磷醯胺(CYTOXAN™)；烷基磺酸鹽，例如，白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶類，例如苯得哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米得哌(meturedopa)及烏得哌(uredopa)；伸乙基亞胺類及甲基嘧胺類，包括六甲嘧胺、三伸乙基嘧胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫化磷醯胺及三羥甲基嘧胺；番荔枝內酯類(acetogenin)(尤其係布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol)，MARENOL™)； β -拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicines)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN™)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR™)、乙醯基喜樹鹼、東莨菪內酯(scopolectin)、及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑制素(bryostatin)；卡利抑制素(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似

物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；克利特非辛(cryptophycin)(尤其係克利特非辛1及克利特非辛8)；多拉司他汀(dolastatin)；多卡米星(duocarmycin)(包括合成類似物：KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；盤洛司他汀(pancratistatin)；薩可迪汀(sarcodictyin)；海綿素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、雙氯乙基甲胺、鹽酸氧氮芥、美法倉(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥膽甾醇酯(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，例如烯二炔抗生素(例如，卡奇黴素(calicheamicin)，尤其係卡奇黴素 γ 11及卡奇黴素 ω 11(參見，例如，Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新製癌菌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、安麩黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素、放線菌素C (cactinomycin)、卡拉黴素(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、更生黴素(dactinomycin)、柔紅黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星(包括ADRIAMYCIN™、嗎啉基-多柔比星、氰嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星、脂質體注射HCl多柔比星(DOXIL™)、脂質體多柔比星TLC D-99 (MYOCET™)、聚乙二醇化脂質體多柔比星(CAELYX™)及

去氧多柔比星)、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(例如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、普非洛黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，例如胺甲喋呤、吉西他濱(gemcitabine) (GEMZAR™)、替加氟(tegafur) (UFTORAL™)、卡培他濱(capecitabine) (XELODA™)、埃坡黴素(epothilone)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，例如二甲葉酸(denopterin)、胺甲喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，例如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，例如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；抗腎上腺素，例如胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，例如伏洛林尼酸(frolinic acid)；乙醯葡醛酸內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；雌二醇-苯丁酸氮芥複合物(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziquone)；伊爾福尼辛(eflornithine)；依利乙鉍(elliptinium acetate)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；蘑菇多糖

(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，例如美登素(maytansine)及柄型菌素(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidamol)；尼群克林(nitraerine)；噴托他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSKL™多糖複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；螺旋鍺(spirogermanium)；細格孢氮雜酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯族毒素類(trichothecenes)(尤其係T-2毒素、疣孢菌素A(verrucarin A)、杆孢菌素(roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；烏拉坦(urethane)；達卡巴嗪；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；噶薩托辛(gacytosine)；阿糖胞苷(arabinoside) (「Ara-C」)；塞替派；紫杉烷類，例如紫杉醇(paclitaxel) (TAXOL™)、白蛋白調控之紫杉醇奈米顆粒調配物(ABRAXANE™)、及多西他賽(docetaxel) (TAXOTERE™)；苯丁酸氮芥；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；胺甲喋呤；鉑試劑，例如順鉑、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花提取物，其阻止微管蛋白聚合形成微管，其包括長春花鹼(VELBAN™)、長春新鹼(ONCOVIN™)、長春地辛(vindesine) (ELDISINE™)、FILDESIN™、及長春瑞濱(vinorelbine) (NAVELBINE™))；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；爾可福鈣(leucovorin)；諾安托(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素(daunomycin)；胺基蝶呤(aminopterin)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine) (DMFO)；類視色素，例如視黃酸，包括貝沙羅汀(bexarotene) (TARGRETIN™)；雙膦

酸鹽類，例如氯膦酸鹽(clodronate)(例如，BONEFOS™或OSTAC™)、依替膦酸(etidronate) (DIDROCAL™)、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/ 唑來膦酸鹽(ZOMETA™)、阿倫膦酸鹽(alendronate)(FOSAMAJX™)、帕米膦酸鹽(pamidronate)(AREDIA™)、替魯膦酸鹽(tiludronate) (SKELID™)、或利塞膦酸鹽(risedronate) (ACTONEL™)；曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其彼等抑制與貼壁細胞增殖有關之信號傳導途徑中之基因(例如，PKC- α 、Ralf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R))的表現者；疫苗，例如THERATOPE™疫苗及基因療法疫苗，例如，ALLOVECTIN™疫苗、LEUVECTIN™疫苗及VAXID™疫苗；拓撲異構酶1抑制劑(例如，LURTOTECAN™)；rmRH(例如，ABARELIX™)；BAY439006(索拉非尼(sorafenib)；Bayer)；SU-11248 (Pfizer)；哌立福辛(perifosine)、COX-2抑制劑(例如，塞來考昔(celecoxib)或依託考昔(etoricoxib))、蛋白體抑制劑(例如，PS341)；波替單抗(bortezomib) (VELCADE™)；CCI-779；替匹法尼(tipifarnib) (R1 1577)；奧拉非尼(orafenib) ABT510；Bcl-2抑制劑，例如，奧利美生鈉(oblimersen sodium) (GENASENSE™)；匹善重(pixantrone)；EGFR抑制劑(參見下文定義)；酪胺酸激酶抑制劑(參見下文定義)；及任一上述之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物；以及上述兩者或更多者之組合，例如CHOP(其為環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼、及潑尼松龍(prednisolone)(視情況進一步包含干擾素- γ (CHVP/干擾素- γ))之組合療法的縮寫)、FOLFOX(其為利用奧沙利鉑(ELOXATIN™)以及5-FU及爾可福鈣之治療方案的縮寫)、CVP(環磷醯胺、長春新鹼及潑尼松龍)、MCP(米托蒽醌、苯丁酸氮芥及潑尼松龍)、FC(氟達拉濱及環磷醯胺)、ICE(異環磷醯胺、卡鉑及依託泊苷)、及地塞米松(dexamethasone)、阿糖胞苷及順鉑(DHAP)、地塞米

松、多柔比星脂質體、及長春新鹼(DVD)等。

「抗血管新生劑」係指在一定程度上阻斷、或干擾血管形成之化合物。抗血管新生因子可為(例如)結合涉及促進血管新生之生長因子或生長因子受體的小分子或抗體。本文之較佳抗血管新生因子係結合血管內皮生長因子(VEGF)之抗體，例如貝伐單抗(AVASTIN™)。

術語「細胞因子」係由一種細胞群釋放之可作為細胞內調節劑作用於另一種細胞之蛋白質的通稱。該等細胞因子之實例係淋巴因子、單核因子及傳統多肽激素。該等細胞因子包括生長激素，例如人類生長激素、N-甲硫胺醯基人類生長激素及牛科動物生長激素；甲狀旁腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；糖蛋白激素，例如促卵泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及促黃體激素(LH)；肝細胞生長因子；成纖維細胞生長因子；催乳素；胎盤催乳激素；腫瘤壞死因子 α 及 β ；繆勒管(mullerian)抑制物質；小鼠促性腺激素關聯肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素；血小板生成素(TPO)；神經生長因子，例如NGF- β ；血小板生長因子；轉化生長因子(TGF)，例如TGF- α 及TGF- β ；胰島素樣生長因子-I及胰島素樣生長因子-II；紅細胞生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素，例如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；集落刺激因子(CSF)，例如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；粒細胞-巨噬細胞-CSF (GM-CSF)；及粒細胞-CSF (G-CSF)；介白素(IL)，例如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；腫瘤壞死因子，例如TNF- α 或TNF- β ；及其他多肽因子，包括LIF及kit配體(KL)。本文所用之術語細胞因子包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質及天然序列細胞因子之生物活性等效物。

術語「有效量」係指提供期望效應之量。在本發明之調配物成份(例如透明質酸酶)之情形下，有效量係增大共投與之抗-CD20抗體之

分散及吸收以使抗-CD20抗體可以上文所概述治療有效方式起作用所需之量。在醫藥藥物物質情形下，其係可有效治療患者之疾病之活性成份的量。若疾病為癌症，則藥物之有效量應可減少癌細胞數量；縮減腫瘤大小；抑制(即，在一定程度上減緩且較佳終止)癌細胞滲入周圍器官中；抑制(即，在一定程度上減緩且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕一或多種與癌症相關之症狀。在此意義上，藥物可阻止現存癌細胞生長及/或殺死現存癌細胞，其可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。有效量可延長無進展存活期、產生客觀應答(包括部分應答PR、或完全應答CR)、增加總體存活時間、及/或改善一或多種癌症症狀。

術語「醫藥調配物」係指呈可使活性成份之生物活性有效之形式、且不含對調配物所投與之個體具有不可接受毒性之額外組份的製品。該等調配物係無菌的。

「無菌」調配物係無菌的或無所有活的微生物及其孢子。

「穩定」調配物係在預期儲存溫度(例如，2°C至8°C)下儲存時其中之所有蛋白質基本上保留其物理穩定性及/或化學穩定性及/或生物活性者。較佳地，在儲存時調配物基本上保留其物理及化學穩定性、以及其生物活性。通常根據調配物之預期存架壽命選擇儲存期。此外，調配物較佳在調配物冷凍(例如，至-20°C)及解凍後(例如，一或多個冷凍及解凍循環後)穩定。業內可使用量測蛋白質穩定性之各種分析技術且其可參見(例如)Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee編輯，Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991)及Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)。可在選定溫度下量測穩定性達選定時間段。可以各種不同方式定性及/或定量地評價穩定性，包括聚集形成之評價(例如，使用尺寸排除層析、藉由量測渾濁度及/或藉由目視檢查)；藉由使用陽離子交換層析或毛細

管區帶電泳評定電荷異質性；比較減少及完整抗體之SDS-PAGE分析；評價抗體之生物活性或抗原結合功能等。不穩定性可涉及以下之任一或多者：聚集、脫醯胺(例如，Asn脫醯胺)、氧化(例如，Met氧化)、異構化(例如，Asp異構化)、剪切/水解/分裂(例如，鉸鏈區分裂)、琥珀醯亞胺形成、非成對半胱胺酸等。

藉由將具有期望純度之抗體與可選醫藥上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A.編輯(1980))混合來製備根據本發明使用之抗體的治療調配物以用於儲存，該等調配物呈凍乾調配物或水性溶液形式。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒性。

本文所用術語「表面活性劑」代表醫藥上可接受之表面活性劑。在本發明之調配物中，表面活性劑之量闡述為以重量/體積表示之百分數。最經常使用之重量/體積單位係mg/mL。醫藥上可接受之表面活性劑之適宜實例包括聚氧乙烯-山梨醇酐脂肪酸酯(吐溫(Tween))、聚氧乙烯-聚丙二醇、聚氧乙烯-硬脂酸酯、聚氧乙烯烷基醚(例如，聚氧乙烯單月桂基醚)、烷基苯基聚氧乙烯醚(曲拉通(Triton)-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆(Poloxamer)，Pluronic)、及十二烷基硫酸鈉(SDS)。最適宜之聚氧乙烯山梨醇酐-脂肪酸酯係聚山梨醇酯20(以商標吐溫20™出售)及聚山梨醇酯80(以商標吐溫80™出售)。最適宜之聚乙二醇-聚丙二醇共聚物係彼等以商品名Pluronic® F68或Poloxamer 188™出售者。較佳聚氧乙烯-硬脂酸酯係彼等以商標Myrj™出售者。最適宜聚氧乙烯烷基醚係彼等以商標Brij™出售者。最適宜烷基酚聚氧乙烯醚係以商品名Triton-X出售。

本文所用術語「緩衝液」代表醫藥上可接受之緩衝液。本文所用術語「提供 5.5 ± 2.0 之pH之緩衝劑」係指藉由其酸/鹼共軛組份之作用使包含其之溶液抵抗pH變化的試劑。本發明適宜之醫藥上可接受之

緩衝液包含(但不限於)組胺酸緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、葡萄糖酸鹽緩衝液、琥珀酸鹽緩衝液、乙酸鹽緩衝液、甘氨酸甘氨酸及其他有機酸緩衝液、及磷酸鹽緩衝液。較佳緩衝液包含L-組胺酸或L-組胺酸與L-組胺酸鹽酸鹽與等滲性試劑之混合物，且可用業內已知之酸或鹼調節pH。最佳者係L-組胺酸。

「組胺酸緩衝液」係包含胺基酸組胺酸之緩衝液。組胺酸緩衝液之實例包括組胺酸氯化物、組胺酸乙酸鹽、組胺酸磷酸鹽、組胺酸硫酸鹽。發現本文實例中鑑別出之較佳組胺酸係組胺酸氯化物。在較佳實施例中，藉由用經稀釋鹽酸滴定L-組胺酸(游離鹼，固體)或藉由以界定量及比率溶解L-組胺酸及L-組胺酸鹽酸鹽(例如，呈單水合物形式)來製備組胺酸氯化物緩衝液。

所謂「等滲」意指所關注調配物具有基本上與人類血液相同之滲透壓。等滲性調配物通常具有~300 mOsm/kg之滲透壓。可使用蒸氣壓力或凝固點降低型滲透計量測等滲性。

本文所用術語「等滲性試劑」代表醫藥上可接受之等滲性試劑。等滲性試劑用於提供等滲性調配物。等滲性調配物係液體或自固體形式(例如，凍乾形式)重構之液體，並代表具有與和其相比較之某些其他溶液(例如生理鹽溶液及血清)相同等滲性之溶液。適宜等滲性試劑包含(但不限於)鹽(包括但不限於氯化鈉(NaCl)或氯化鉀)、糖及糖醇(包括但不限於葡萄糖、蔗糖、海藻糖、或丙三醇)、及胺基酸、糖、鹽及其組合之群之任一組份。等滲性試劑通常以介於約5 mM至約350 mM之總量使用。

本文中與本發明調配物一起使用之術語「液體」代表在至少約2°C至約8°C之溫度下為液體之調配物。

本文中與本發明調配物一起使用之術語「凍乾」代表藉由任何業內已知之冷凍-乾燥方法(例如市售冷凍-乾燥裝置)冷凍調配物並隨後

自冷凍內容物中使冰昇華而乾燥之調配物。

本文所用術語「鹽」代表含量約1 mM至約500 mM之鹽。鹽之非限制性實例包括陽離子鈉、鉀、鈣或鎂與陰離子氯離子、磷酸根、檸檬酸根、琥珀酸根、硫酸根或其混合物之任一組合的鹽。

本文所用術語「胺基酸」代表含量介於約1 mg/mL至約100 mg/mL之胺基酸，其包含(但不限於)精胺酸、甘胺酸、鳥胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、離胺酸、組胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、異白胺酸、白胺酸、丙胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、絲胺酸及脯胺酸。

本文之「糖類」包含一般組成 $(CH_2O)_n$ 及其衍生物，其包括單糖、雙糖、三糖、多醣、糖醇、還原糖、非還原糖等。本文糖類實例包括葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麥芽糖、葡聚糖、甘油、葡聚糖、赤蘚糖醇、丙三醇、阿糖醇、木糖醇、山梨醇、甘露醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水蘇糖、麥芽糖、乳果糖、麥芽酮糖、葡糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇(lactitol)、異麥芽酮糖等。本發明定義中亦包括葡萄糖胺、N-甲基葡萄糖胺(所謂「葡甲胺(Meglumine)」)、半乳糖胺及神經胺酸及本發明糖類之組合。本文中之較佳糖類係非還原雙糖，例如海藻糖或蔗糖。本發明之最佳糖類係海藻糖。

術語「穩定劑」係指醫藥上可接受之穩定劑，例如(但不限於)上文部分中所述之胺基酸及糖，及業內已知之任何種類及分子量之市售葡聚糖。

術語「抗氧化劑」代表醫藥上可接受之抗氧化劑。此可包括賦形劑，例如，甲硫胺酸、苯甲醇或用於降低氧化至最小程度之任一其他賦形劑。

當應用至(例如)癌症時，術語「治療方法」或其等效物係指作用

程序或過程，其設計在於減少或消除患者中癌細胞之數量或減輕癌症之症狀。癌症或另一增殖性病症之「治療方法」並不一定指實際上消除癌細胞或其他病症、實際上減少細胞數量或病症、或實際上減輕癌症或其他病症之症狀。通常，即使癌症治療方法之成功可能性較低，但考慮到患者之病史及估計之預測生存期，仍然認為該方法可誘導總體有益的作用過程。

因此，本發明欲解決之問題係提供醫藥活性抗-CD20抗體或該等抗體分子之混合物之新穎高濃縮之穩定醫藥調配物，其用於皮下注射。除高量抗-CD20抗體或其混合物外，該等調配物亦包含緩衝劑、穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物、非離子型表面活性劑及較佳有效量之至少一種透明質酸酶。高濃縮抗體調配物之製備極具挑戰性，此乃因於較高蛋白濃度下黏度會潛在增大且蛋白質聚集(本身依賴於濃度之現象)會潛在增加。高黏度會負面地影響抗體調配物之處理能力(例如，泵送及過濾步驟)及投與(例如，注射能力)。在一些情形下可藉由添加賦形劑降低高黏度。蛋白質聚集之控制及分析係日益增大之挑戰。在製造過程之各個步驟(包括發酵、純化、調配)期間及儲存期間潛在發生聚集。諸如溫度、蛋白濃度、攪拌應力、冷凍及解凍、溶劑及表面活性劑效應、及化學修飾等不同因素可影響治療蛋白之聚集行為。在高濃縮抗體調配物之形成期間，必須監控蛋白質之聚集趨勢並藉由添加不同賦形劑及表面活性劑對其進行控制[Kiese S.等人，J. Pharm. Sci., 2008; 97(10); 4347-4366]。

在第一態樣中，本發明提供用於非經腸施加之醫藥活性抗-CD20抗體或該等抗體分子之混合物的高濃縮之穩定醫藥調配物。較佳地，施加路徑係以濃注形式靜脈內投與或在一段時間內連續輸注、肌內、腹膜內、腦室脊柱內、皮下、關節內、滑膜內或鞘內路徑。抗體之靜脈內或皮下投與較佳；皮下注射最佳。如上文所述，產生基本上無顆

粒之CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物極為不易。若該調配物意欲皮下施加，則在一較佳實施例中，組合該調配物與透明質酸酶。

更具體而言，本發明之醫藥活性抗-CD20抗體調配物之高濃縮的穩定醫藥調配物包含：

- 約20 mg/ml至350 mg/ml抗-CD20抗體；

- 約1 mM至100 mM緩衝劑，其提供 5.5 ± 2.0 之pH；

- 約1 mM至500 mM穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物，其中視情況較佳以5 mM至25 mM之濃度使用甲硫胺酸作為次要穩定劑；

- 0.01%至0.1%非離子型表面活性劑；及

- 較佳地，有效量之至少一種透明質酸酶。

本發明之醫藥活性抗-CD20抗體調配物之高濃縮的穩定醫藥調配物可以液體形式提供或可以凍乾形式提供。重構調配物中之抗體濃度可藉由對凍乾調配物進行重構以在重構調配物中提供比凍乾步驟之前之混合物中之蛋白濃度大約2至40倍的蛋白濃度來增大。

較佳之抗-CD20抗體濃度係50 mg/ml至150 mg/ml，更佳係75 mg/ml至150 mg/ml，甚至更佳係 120 ± 20 mg/ml，最佳係約120 mg/ml。

較佳之緩衝劑濃度係1 mM至50 mM、更佳10 mM至30 mM；最佳濃度係約20 mM。各種緩衝劑已為彼等熟習此項技術者所知，如上文所概述。較佳之緩衝劑係選自由組胺酸緩衝液、乙酸緩衝液及檸檬酸緩衝液組成之群，最佳係L-組胺酸/HCl緩衝液。本發明之組胺酸緩衝液之使用量係約1 mM至約50 mM，較佳約10 mM至約30 mM且仍更佳為約20 mM。本發明之乙酸緩衝液較佳係約10 mM至約30 mM且最佳約20 mM。本發明之檸檬酸緩衝液較佳係約10 mM至約30 mM且最佳約20 mM。

獨立於所用緩衝液，將pH調節於以下值：包含約4.5至約7.0且較

佳約5.5至約6.5，亦較佳選自由5.5、6.0、6.1及6.5組成之群。此pH可藉由用業內已知之酸或鹼調節或藉由使用緩衝液組份之適當混合物或二者獲得。

穩定劑(在本專利說明中與術語「穩定試劑」同義地使用)較佳係選自由鹽、碳水化合物、糖類及胺基酸組成之群，更佳為碳水化合物或糖，更佳為由權威機構接納之糖作為醫藥調配物中之適宜添加劑或賦形劑，最佳選自由 α,α -海藻糖二水合物、NaCl及甲硫胺酸組成之群。穩定劑之較佳濃度係15 mM至250 mM、或更佳150 mM至250 mM。最佳者係約210 mM之濃度。調配物可含有次要穩定劑，其中此次要穩定劑較佳係濃度較佳為5 mM至25 mM、濃度更佳為5 mM至15 mM之甲硫胺酸。最佳之甲硫胺酸濃度係約10 mM。

非離子型表面活性劑較佳係聚山梨醇酯，更佳係選自聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80及聚乙烯-聚丙烯共聚物之群。非離子型表面活性劑之濃度係0.01-0.1% (w/v)、或0.02-0.08% (w/v)且較佳0.02-0.06% (w/v)、最佳約0.06% (w/v)。

本文所用術語「糖」代表以約25 mM至約500 mM之量使用之醫藥上可接受之糖。較佳者係100 mM至300 mM。更佳者係180 mM至240 mM。最佳者係210 mM。

透明質酸酶之濃度取決於根據本發明之調配物製備中所用實際透明質酸酶。熟習此項技術者可基於下文進一步揭示內容容易地測定透明質酸酶之有效量。其應以足夠量提供以使可增大共投與之抗-CD20抗體的分散及吸收。透明質酸酶之有效量較佳係約1'000 U/ml至16'000 U/ml，其中基於100'000 U/mg之假定比活性，該量對應於約0.01 mg至0.15 mg蛋白質。透明質酸酶之較佳濃度係約1'500 U/ml至12'000 U/ml。最佳者係約2'000 U/ml或約12'000 U/ml之濃度。本文上述指定量對應於初始添加於調配物中之透明質酸酶之量。透明質酸酶

係以組合最終調配物形式或用於共投與(例如，以共調配物形式)存在，如下文進一步概述。所主張調配物之重要問題係在其準備好使用及/或注射時，其具有所主張組成。

透明質酸酶可源自動物、人類試樣或基於重組DNA技術製造，如下文進一步闡述。

更具體而言，本發明之高濃縮的穩定醫藥調配物具有以下較佳組成中之一者：

a) 100 mg/ml至150 mg/ml抗-CD20抗體，其中此抗體較佳係利妥昔單抗、奧瑞珠單抗或HuMab<CD20>；1 mM至50 mM組胺酸緩衝液，較佳L-組胺酸/HCl，於約5.5之pH下；15 mM至250 mM穩定劑(其較佳為 α,α -海藻糖二水合物)、及視情況濃度為5 mM至25 mM之甲硫胺酸作為第二穩定劑；非離子型表面活性劑，其選自聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80之群，較佳為0.02-0.06% (w/v)；及視情況1'000 U/ml至16'000 U/ml透明質酸酶，較佳rHuPH20，最佳在2'000 U/ml或12'000 U/ml之濃度下。

b) 120 $\pm$ 20 mg/ml抗-CD20抗體，其中此抗體較佳係利妥昔單抗、奧瑞珠單抗或HuMab<CD20>；10 mM至30 mM，較佳20 mM組胺酸緩衝液，較佳L-組胺酸/HCl，於約5.5之pH下；150 mM至250 mM，較佳210 mM穩定劑(其較佳為 α,α -海藻糖二水合物)、及視情況濃度為5 mM至25 mM，較佳5 mM至15 mM、最佳10 mM之甲硫胺酸作為第二穩定劑；非離子型表面活性劑，其選自聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80之群，較佳為0.02-0.06% (w/v)；及視情況1'000 U/ml至16'000 U/ml，較佳1'500 U/ml至12'000 U/ml、最佳2'000 U/ml或12'000 U/ml透明質酸酶，較佳rHuPH20。

c) 120 mg/ml抗-CD20抗體，其中此抗體較佳係利妥昔單抗、奧瑞珠單抗或HuMab<CD20>；10 mM至30 mM，較佳20 mM組胺酸緩衝

液，較佳L-組胺酸/HCl，於約5.5之pH下；150 mM至250 mM，較佳210 mM穩定劑(其較佳為 α,α -海藻糖二水合物)、及視情況濃度為5 mM至25 mM，較佳5 mM至15 mM、最佳10 mM之甲硫胺酸作為第二穩定劑；非離子型表面活性劑，其選自聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80之群，較佳為0.02-0.06% (w/v)；及視情況1'000 U/ml至16'000 U/ml，較佳1'500 U/ml至12'000 U/ml、最佳2'000 U/ml或12'000 U/ml透明質酸酶，較佳rHuPH20。

d) 120 mg/ml抗-CD20抗體，較佳利妥昔單抗；20 mM組胺酸緩衝液，較佳L-組胺酸/HCl，於約5.5之pH下；210 mM α,α -海藻糖二水合物及視情況作為第二穩定劑之10 mM甲硫胺酸；非離子型表面活性劑，其選自聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80之群，較佳0.02-0.06% (w/v)；及視情況2'000 U/ml或12'000 U/ml透明質酸酶，較佳rHuPH20。

e)凍乾調配物，其包含120 mg/ml抗-CD20抗體，較佳利妥昔單抗；20 mM組胺酸緩衝液，較佳L-組胺酸/HCl，於約5.5之pH下；210 mM α,α -海藻糖二水合物及視情況作為第二穩定劑之10 mM甲硫胺酸；非離子型表面活性劑，其選自聚山梨醇酯20及聚山梨醇酯80之群，較佳0.02-0.06% (w/v)；及視情況2'000 U/ml或12'000 U/ml透明質酸酶，較佳rHuPH20。

提供包含以下物質之醫藥活性抗-CD20抗體之穩定醫藥調配物：約30 mg/ml至350 mg/ml、例如約30 mg/ml至100 mg/ml(包括約30 mg/ml、約50 mg/ml或約100 mg/ml)奧瑞珠單抗(例如，人類化2H7.v16)；約1 mM至100 mM緩衝劑(例如，乙酸鈉)，其提供 5.5 ± 2.0 之pH(例如，pH 5.3)；約15 mM至250 mM穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物(包括海藻糖，例如，約8%海藻糖二水合物)；約0.01-0.1% (w/v)非離子型表面活性劑；及視情況有效量之至少一種透明質

酸酶(例如，rhHUPH20)，較佳量為約1,500 U/ml至約12,000 U/ml。

實例中給出較佳調配物之替代組合物。

已提出可藉由使用少量可溶性透明質酸酶糖蛋白(sHASEGP)有利於治療蛋白及抗體之皮下注射；參見WO 2006/091871。已顯示添加該等可溶性透明質酸酶糖蛋白(以組合調配物形式或藉由共投與)可有利於治療藥物向皮下投與。藉由快速解聚細胞外空間中之透明質酸HA，sHASEGP可降低間質之黏度，藉此增大導水率並提供可安全並舒適地向皮下組織中投與之較大體積。藉由sHASEGP經由減小之間質黏度誘發之增大的導水率提供更大分散，此潛在地增大SC投與之治療藥物的全身生物利用度。

因此，包含可溶性透明質酸酶糖蛋白之本發明之高濃縮的穩定醫藥調配物特別適於皮下注射。熟習此項技術者明確瞭解，包含抗-CD20抗體及可溶性透明質酸酶糖蛋白之該調配物可提供用於以一單一組合調配物形式或另一選擇為以可在即將皮下注射之前混合之兩種單獨調配物形式投與。或者，抗-CD20抗體及可溶性透明質酸酶糖蛋白可以單獨注射形式在身體之不同位點，較佳在彼此直接相鄰之位點處投與。亦可以連續注射形式注射本發明調配物中存在之治療劑，例如，首先注射可溶性透明質酸酶糖蛋白、之後注射抗-CD20抗體調配物。該等注射亦可以逆轉次序，即，藉由首先注射抗-CD20抗體調配物、之後注射可溶性透明質酸酶糖蛋白來實施。在抗-CD20抗體及可溶性透明質酸酶糖蛋白係以單獨注射形式投與之情形下，蛋白質中之一者或兩者必須與隨附申請專利範圍中所指示濃度之緩衝劑、穩定劑及非離子型表面活性劑一起提供，但不包括透明質酸酶。隨後透明質酸酶可提供於(例如)L-組胺酸/HCl緩衝液(pH為約6.5)、100 mM至150 mM NaCl及0.01 -0.1% (w/v)聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80中。在一較佳實施例中，抗-CD20抗體係與隨附申請專利範圍中所指示濃度之緩

衝劑、穩定劑及非離子型表面活性劑一起提供。

如上所述，可將可溶性透明質酸酶糖蛋白視為抗-CD20調配物中之又一賦形劑。可在製造抗-CD20調配物時向抗-CD20調配物中添加可溶性透明質酸酶糖蛋白或可在即將注射之前添加。或者，可以單獨注射形式提供可溶性透明質酸酶糖蛋白。在後一情形下，可溶性透明質酸酶糖蛋白可在單獨小瓶中以凍乾形式提供，其必須在皮下注射之前用適宜稀釋劑重構；或可以液體調配物形式由製造商提供。抗-CD20調配物及可溶性透明質酸酶糖蛋白可以單獨整體形式獲得或亦可以包含注射組份及用於其皮下投與之適宜說明書二者的套組形式提供。亦可提供用於調配物之一者或二者之重構及/或投與的適宜說明書。

因此，本發明亦提供由以下組成之醫藥組合物：醫藥活性抗-CD20抗體或該抗體之混合物之高濃縮的穩定醫藥調配物及適宜量之至少一種透明質酸酶，其呈包含注射組份及用於其皮下投與之適宜說明書二者的套組形式。

本發明之又一態樣係關於包含本發明之高濃縮的穩定醫藥調配物的注射裝置。該調配物可由醫藥活性抗-CD20抗體或該等抗體分子之混合物及如下文所概述之適宜賦形劑組成且可額外包含呈組合調配物形式或呈用於共投與之單獨調配物形式的可溶性透明質酸酶糖蛋白。

業內已知各種抗-CD20抗體。該等抗體較佳係單株抗體。其可為所謂嵌合抗體、人類化抗體或完全人類抗體。其可為全長抗-CD20抗體、具有相同生物活性之抗-CD20抗體片段、包括胺基酸序列變體及/或該等抗體或片段之糖基化變體。人類化抗-CD20抗體之實例係以INN名稱利妥昔單抗、奧瑞珠單抗及阿夫土珠(HuMab<CD20>)為人所知。最成功之治療性抗-CD20抗體係由Genentech公司及F. Hoffmann-La Roche有限公司以商品名MABTHERA™或RITUXAN™出售之利妥

昔單抗。

本文所定義之抗-CD20抗體較佳係選自以下之群：利妥昔單抗(參見，例如，Anderson等人之美國專利第7,381,560號及EP2000149B1，參見，例如，圖4及5)、奧瑞珠單抗(如WO 2004/056312中所揭示)及WO 2006/084264 (例如，表1及2中所揭示變體)，較佳變體v.16或v.114或v.511及阿夫土珠(HuMab<CD20>；參見WO 2005/044859)。最佳之抗-CD20抗體係利妥昔單抗。術語「利妥昔單抗」、「奧瑞珠單抗」及「阿夫土珠」(HuMab<CD20>)涵蓋滿足獲得市場許可所需之要求的所有相應抗-CD20抗體，其作為選自由美國、歐洲及日本組成之國家之群之國家或地區中之相同或生物類似產物。利妥昔單抗具有美國專利第7,381,560號及EP2000149B1中所定義之CDR區。

大量可溶性透明質酸酶糖蛋白已為業內所知。為了進一步定義該等可溶性透明質酸酶糖蛋白之功能、作用機制及性質，提供以下背景資訊。

SC(皮下)間質基質由嵌入葡糖胺聚糖之黏彈性凝膠中的纖維蛋白質網絡構成。透明質酸(HA)(非硫酸化重複線性二糖)係SC組織之卓越葡糖胺聚糖。HA作為隨後經由溶酶體透明質酸酶及糖苷外切酶之作用在淋巴及肝中局部降解之高分子量兆道爾頓黏性聚合物藉由成纖維細胞分泌至間質中。體內之約50%透明質酸係由SC組織產生，其中發現其為約0.8 mg/gm濕重組織[Aukland K.及Reed R., 「Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume」, Physiology Reviews」, 1993; 73:1-78]。估計平均體重70 kg之成人含有15克HA，每天代謝回轉(合成並降解)其中之30%[Laurent L.B.等人, 「Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver」, Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703]。作為皮下基質之凝膠狀組份的主要成份，HA對其黏度具有顯著貢獻。

葡糖胺聚糖(GAG)係細胞外基質層(ECM)之複雜線性多糖。GAG之特徵在於N-經取代己糖胺及糖醛酸(在透明質酸(HA)、硫酸軟骨素(CS)、軟骨素(C)、硫酸皮膚素(DS)、硫酸乙醯肝素(HS)、及肝素(H)之情形下)、或半乳糖(在硫酸角質素(KS)之情形下)之重複二糖結構。除HA外，所有均以共價鍵結至核心蛋白形式存在。具有其核心蛋白之GAG在結構上稱作蛋白多糖(PG)。

主要在哺乳動物之結締組織、皮膚、軟骨及滑液中發現透明質酸(HA)。透明質酸亦係眼玻璃體之主要成份。在結締組織中，與透明質酸相關之水合之水在組織之間產生水合基質。透明質酸在與細胞運動相關之生物現象中起關鍵作用，該細胞運動包括快速發育、再生、修復、胚胎發生、胚胎發育、傷口癒合、血管發生及腫瘤發生[Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay(編輯), Plenum Press, New York, 1991；第1384-1386頁；Bertrand等人，Int. J. Cancer 1992；52:1-6；Knudson等人，FASEB J. 1993；7:1233-1241]。另外，透明質酸含量與腫瘤進攻性有關[Ozello等人，Cancer Res. 1960；20:600-604；Takeuchi等人，Cancer Res. 1976；36:2133-2139；Kimata等人，Cancer Res. 1983；43:1347-1354]。

在許多細胞之細胞外基質、尤其軟結締組織中發現HA。已(例如)在水及血漿蛋白內環境穩態中賦予HA各種生理功能[Laurent T.C.等人，FASEB J., 1992；6: 2397-2404]。HA之產生在增值細胞中增加且可在有絲分裂中起作用。其亦涉及移位及細胞遷移。HA似乎在細胞調控、發育及分化中起重要作用[Laurent等人，見上文]。

HA已廣泛用於臨床醫學。其組織保護及流變性質已證明可用於眼手術(例如，在白內障手術期間保護角膜內皮)。血清HA可診斷肝病及各種炎症性病況，例如類風濕性關節炎。由HA累積引發之間質水腫可造成各種器官之功能障礙[Laurent等人，見上文]。

細胞外基質或「基礎物(ground substance)」之結構亦涉及透明質酸蛋白相互作用。

透明質酸酶係在整個動物界中發現之一組通常為中性-或酸活性酶。透明質酸酶相對於受質特異性及作用機制而變化(WO 2004/078140)。有三種一般類別透明質酸酶：

1. 哺乳動物型透明質酸酶(EC 3.2.1.35)，其係具有作為主要終產物之四糖及六糖之內- β -N-乙醯基己糖胺酶。其具有水解及轉糖苷酶兩種活性，且可降解透明質酸及硫酸軟骨素(CS)(通常為C4-S及C6-S)。
2. 細菌透明質酸酶(EC 4.2.99.1)降解透明質酸且在不同程度上降解CS及DS。其係藉由主要產生二糖終產物之 β 消除反應運行的內- β -N-乙醯基己糖胺酶。
3. 來自水蛭、其他寄生蟲及甲殼類動物之透明質酸酶(EC 3.2.1.36)係經由 β 1-3連接之水解產生四糖及六糖終產物的內- β -葡萄糖苷酸酶。

哺乳動物透明質酸酶可進一步分成兩組：天然活性及酸活性酶。人類基因組中有六種透明質酸酶樣基因：HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、HYALP1及PH20/ SPAM1。HYALP1係假基因，且HYAL3未顯示對任何已知受質具有酶活性。HYAL4係軟骨素酶且對透明質酸呈現較小活性。HYAL1係典型酸活性酶且PH20係典型中性活性酶。諸如HYAL1及HYAL2等酸活性透明質酸酶在中性pH(即pH 7)下通常缺乏催化活性。舉例而言，HYAL1在超過pH 4.5時具有較少活體外催化活性[Frost I.G.及Stern, R.,「A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents」, Anal. Biochemistry, 1997 ; 251:263-269]。HYAL2係在活體外具有極低特異活性之酸活性酶。

透明質酸酶樣酶之特徵亦在於彼等通常經由糖基磷脂醯肌醇錨鎖定至質膜者(例如，人類HYAL2及人類PH20)[Danilkovitch-Miagkova等

人，Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2003；100(8):4580-4585；Phelps等人，Science 1988；240(4860): 1780-1782]、及彼等通常可溶者(例如，人類HYAL1)[Frost, I.G.等人，「Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase」，Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997；236(1):10-15]。然而，不同物種之間有變化：牛PH20(例如)與質膜連接極為鬆散且並不經由磷脂酶敏感錨錨固[Lalancette等人，Biol Reprod., 2001；65(2):628-36]。牛透明質酸酶之此獨特特徵已允許使用可溶性牛測試透明質酸酶作為用於臨床用途之提取物(Wydase™, Hyalase™)。其他PH20物種係在不使用清潔劑或脂肪酶之情況通常不可溶之脂質錨固酶。舉例而言，人類PH20經由GPI錨而錨固至質膜。製備可不將脂質錨引入多肽中之人類PH20 DNA構建體的嘗試產生催化非活性酶或不可溶酶[Arming等人，Eur. J. Biochem., 1997; 1; 247(3):810-4]。發現呈可溶性及膜結合兩種形式之天然存在之獼猴精液透明質酸酶。儘管64 kDa膜結合形式於pH 7.0下具有酶活性，但54 kDa形式僅在pH 4.0下具有活性[Cherr等人Dev. Biol., 1996; 10; 175(1): 142-53]。因而，可溶形式之PH20在中性條件下經常缺乏酶活性。

如上文所述及根據WO 2006/091871及美國專利第7,767,429號中之教示，為了有利於向下皮中投與治療藥物可向調配物中引入少量可溶性透明質酸酶糖蛋白(sHASEGP)。藉由快速解聚細胞外空間中之HA，sHASEGP降低間質之黏度，藉此增大導水率並提供可安全並舒適地向SC組織中投與之較大體積。藉由sHASEGP經由減小之間質黏度誘發之增大的導水率提供更大分散，此潛在地增大SC投與之治療藥物的全身生物利用度。

當在下皮中注射時，藉由sHASEGP之HA的解聚定位於SC組織中之注射位點。實驗證據顯示sHASEGP在間質空間中局部失活，小鼠

中之半衰期為13分鐘至20分鐘，CD-1小鼠中單一靜脈內投藥後血液中無可檢測到之全身吸收。在血管腔隙內，sHASEGP證實在小鼠及食蟹獼猴(*Cynomolgus monkey*)中之半衰期分別為2.3分鐘及5分鐘，劑量高達0.5 mg/kg。在SC組織中之HA受質中sHASEGP的快速清除、以及HA的連續合成對於其他共注射之分子產生瞬時且局部活性滲透增強，其之效應在投與後24小時至48小時內完全逆轉[Bywaters G.L.等人，「Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase injection」，*Br. Med. J.*, 1951; 2 (4741): 1178-1183]。

sHASEGP除了其對局部流體分散之效應外，亦用作吸收增強劑。大於16千道爾頓(kilodalton) (kDa)之巨大分子在很大程度上不藉助毛細管經由擴散吸收而是主要經由引流淋巴結吸收。因此，皮下投與之巨大分子(例如，治療抗體(分子量為約150 kDa))必須在到達引流淋巴管之前橫跨間質基質用於後續吸收於血管腔隙中。藉由增大局部分散，sHASEGP增大許多巨大分子之吸收速率(K_a)。此相對於在無sHASEGP下之SC投與可增大峰值血液濃度(C_{max})並潛在地增大生物利用度[Bookbinder L.H.等人，「A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics」，*J. Control. Release* 2006; 114: 230-241]。

動物來源之透明質酸酶產品已在臨床上使用60餘年，其主要用於增大其他共投與之藥物的分散及吸收及用於皮下灌注(大體積流體之SC注射/輸注)[Frost G.I., 「Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration」，*Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007; 4: 427-440]。關於透明質酸酶之作用機制之詳細內容已在以下出版物中加以詳細闡述：Duran-Reynolds F., 「A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action」，*CR Soc Biol Paris*,

1938; 69-81 ; Chain E. , 「 A mucolytic enzyme in testes extracts 」 ,
 Nature 1939; 977-978 ; Weissmann B. , 「 The transglycosylative action
 of testicular hyaluronidase 」 , J. Biol. Chem., 1955 ; 216: 783-94 ;
 Tammi, R., Saamanen, A.M., Maibach, H.I., Tammi M. , 「 Degradation
 of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal
 and dermal compartments of human skin in organ culture 」 , J. Invest.
 Dermatol. 1991; 97:126-130 ; Laurent, U.B.G., Dahl, L.B., Reed, R.K. ,
 「 Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph
 nodes and liver 」 , Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703 ; Laurent, T.C.及
 Fraser, J.R.E. , 「 Degradation of Bioactive Substances: Physiology and
 Pathophysiology 」 , Henriksen, J.H.(編輯)CRC Press, Boca Raton, FL ;
 1991 , 第 249-265 頁 ; Harris, E.N. 等人 , 「 Endocytic function,
 glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the
 recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis
 (HARE) 」 , J. Biol. Chem. 2004; 279:36201-36209 ; Frost, G.I. ,
 「 Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform
 for subcutaneous drug and fluid administration 」 , Expert Opinion on
 Drug Delivery, 2007; 4: 427-440 。 EU國家批准之透明質酸酶產品包括
 Hylase® 「 Dessau 」 及 Hyalase® 。 US批准之動物來源之透明質酸酶產
 品包括 Vitrase™ 、 Hydase™ 、 及 Amphadase™ 。

透明質酸酶產品之安全及功效已得以廣泛確認。所確定最明顯之
 安全危險係超敏反應及/或致敏性，認為其與動物源製劑之純度缺乏
 有關[Frost, G.I. , 「 Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an
 enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration 」 ,
 Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440]。應注意UK、德國
 及US關於動物源透明質酸酶之批准劑量存在差別。在UK，作為皮下

或肌肉注射之佐劑的常見劑量係1500單位，其直接添加至注射中。在US，用於此目的之常見劑量係150單位。在皮下灌注中，使用透明質酸酶幫助相對較大體積流體之皮下投與。在UK，通常用於皮下用途之每一500 ml至1000 ml流體給予1500單位透明質酸酶。在US，認為每升皮下灌注溶液150單位為適當的。在德國，認為150至300單位用於此目的係適當的。在UK，藉由添加1500單位加速局部麻醉劑之擴散。在德國及US，認為150單位用於此目的係適當的。儘管劑量不同(UK之劑量比US高十倍)，但已報告在US及UK銷售之動物源透明質酸酶產品的安全特性無明顯差別。

在2005年12月2日，Halozyme Therapeutics公司的重組人類透明質酸酶之可注射調配物rHuPH20 (HYLENEX™)獲得FDA批准。FDA批准HYLENEX™以150單位之劑量用於以下指示之SC投與：

- 作為佐劑以增大其他所注射藥物之吸收及分散
- 用於皮下灌注
- 作為SC尿路造影術中之附件以改良不透輻射試劑之再吸收。

作為法規審查之一部分，確認rHuPH20具有與先前批准之動物源透明質酸酶製劑相同之增強其他注射藥物之分散及吸收的特性，但具有改良之安全曲線。具體而言，與動物源透明質酸酶相比，使用重組人類透明質酸酶(rHuPH20)使動物病原體污染及可傳播海綿狀腦病之潛在危險最小化。

可溶性透明質酸酶糖蛋白(sHASEGP)、其製備方法及其在醫藥組合物中之用途已闡述於WO 2004/078140中。

如下文進一步概述之詳細實驗工作顯示所主張調配物令人驚奇地具有有利儲存穩定性且滿足被衛生機構批准之所有必須要求。

據信本發明調配物中之透明質酸酶可(例如)藉由增大活性物質之吸收來增強抗-CD20抗體至體循環之遞送(其用作滲透增強劑)。亦據

信透明質酸酶可藉由透明質酸、SC間質組織之細胞外組份之可逆水解增大治療性抗-CD20抗體經由皮下投與路徑至體循環中之遞送。下皮中透明質酸之水解暫時打開SC組織之間質空間中的通道且藉此改良治療性抗-CD20抗體至體循環中之遞送。另外，投與顯示人類疼痛降低且SC組織之體積衍生之腫脹變小。

透明質酸酶在局部投與時在局部具有其完整的效應。換言之，透明質酸酶在幾分鐘內失活並局部代謝且並未注意到具有全身或長期效應。透明質酸酶在進入血流時在幾分鐘內快速失活會排除在不同透明質酸酶產品之間實施相當生物分佈研究之現實能力。此性質亦使任何潛在全身安全問題最小化，此乃因透明質酸酶產品不可在遠距離位點處起作用。

不管化學結構、物種來源、組織來源、或源自相同物種及組織之藥物產品之批次的差別，本發明所有透明質酸酶之一致特徵係其解聚透明質酸之能力。其係不尋常的，事實在於儘管具其有不同結構但其活性仍相同(除效能外)。

本發明調配物之透明質酸酶的特徵在於對本文所述穩定醫藥調配物中之抗-CD20抗體的分子完整性無有害作用。此外，透明質酸酶僅修飾抗-CD20抗體至體循環之遞送，但不具有可提供或有利於全身吸收之抗-CD20抗體的治療效應的任何性質。透明質酸酶無全身生物利用度且在本發明之穩定醫藥調配物的推薦儲存條件下並不有害地影響抗-CD20抗體之分子完整性。因此，將其視為本發明抗-CD20抗體調配物中之賦形劑。由於其不施加治療效應，故其代表除治療活性抗-CD20抗體外之醫藥形式的成份。

本發明之大量適宜透明質酸酶已為業內所知。較佳酶係人類透明質酸酶、最佳為稱作rHuPH20之酶。rHuPH20係中性及酸-活性 β -1,4糖基水解酶之家族成員，其藉由水解N-乙醯基葡萄糖胺之C₁位與葡萄糖醛

酸之C₄位之間的 β -1,4連接來解聚透明質酸。透明質酸係在結締組織(例如, 皮下間質組織)、及某些特定組織(例如, 臍帶及玻璃體)之胞內基礎物中發現的多糖。透明質酸之水解暫時降低間質組織之黏度並促進所注射流體或局部滲出液或流出物之分散, 由此有利於其吸收。透明質酸酶之效應係局部且可逆的, 其中組織透明質酸之完整重構存在24小時至48小時[Frost, G.I., 「Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration」, Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4:427-440]。經由透明質酸水解之結締組織之滲透性增大與針對其增大共投與分子之分散及吸收之能力的透明質酸酶之功效相關。

人類基因組含有若干透明質酸酶基因。僅PH20基因產品在生理細胞外條件下具有有效透明質酸酶活性且用作鋪展劑, 而酸活性透明質酸酶並不具有此性質。

rHuPH20係首個且唯一目前可用於治療用途之重組人類透明質酸酶。人類基因組含有若干透明質酸酶; 僅PH20基因產品在生理細胞外條件下具有有效透明質酸酶活性且用作鋪展劑。天然存在之人類PH20蛋白質具有將其錨固至質膜且附接至羧基末端胺基酸之脂質錨。由Halozyme開發之rHuPH20酶係缺乏負責脂質附接之羧基末端中的該等胺基酸之截短缺失變體。此產生類似於牛測試製劑中發現之蛋白質的可溶中性pH活性酶。rHuPH20蛋白質係用35個胺基酸信號肽合成, 該肽在分泌過程期間自N-末端移除。成熟rHuPH20蛋白質含有與在一些牛透明質酸酶製劑中發現者同源的可信N-末端胺基酸序列。

包括動物源PH20及重組人類rHuPH20在內之PH20透明質酸酶藉由水解N-乙醯基葡萄糖胺之C₁位與葡萄糖醛酸之C₄位之間的 β -1,4連接來解聚透明質酸。四糖係最小消化產物[Weissmann, B., 「The transglycosylative action of testicular hyaluronidase」, J. Biol. Chem.,

1955; 216: 783-94]。在重組生物產物之N連接聚糖中未發現此N-乙酰基葡萄糖胺/葡糖醛酸結構且因此rHuPH20不會影響與其調配之抗體(例如，利妥昔單抗)之糖基化。rHuPH20酶本身具有6個N連接之聚糖/分子，其中核心結構類似於單株抗體中發現者。如所預期，該等N連接之結構不會隨時間變化，此證實在該等N連接之聚糖結構上無rHuPH20之酶活性。rHuPH20之短半衰期及透明質酸之不變合成導致對組織之短期且局部酶作用。

作為本發明皮下調配中之賦形劑的透明質酸酶較佳係藉由使用重組DNA技術來製備。以此方式，確保始終獲得相同蛋白質(相同胺基酸序列)且避免藉由污染自組織提取期間共純化之蛋白質造成的過敏反應。本發明調配物中所用透明質酸酶較佳係人類酶、最佳為rHuPH20。

rHuPH20 (HYLENEX™)之胺基酸序列已眾所周知且在CAS Registry第75971-58-7號下獲得。近似分子量係61 kDa(亦參見美國專利第7,767,429號)。

已在來自人類及其他哺乳動物之天然來源之哺乳動物透明質酸酶與PH-20 cDNA純系之間實施多個結構及功能比較。PH-20基因係用於重組產物rHuPH20之基因；然而，重組藥物產品係由PH-20基因編碼之全長蛋白質之447胺基酸截短形式。在任一比較中，關於胺基酸序列之結構類似性很少超過60%。功能比較顯示rHuPH20之活性與先前批准之透明質酸酶產品之活性極為類似。此資訊與過去50年間之臨床發現一致：無論透明質酸酶之來源如何，透明質酸酶之臨床安全及單位功效均相等。

在本發明抗-CD20抗體SC調配物中使用rHuPH20允許投與較大體積藥物產品且潛在地增強皮下投與之CD20抗體(較佳利妥昔單抗)向體循環中的吸收。

本發明之穩定醫藥調配物的滲透壓係 350 ± 50 mOsm/kg。

本發明之穩定醫藥調配物基本上不含可見(人眼檢查)顆粒。顯微鏡下可見顆粒(如由不透光度量測)應較佳滿足以下標準：

-每個小瓶 $\geq 10\ \mu\text{m}$ 之顆粒之最大數 -> 6000

-每個小瓶 $\geq 25\ \mu\text{m}$ 之顆粒之最大數 -> 600

在又一態樣中，本發明提供調配物用於製備藥劑之用途，該藥劑用於治療個體中適於利用抗-CD20抗體之治療的疾病或病症(例如，較佳為癌症或非惡性疾病)，其包含以有效治療該疾病或病症之量投與個體本文所述調配物。較佳地，抗-CD20抗體係與化學治療劑同時或依序共投與。

在又一態樣中，本發明提供一種治療個體之適於利用抗-CD20抗體之治療的疾病或病症(例如，癌症(較佳地)或非惡性疾病)的方法，其包含以有效治療該疾病或病症之量投與個體本文所述調配物。癌症或非惡性疾病通常涉及表現CD20之細胞，以使本發明之治療性醫藥SC調配物中之CD20抗體能夠結合受影響細胞。癌症較佳係表現CD20之癌症。可利用本發明組合物進行治療之非惡性疾病較佳係本文所定義之自身免疫疾病。較佳地，抗-CD20抗體係與化學治療劑同時或依序共投與。

向調配物中添加透明質酸酶可增大可安全並舒適地皮下投與之注射體積。較佳之注射體積係1 ml至15 ml。已觀察到，投與本發明之調配物可增大治療抗體之分散、吸收及生物利用度。經由SC路徑投與之大分子(即 $>16\ \text{kDa}$)優先經由引流淋巴液吸收於血管腔隙中 [Supersaxo, A.等人，「Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration」，1990; 2:167-169；Swartz, M. A.，「Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system」，2001; 50:

3-20]。因而，相對於靜脈內輸注，該等大分子向體循環中之引入速率減慢，因此可潛在地降低輸注有關反應之頻率/強度。

為產生皮下CD20抗體(較佳利妥昔單抗)，在製造過程之純化的最終步驟中本發明調配物需要高抗體濃度(約120 mg/ml)。因此，向CD20抗體(較佳利妥昔單抗)之習用製造過程中添加額外處理步驟(超濾/透析過濾)。本發明之高濃縮穩定醫藥抗-CD20抗體調配物亦可提供為經穩定蛋白調配物，其可利用適宜稀釋劑重構以產生高抗-CD20抗體濃度重構之調配物。

較佳使用本發明之CD20抗體SC調配物治療癌症(較佳表現CD20之癌症)。

本發明說明書中所用術語「約」意指所提供具體值可在一定程度上變化，例如，意指在給定值中包括 $\pm 10\%$ ，較佳 $\pm 5\%$ 、最佳 $\pm 2\%$ 之範圍內的變化。

除以上分析外，熟習此項技術者可使用各種活體內分析。舉例而言，可將患者體內之細胞暴露於視情況用可檢測標記(例如，放射性同位素)標記之抗體，且可(例如)藉由體外掃描放射性或藉由分析取自先前暴露於抗體之患者的活檢來評價抗體與患者之細胞的結合。

預期本發明之CD20抗體SC調配物亦可用於治療各種非惡性疾病或病症，例如包括本文所定義之自身免疫疾病；子宮內膜異位症；硬皮病；再狹窄症；息肉，例如結腸息肉、鼻息肉或胃腸息肉；纖維腺瘤；呼吸性疾病；膽囊炎；多發性神經纖維瘤；多囊性腎疾病；炎症疾病；皮膚病症，包括乾癬及皮炎；血管疾病；涉及血管上皮細胞異常增殖之病況；胃十二指腸潰瘍；梅尼特裏埃病(Menetrier's disease)、分泌腺瘤或蛋白質缺失症候群；腎病症；血管新生病症；眼部疾病，例如，年齡相關性黃斑變性、假定眼組織胞漿菌病症候群、源自增生性糖尿病視網膜病之視網膜新血管形成、視網膜血管生

成、糖尿病視網膜病、或年齡相關性黃斑變性；骨相關病狀，例如，骨關節炎、佝僂病及骨質疏鬆症；大腦缺血事件後損害；纖維性或水腫疾病，例如，肝硬化、肺纖維化、結節病、甲狀腺炎、黏滯性過高症候群、全身性奧斯勒－韋伯－朗迪病 (Osier Weber-Rendu disease)、慢性阻塞性肺病、或燒傷、創傷、輻射、中風、缺氧或缺血後水腫；皮膚之超敏反應；糖尿病視網膜病及糖尿病性腎病；基蘭-巴瑞德症候群 (Guillain-Barre syndrome)；移植物抗宿主病或移植排斥；吉特病 (Paget's disease)；骨或關節炎症；光老化 (例如，由人類皮膚之UV輻射引發)；良性前列腺肥大；某些微生物感染，包括選自腺病毒、漢坦病毒 (hantavirus)、伯格多弗疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi*)、耶氏桿菌 (*Yersinia spp.*) 及百日咳桿菌 (*Bordetella pertussis*) 之微生物病原體；由血小板聚集引發之血栓；繁殖病況，例如，子宮內膜異位症、卵巢超刺激症候群、先兆子癇、功能障礙性子宮出血、或月經頻多；滑膜炎；粥樣斑；急性及慢性腎病 (包括增殖性腎小球腎炎及糖尿病誘發之腎病)；濕疹；形成肥大性瘢痕；內毒素性休克及真菌感染；家族性腺瘤息肉病；神經變性疾病 (例如，阿茲海默氏病 (Alzheimer's disease)、AIDS 相關之癡呆症、帕金森氏病 (Parkinson's disease)、肌萎縮性脊髓側索硬化症、色素性視網膜炎、脊髓性肌肉萎縮症及小腦退化)；骨髓發育不良綜合症；再生障礙性貧血；缺血性損傷；肺、腎或肝纖維化；T細胞調介之超敏疾病；嬰兒肥厚性幽門狹窄；尿道阻塞性症候群；乾癬性關節炎；及橋本氏甲狀腺炎 (Hasimoto's thyroiditis)。用於療法之較佳非惡性適應症係如本文所定義。

若適應症係癌症，則可用抗體調配物及化學治療劑之組合治療患者。該組合投與包括使用分開調配物或單個醫藥調配物之共同投與或同時投與、及以任一順序進行之連續投與，其中較佳地在一時間段內

兩種(或所有)活性劑可同時發揮其生物活性。因而，可在投與本發明之抗體調配物之前或之後投與化學治療劑。在此實施例中，至少一次化學治療劑投與和至少一次本發明抗體調配物投與之間之週期較佳係約1個月或更短時間、且最佳約2週或更短時間。或者，化學治療劑及本發明之抗體調配物係以單個調配物或分開調配物同時投與患者。

利用該抗體調配物之治療可改良癌症或疾病之跡象或症狀。舉例而言，若所治療疾病係癌症，則該療法可改良存活期(整體存活期及/或無進展存活期)及/或可產生客觀臨床應答(部分或完全)。此外，利用化學治療劑及抗體調配物之組合的治療可對患者產生協同或大於加合的治療益處。

較佳地，所投與調配物中之抗體係裸抗體。然而，所投與抗體可與細胞毒性劑偶聯。較佳地，免疫偶聯物及/或其所結合之抗原被細胞內在化，使得免疫偶聯物殺死其所結合癌細胞之治療功效增強。在一較佳實施例中，細胞毒性劑靶向癌細胞中之核酸或干擾癌細胞中之核酸。該等細胞毒性劑之實例包括類美登素(maytansinoid)、卡奇黴素(calioheamicin)、核糖核酸酶及DNA內切核酸酶。較佳免疫偶聯物係類似於曲司佐單抗-DM1 (T-DM1)(其闡述於WO 2003/037992中)、更佳免疫偶聯物T-MCC-DM1之利妥昔單抗-類美登素免疫偶聯物。

對於皮下遞送而言，調配物可經由適宜裝置投與，該裝置係例如(但不限於)注射器、注射裝置(例如，INJECT-EASE™及GENJECT™裝置)、輸注幫浦(例如，Accu-Chek™)、注射筆(例如，GENPEN™)、無針裝置(例如，MEDDECTOR™及BIOJECTOR™)、或經由皮下貼片遞送系統。

用於預防或治療疾病之該抗-CD20抗體調配物之投與量、及投與週期將端視所治療患者之類型(物種、性別、年齡、體重等)及病況以及所治療疾病或病況之嚴重程度而定。亦對適當劑量確定重要者係疾

病過程(不管出於預防還是治療目的投與抗體)、先前療法、患者之臨床病史及其對抗體之反應。最終劑量確定係根據主治醫師之判斷。抗體係一次性或經一系列治療適當地投與患者。端視疾病類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至50 mg/kg (例如，0.1-20 mg/kg)該抗-CD20抗體係投與患者之初始候選劑量。

該抗-CD20抗體之較佳劑量在約0.05 mg/kg 至約30 mg/kg 體重範圍內。因而，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 、10 mg/kg 或30 mg/kg (或其任一組合)之一或多個劑量。端視患者之類型(物種、性別、年齡、體重等)及病況及抗-CD20抗體之類型，該第一劑量可不同於第二抗-CD20抗體劑量。該等劑量可每日或間歇(例如，每三天至六天或甚至每一週至三週)投與。亦可先投與初始較高負荷劑量，隨後投與一或多個較低劑量。基於臨床研究(亦參見針對利妥昔單抗之非限制性範例的實例3及4)，較佳劑量範圍係300 mg/m^2 至900 mg/m^2 。更佳地，該抗-CD20抗體之較佳劑量範圍係約375 mg/m^2 至約800 mg/m^2 。該抗-CD20抗體之較佳具體劑量係約375 mg/m^2 、約625 mg/m^2 及約800 mg/m^2 之劑量。亦較佳者係該抗-CD20抗體之固定劑量。

在一個實施例中，B-細胞淋巴瘤(較佳非霍奇金氏淋巴瘤)之固定劑量係如下。較佳者係約1200 mg 至約1800 mg 該抗-CD20抗體/劑量。更佳者係選自約1300 mg 、約1500 mg 、約1600 mg 及約1700 mg 該抗-CD20抗體/劑量之群之劑量。最佳地，B-細胞淋巴瘤患者(較佳非霍奇金氏淋巴瘤患者)之固定劑量係約1400 mg 該抗-CD20抗體(例如，利妥昔單抗)/劑量，其可根據不同時間表(包括約每2個月(包括約每8週)、約每3個月(包括約每12週)、持續約2年(或更長時間)等(亦參見針對利妥昔單抗之非限制性範例的實例3及4))來投與。

在另一實施例中，白血病患者(較佳慢性淋巴細胞白血病(CLL))患

者)之固定劑量係如下。較佳者係約1600 mg至約2200 mg該抗-CD20抗體/劑量。更佳者係選自約1700 mg、約1800 mg、約1900 mg及約2100 mg該抗-CD20抗體/劑量之群之劑量。在一個實施例中，白血病患者(較佳CLL患者)之固定劑量係約1870 mg該抗-CD20抗體(例如，利妥昔單抗)/劑量。

在又一實施例中，患有自身免疫疾病(例如，類風濕性關節炎、多發性硬化、狼瘡性腎炎、糖尿病、ITP、及血管炎)之患者的固定劑量係如下。較佳者係約1200 mg至約2200 mg該抗-CD20抗體/劑量，例如約1500 mg該抗-CD20抗體(例如，利妥昔單抗)/劑量。

若投與化學治療劑，則通常以其已知劑量投與，或由於藥物之組合作用或由於投與化學治療劑之不良副作用視情況降低劑量。該等化學治療劑之製備及定量給藥時間表可按照製造商說明書使用或由熟習此項技術者根據經驗確定。該化學療法之製備及定量給藥時間表亦闡述於 *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。

本發明醫藥活性抗-CD20抗體之穩定醫藥調配物較佳以皮下注射形式投與，藉此較佳以3週之時間間隔(q3w)重複投與多次。最佳地，在1分鐘至10分鐘，較佳2分鐘至6分鐘、最佳 3 ± 1 分鐘之時間段內投與全體積之注射流體。最佳地，以2毫升/分鐘(即，例如，約240毫克/分鐘)投與。對於不給予其他靜脈內(IV)化學治療劑之許多患者而言，該皮下投與可增大患者便利性，其具有可在家自身投與之潛能。此導致改良之順從性且可降低/消除與IV投與相關之成本(即，用於IV投與、床位租賃、患者交通等之護理成本)。本發明之皮下投與最可能與輸注有關之反應的減少頻率及/或強度相關。

在一較佳實施例中，該藥劑可用於在患有表現CD20之癌症之患者中預防或減少轉移或進一步擴散。該藥劑可用於延長該患者之存活

持續時間、延長該患者之無進展存活期、延長應答持續時間、使所治療患者獲得統計學上顯著且臨床上有意義之改善，如藉由存活持續時間、無進展存活期、應答率或應答持續時間所量測。在一較佳實施例中，該藥劑可用於提高患者群體之應答率。

在本發明上下文中，一或多種額外其他生長抑制性、細胞毒性、化學治療性、抗血管新生性、抗癌藥劑或細胞因子、或增強該等藥劑之效應的化合物可用於表現CD20之癌症的抗-CD20抗體治療。較佳地，在無該等額外細胞毒性劑、化學治療劑或抗癌劑或能夠增強該等藥劑之效應的化合物下使用抗-CD20抗體治療。

該等藥劑包括：例如，烷基化劑或具有烷基化作用之藥劑，例如環磷醯胺(CTX；例如cytoxan®)、苯丁酸氮芥(CHL；例如留可然(leukeran)®)、順鉑(CisP；例如platinol®)、白消安(例如myleran®)、美法侖、卡莫司汀(BCNU)、鏈尿黴素(streptozotocin)、曲他胺(triethylenemelamine) (TEM)、絲裂黴素C及諸如此類；抗代謝物，例如胺甲蝶呤(MTX)、依託泊苷(VP16；例如vepesid®)、6-巰基嘌呤(6MP)、6-硫鳥嘌呤(6TG)、阿糖胞苷(Ara-C)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他濱(例如Xeloda®)、達卡巴嗪(DTIC)及諸如此類；抗生素，例如放線菌素D (actinomycin D)、多柔比星(DXR；例如阿黴素(adriamycin)®)、柔紅黴素(道諾黴素)、博萊黴素、光輝黴素(mithramycin)及諸如此類；生物鹼類，例如長春花生物鹼，例如長春新鹼(VCR)、長春花鹼及諸如此類；及其他抗腫瘤劑，例如紫杉醇(例如taxol®)及紫杉醇衍生物、細胞生長抑制劑、糖皮質激素，例如地塞米松(dexamethasone)(DEX；例如decadron®)以及腎上腺皮質類固醇，例如潑尼松、核苷酶抑制劑，例如羥基脲、胺基酸消耗酶，例如天冬醯胺酶、甲醯四氫葉酸及其他葉酸衍生物，以及類似的各種抗腫瘤劑。以下藥劑亦可用作額外藥劑：阿米福汀(arnifostine)(例如

ethyol®)、更生黴素、雙氯乙基甲胺(氮芥)、鏈脲黴素、環磷醯胺、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星微脂粒(例如, doxil®)、吉西他濱(例如 gemzar®)、柔紅黴素微脂粒(例如, daunoxome®)、丙卡巴肼、絲裂黴素、多西他賽(例如 taxotere®)、阿地白介素(aldesleukin)、碳鉑、奧沙利鉑、克拉屈濱(cladribine)、喜樹鹼、CPT 11(伊立替康)、10-羥基-7-乙基-喜樹鹼(SN38)、氟尿苷、氟達拉濱、異環磷醯胺、伊達比星、美司鈉(mesna)、干擾素 β 、干擾素 α 、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林(leuprolide)、甲地孕酮(megestrol)、美法侖、巯基嘌呤、普卡黴素(plicamycin)、米托坦、培加帕酶(pegaspargase)、噴托他丁、哌泊溴烷、普卡黴素、他莫昔芬、替尼泊苷、羰內酯、硫鳥嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、長春瑞濱、苯丁酸氮芥。較佳地, 在不使用該等額外藥劑下使用抗-CD20抗體治療。

癌症治療領域中之特點通常係於化學治療方案中使用上述細胞毒性劑及抗癌劑以及抗增殖靶向特異性抗癌藥物, 且其在本文中之使用係出於監測耐受性及效率以及用於控制投與路徑及劑量之相同考慮因素, 其中會實施一定調整。舉例而言, 細胞毒性劑之實際劑量可端視藉由使用組織培養方法所確定之患者培養細胞效應而變化。通常, 與不存在額外其他藥劑時所使用之量相比, 該劑量將降低。

有效細胞毒性劑之典型劑量可在製造商推薦之範圍內, 並且在活體外效應或動物模型之效應所指示之情形下, 可降低高達約一個數量級之濃度或量。因而, 實際劑量將取決於醫師之判斷、患者之病狀, 以及基於初始培養惡性細胞或組織培養組織試樣之活體外應答或在適當動物模型中觀察到之應答之治療方法的效率。

在本發明上下文中, 除了針對表現CD20之癌症之抗-CD20抗體治療外, 亦可進行有效量之離子輻射及/或可使用放射性藥物。放射源可在所治療患者體外或體內。當放射源位於患者體外時, 該療法稱為

體外放射線療法(EBRT)。當放射源位於患者體內時，該治療稱為體內近距放射療法(BT)。在本發明上下文中使用之放射性原子可選自包括但不限於以下之群：鐳、銫-137、銥-192、鉬-241、金-198、鈷-57、銅-67、鐳-99、碘-123、碘-131及銥-111。亦可用該等放射性同位素標記該抗體。較佳地，在不使用該電離輻射下使用抗-CD20抗體治療。

放射療法係用於控制不可切除或不能施行手術之腫瘤及/或腫瘤轉移之標準治療方法。當放射療法與化學療法組合時會得到改善之結果。放射療法所基於之原理係遞送至標靶區域之高劑量放射將導致腫瘤及正常組織二者中之生殖細胞死亡。放射劑量療法通常以放射吸收劑量(Gy)、時間及分段來確定，且必須由腫瘤學家謹慎確定。患者所接受之放射量將端視多個考慮因素而定，但最重要的兩個考慮因素為腫瘤相對於身體其他重要結構或器官之位置及腫瘤擴散之程度。接受放射療法之患者之典型治療過程將為持續1至6週之治療時間表，其中向患者投與10至80 Gy之總劑量，每天一次投與約1.8至2.0 Gy，每週五天。在本發明之較佳實施例中，當用本發明組合治療及放射治療人類患者中之腫瘤時，存在協同作用。換言之，當與放射、視情況與額外化學治療劑或抗癌劑組合時，可借助包含本發明CD20抗體調配物之藥劑增強對腫瘤生長之抑制作用。輔助放射療法之參數包含於(例如)WO 99/60023中。

其他治療方案可與抗體組合，該抗體包括(但不限於)第二(第三、第四等)化學治療劑(另一說法為不同化學治療劑之「混合物」、另一單株抗體、生長抑制劑、細胞毒性劑、化學治療劑、抗血管新生劑、及/或細胞因子等、或其任一適宜組合。

除以上治療方案外，患者亦可經受手術移除癌細胞及/或放射療法。

在本發明之另一實施例中，提供含有本發明醫藥調配物且提供其使用說明書的製造物件。此製造物件包含容器。適宜容器包括(例如)瓶、小瓶(例如，多腔或雙腔小瓶)、注射器(例如，多腔或雙腔注射器)及測試管。容器可由諸如玻璃或塑料等多種材料製成。容器容納調配物且容器上或與容器相關之標記可指示使用說明。容納調配物之容器可為多用途小瓶，其可重複投與重構調配物(例如，投與2至6次)。製造物件可進一步包括自商業及用戶角度來講期望之其他物質，其包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針、注射器、及具有使用說明書之包裝插頁。

根據本發明調配之抗體較佳基本上純淨且期望地基本上均質(即，不含污染蛋白質等，藉此本發明調配物中之透明質酸酶不被視為本發明抗-CD20單株抗體之污染蛋白質)。

參考以下實例可更全面地理解本發明。然而，不應將其理解為限制本發明之範疇。所有文獻及專利引文均以引用方式併入本文中。

實例

基於下文所提供實驗結果使用下文所概述一般製備性及分析方法及分析開發根據本發明皮下投與之抗-CD20調配物。

實例1：高濃縮液體調配物之製備

利妥昔單抗係藉由通常自重組蛋白之生產所知之技術製造。如EP-B-2000149中所述製備之經遺傳改造的中國倉鼠卵巢(CHO)細胞系在來自主細胞庫之細胞培養基中擴增。自細胞培養液收穫利妥昔單抗單株抗體且使用固定化蛋白A親和層析、陽離子交換層析、移除病毒污染物之過濾步驟、之後使用陰離子交換層析及超濾/透析過濾步驟對其進行純化。

rHuPH20係藉由通常自重組蛋白之生產所知之技術製造。該製程開始於解凍來自工作細胞庫(WCB)或主細胞庫(MCB)之細胞及經由細

胞培養在一系列旋轉燒瓶中擴張。使用高達6升之細胞培養基提供具有胺甲蝶呤且維持於選擇性壓力下之連續來源。當擴增至約36升時，將培養基轉移用於約300升之最終批料體積的至400升生物反應器中。以補料分批模式運行生產生物反應器，無選擇壓力，且生產期之持續時間係2週。將rHuPH20分泌至培養液中。1000升生物反應器亦可用於500升之最終批料體積。在完成生產期後，藉由過濾澄清收穫物，且隨後用溶劑/清潔劑處理以使病毒失活。隨後藉由一系列四管柱層析過程純化蛋白質以去除處理及產物相關雜質。實施病毒過濾步驟，且隨後濃縮經過濾塊狀物，調配成最終緩衝液：10 mg/mL rHuPH20，存於20 mM L-組胺酸/HCl緩衝液(pH 6.5)中，130 mM NaCl，0.05% (w/v)聚山梨醇酯80。於低於-70℃下儲存rHuPH20塊狀物。

本發明調配物之其他賦形劑廣泛用於實踐中且已為熟習此項技術者所熟知。因此，無需本文中對其進行詳細解釋。

用於本發明皮下投與之液體藥物產品調配物係如下開發：

為製備液體調配物，將利妥昔單抗針對含有預期緩衝液組合物之透析過濾緩衝液進行緩衝液交換，且若需要藉由透析過濾濃縮至約200 mg/ml之抗體濃度。在完成透析過濾作業後，向抗體溶液中添加作為儲存溶液之賦形劑(例如，海藻糖、rHuPH20、表面活性劑)。最終，用緩衝液將蛋白濃度調節至約120 mg/ml之最終利妥昔單抗濃度。

所有調配物經0.22 µm低蛋白結合過濾器無菌過濾並以無菌方式填充至用經ETFE(乙烯與四氟乙烯之共聚物)塗佈之橡膠塞及鋁箍夾帽封閉之無菌6 ml玻璃小瓶內。填充體積係約3.0 ml。將該等調配物於不同環境條件(5℃、25℃及40℃)下儲存不同時間間隔並藉由振盪(於5℃及25℃下在200 rpm振盪頻率下1周)及冷凍-解凍應激方法(freeze-

thaw stress method)使其受到應激。在施加應激測試之前及之後藉由以下分析方法分析試樣：

- 1) UV分光光度計；
- 2)尺寸排除層析(SEC)；
- 3)藉由離子交換層析(IEC)；
- 4)藉由溶液之渾濁度；
- 5)針對可見顆粒；及
- 6)針對rHuPH20活性。

在Perkin Elmer λ35 UV分光光度計上在240 nm至400 nm之波長範圍內實施用於測定蛋白含量之UV光譜。將淨蛋白試樣利用相應調配物緩衝液稀釋至約0.5 mg/ml。根據等式1計算蛋白濃度。

$$\text{等式1：蛋白質含量} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{稀釋因子}}{\epsilon \left(\frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right) \times d(\text{cm})}$$

針對320 nm下之光散射校正於280 nm下之UV光吸收且乘以稀釋因子，其係自淨試樣之稱重質量及密度及稀釋緩衝液確定。分子除以試管之路徑長度d與消光係數 ϵ 的乘積。

使用尺寸排除層析(SEC)檢測調配物中可溶性高分子量物質(聚集體)及低分子量水解產物(LMW)。該方法使用配備有UV檢測器(檢測波長280 nm)及TosoHaas TSK G3000SWXL管柱(7.8x300 mm)之適宜HPLC儀器。完整單體聚集且使用0.2 M磷酸氫二鉀、0.25 M氯化鉀(pH 7.0)以0.5 ml/min之流速藉由等度洗脫曲線分離水解產物。

實施離子交換層析(IEC)以檢測改變調配物中之利妥昔單抗的淨電荷之化學降解產物。出於此目的，用木瓜酶消解利妥昔單抗。該方法使用配備有UV檢測器(檢測波長280 nm)及Polymer Labs PL-SCX 1000A分析型陽離子交換管柱之適宜HPLC儀器。分別使用10 mM

MES(pH 6.0)及10 mM MES、0.2 M氯化鈉(pH 6.0)作為流動相A及B，流速為1 ml/min。

為測定混濁度，於室溫下使用HACH 2100AN濁度計以FTU(混濁度單位)量測乳光。

藉由使用Seidenader V90-T目視檢查儀器分析試樣之可見顆粒。

使用作為透明質酸酶之rHuPH20的活體外酶分析作為活性分析。該分析係基於當透明質酸(透明質酸鈉)結合陽離子沉澱時不可溶沉澱之形成。藉由使rHuPH20與透明質酸受質一起培育且隨後用酸化血清白蛋白(馬血清)沉澱未消解透明質酸量測酶活性。在640 nm波長下量測渾濁度且自透明質酸受質上之酶活性產生的渾濁度降低係酶活性之量度。使用利用rHuPH20分析參考標樣之稀釋產生的標準曲線運行該程序，且根據曲線讀取試樣活性。

調配物A至J之穩定性測試的結果提供於下文所增加表格中。

本發明液體利妥昔單抗藥物產品調配物之組成及穩定性數據

調配物 A 係於 pH 5.5 下具有組成 120 mg/ml 利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、210 mM 海藻糖二水合物、10 mM 甲硫酸胺、0.06% 聚山梨醇酯 80、2,000 U/ml rHuPH20 之液體調配物。

儲存溫度/ 應激條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換- HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	114	2.2	97.8	0.1	24	65	4.2	不含顆粒	1970
5°C 下振盪	1週	114	2.4	97.5	0.1	n.d.	n.d.	4.2	不含顆粒	1760
25°C 下振盪	1週	115	2.3	97.6	0.1	n.d.	n.d.	4.4	不含顆粒	1676
冷凍/解凍	(5個循環)	114	2.4	97.5	0.1	n.d.	n.d.	4.4	不含顆粒	2123
5°C	4週	114	2.2	97.8	0.1	25	65	4.7	不含顆粒	1979
	13週	114	2.1	97.8	0.1	26	62	4.6	不含顆粒	2219
	26週	114	2.1	97.8	0.2	25	63	4.4	不含顆粒	2412
25°C	4週	114	2.0	97.9	0.1	25	64	4.7	不含顆粒	1975
	13週	n.d.	1.9	97.8	0.3	24	61	4.8	不含顆粒	2215
	26週	n.d.	1.9	97.6	0.5	22	60	4.3	不含顆粒	2409
40°C	4週	114	2.1	97.3	0.6	19	61	5.5	不含顆粒	n.d.
	13週	n.d.	3.2	91.4	5.4	13	55	8.1	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定



調配物B係於pH 6.1下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、210 mM海藻糖二水合物、10 mM甲硫酸胺、0.06%聚山梨醇酯80、2,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存溫度/ 應激條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	117	2.3	97.7	0.1	25	63	7.1	不含顆粒	2463
5°C下振盪	1週	116	2.2	97.7	0.1	n.d.	n.d.	7.2	不含顆粒	2288
25°C下振盪	1週	118	2.1	97.8	0.1	n.d.	n.d.	6.9	不含顆粒	2613
冷凍/解凍	(5個循環)	116	2.3	97.7	0.1	n.d.	n.d.	6.6	基本上不含顆粒	2259
5°C	4週	117	2.2	97.8	0.1	25	62	6.3	不含顆粒	2485
	13週	114	2.3	97.6	0.1	25	62	6.3	不含顆粒	2237
	26週	119	2.2	97.7	0.1	25	61	6.8	不含顆粒	2344
25°C	4週	n.d.	2.0	97.9	0.1	25	62	6.6	不含顆粒	2179
	13週	n.d.	2.1	97.7	0.2	24	61	6.3	不含顆粒	2083
	26週	n.d.	2.1	96.2	1.8	23	60	6.9	不含顆粒	2397
40°C	4週	n.d.	2.2	96.1	1.7	21	59	8.6	不含顆粒	n.d.
	13週	n.d.	3.3	92.2	4.5	14	53	21.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定

調配物C係於pH 5.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、210 mM海藻糖二水合物、10 mM甲硫胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	126	1.7	98.3	0.0	27	58	4.4	不含顆粒	11963
5°C 下振盪	1週	127	1.6	98.3	0.0	n.d.	n.d.	4.0	不含顆粒	12083
25°C 下振盪	1週	127	1.6	98.4	0.1	n.d.	n.d.	4.5	不含顆粒	11150
冷凍/ 解凍	(5個循環)	126	1.6	98.4	0.0	n.d.	n.d.	4.2	基本上不含顆粒	11869
5°C	7週	124	1.5	98.5	0.0	26	62	5.0	不含顆粒	12206
	19週	120	1.5	98.5	0.1	26	62	4.1	不含顆粒	11945
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.5	97.8	0.7	25	63	5.8	不含顆粒	12259
	19週	n.d.	1.5	97.3	1.2	24	61	4.8	不含顆粒	13137
	26週	n.d.	1.8	96.6	1.6	24	60	4.4	不含顆粒	12948
40°C	7週	n.d.	2.5	94.6	2.9	18	60	10.2	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	3.7	89.8	6.5	12	55	20.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定

調配物D係於pH 5.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM乙酸、210 mM海藻糖二水合物、10 mM甲硫酸胺、0.06%聚山梨醇酯20、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	127	1.6	98.4	0.0	26	62	4.9	不含顆粒	12619
5°C 下振盪	1週	125	1.5	98.4	0.0	n.d.	n.d.	4.3	不含顆粒	12507
25°C 下振盪	1週	123	1.5	98.4	0.1	n.d.	n.d.	4.3	不含顆粒	12923
冷凍/ 解凍	(5個循環)	124	1.5	98.4	0.0	n.d.	n.d.	4.4	基本上不含 顆粒	12394
5°C	7週	125	1.5	98.4	0.0	26	63	5.0	基本上不含 顆粒	10030
	19週	123	1.5	98.5	0.1	26	62	4.7	不含顆粒	15324
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.6	97.7	0.7	25	62	4.9	不含顆粒	13099
	19週	n.d.	1.6	97.2	1.2	24	61	5.1	不含顆粒	13031
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	2.6	94.8	2.6	17	60	28.7	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	3.6	90.5	6.0	9	56	51.9	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定



調配物E係於pH 5.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、210 mM海藻糖二水合物、10 mM甲硫胺酸、0.06%聚山梨醇酯20、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	126	1.5	98.5	0.0	26	62	4.6	基本上不含 顆粒	12231
5°C 下振盪	1週	128	1.5	98.5	0.0	n.d.	n.d.	4.4	基本上不含 顆粒	12524
25°C 下振盪	1週	127	1.5	98.5	0.1	n.d.	n.d.	4.2	不含顆粒	11438
冷凍/ 解凍	(5個循環)	127	1.5	98.5	0.0	n.d.	n.d.	4.3	不含顆粒	14440
5°C	7週	125	1.5	98.5	0.0	26	62	4.7	不含顆粒	12824
	19週	125	1.5	98.5	0.1	26	62	4.5	不含顆粒	13891
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.5	97.8	0.7	25	62	4.3	不含顆粒	13540
	19週	n.d.	1.5	97.4	1.1	24	61	4.6	不含顆粒	11243
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	2.5	94.6	2.9	18	60	10.6	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	3.9	89.6	6.5	12	55	22.7	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定

調配物F係於pH 5.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、120 mM氯化鈉、10 mM甲硫胺酸、0.02%聚山梨醇酯80、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC			渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	124	1.6	98.3	0.0	3	26	62	28.7	不含顆粒	12034
5°C 下振盪	1週	127	1.6	98.4	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	31.0	不含顆粒	12083
25°C 下振盪	1週	125	2.4	97.5	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	31.1	不含顆粒	11150
冷凍/ 解凍	(5個循環)	125	1.9	98.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	30.4	不含顆粒	11869
5°C	7週	122	1.6	98.4	0.0	3	25	63	31.4	不含顆粒	10368
	19週	118	1.5	98.4	0.1	3	26	62	31.8	不含顆粒	11654
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.7	97.6	0.7	3	25	63	31.1	不含顆粒	13853
	19週	n.d.	1.7	97.1	1.2	3	24	61	31.6	不含顆粒	12556
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	2.9	94.1	3.1	5	19	59	87.0	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	4.3	88.8	6.9	6	13	55	211.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定

調配物G係於pH 6.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM檸檬酸、120 mM氯化鈉、10 mM甲硫胺酸、0.02%聚山梨醇酯80、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC			渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	126	1.8	98.1	0.0	4	26	62	40.3	不含顆粒	10808
5°C 下振盪	1週	122	1.8	98.2	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	35.6	不含顆粒	9324
25°C 下振盪	1週	125	2.3	97.7	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	35.7	不含顆粒	n.a.
冷凍/ 解凍	(5個循環)	126	1.9	98.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	34.5	不含顆粒	11270
5°C	7週	124	1.8	98.2	0.0	3	24	63	38.5	基本上不含 顆粒	12854
	19週	118	1.7	98.2	0.1	3	26	62	37.6	不含顆粒	11202
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.9	97.4	0.7	2	24	63	40.2	基本上不含 顆粒	11645
	19週	n.d.	2.1	96.9	1.1	3	24	60	36.9	不含顆粒	14233
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	3.1	94.3	2.6	5	19	58	101.0	基本上不含 顆粒	n.d.
	19週	n.d.	4.8	89.4	5.8	7	12	52	385.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定

調配物H係於pH 6.5下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM檸檬酸、210 mM海藻糖二水合物、10 mM甲硫胺酸、0.06%聚山梨醇酯80、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC			渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	127	2.0	98.0	0.0	3	26	62	33.4	不含顆粒	11951
5°C 下振盪	1週	128	1.9	98.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	30.3	不含顆粒	10936
25°C 下振盪	1週	127	1.9	98.0	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	29.7	不含顆粒	12595
冷凍/解凍	(5個循環)	127	1.9	98.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	32.0	不含顆粒	11442
5°C	7週	124	1.8	98.2	0.0	3	24	63	33.8	不含顆粒	11723
	19週	122	1.7	98.2	0.1	3	26	62	30.8	不含顆粒	12180
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	2.0	97.3	0.7	3	25	62	30.8	不含顆粒	12328
	19週	n.d.	2.1	96.9	1.1	4	24	60	31.4	不含顆粒	12017
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5	20	58	84.8	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7	11	50	295.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定



調配物I係於pH 6.0下具有組成120 mg/ml利妥昔單抗、20 mM L-組胺酸、120 mM氯化鈉、10 mM甲硫胺酸、0.04%聚山梨醇酯80、12,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC			渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	Fab NS clips a+b (%)	Fc-Lys (%)	Fab pE/Q (%)			
-	初始	123	1.7	98.3	0.0	3	25	62	34.0	不含顆粒	11022
5°C 下振盪	1週	125	1.6	98.3	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	33.3	不含顆粒	12231
25°C 下振盪	1週	124	1.7	98.3	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	32.1	不含顆粒	8371
冷凍/ 解凍	(5個循環)	123	1.8	98.1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	32.9	不含顆粒	12058
5°C	7週	122	1.6	98.4	0.0	3	25	62	33.5	不含顆粒	11108
	19週	119	1.6	98.4	0.1	3	26	62	34.4	不含顆粒	11548
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
25°C	7週	n.d.	1.7	97.7	0.6	3	25	62	34.8	不含顆粒	12679
	19週	n.d.	1.8	97.2	1.1	4	24	60	34.6	不含顆粒	13252
	26週	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	不含顆粒	n.d.
40°C	7週	n.d.	2.5	94.9	2.6	5	20	58	88.1	不含顆粒	n.d.
	19週	n.d.	3.7	90.4	5.9	7	14	53	292.0	不含顆粒	n.d.

n.d. 未測定



調配物J係於pH 6.0下具有組成25 mg/ml GA101 (huMAb<CD20>)、20 mM L-組胺酸、240 mM海藻糖二水合物、0.02%泊洛沙姆188、2,000 U/ml rHuPH20之液體調配物。

儲存溫度/應激 條件	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		渾濁度 (FTU)	可見顆粒	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性區 (%)	主要峰 (%)			
-	初始	25.1	0.6	98.5	0.9	18.5	68.6	6.0	不含顆粒	1833
-20°C	26週	26.2	0.6	98.6	0.8	18.7	68.3	5.8	不含顆粒	2078
5°C	26週	25.7	0.7	98.4	0.9	19.1	67.9	5.6	不含顆粒	1380
25°C	26週	25.9	0.9	97.3	1.9	26.7	60.8	6.0	不含顆粒	978
40°C	26週	26.1	3.0	86.8	9.7	40.9	19.5	7.2	基本上不含顆粒	<定量之限制

n.d. 未測定

實例2：人類化2H7抗-CD20液體調配物之製備

為製備液體調配物，將重組人類化2H7抗-CD20抗體(2H7.v16，如WO 2006/084264中所揭示)針對含有預期緩衝液組合物之透析過濾緩衝液進行緩衝液交換，且若需要濃縮至約60 mg/ml及120 mg/ml之抗體濃度。在達成目標濃度後，隨後向抗體溶液中添加作為儲存溶液之賦形劑(例如，海藻糖、rHuPH20、聚山梨醇酯20)。最終，用最終調配物緩衝液將蛋白濃度調節至約30 mg/ml、50 mg/ml及100 mg/ml之人類化2H7濃度。

所有調配物均經0.22 μm低蛋白質結合過濾器無菌過濾並以無菌方式填充至用氟樹脂層壓丁基橡膠塞填塞且用鋁/塑膠撕開型(flip-off)密封封蓋之無菌3 ml玻璃小瓶中。填充體積係約1.2 ml。將該等調配物於不同溫度(5℃、25℃及40℃)下儲存不同時間間隔。在每一穩定性時間點時藉由以下分析方法分析該等試樣：

- 1) UV分光光度計；
- 2)尺寸排除層析(SEC)；
- 3)離子交換層析(IEC)；
- 4)用於人類化2H7活性之補體依賴性細胞毒性(CDC)分析；
- 5)用於rHuPH20活性之比濁度分析。

1).藉由紫外吸收光譜使用Agilent 8453分光光度計在240 nm至400 nm之波長範圍內測定蛋白濃度。將試樣利用相應調配物緩衝液以重量分析法稀釋至約0.5 mg/ml。使用等式1計算蛋白濃度：

$$\text{蛋白濃度} = ((A_{\max} - A_{320}) \times DF) / (\epsilon(\text{cm}^2/\text{mg}) \times d(\text{cm})) \quad (\text{等式1})$$

其中DF係稀釋因子，d係試管路徑長度且ε係消光係數，於

$A_{\max}$ 下針對 2H7 係 $1.75 \text{ (cm}^2/\text{mg}^{-1})$ 。針對 320 nm 下之光散射校正於 $A_{\max}$ (通常 278 nm 至 280 nm) 下之 UV 光吸收且乘以稀釋因子，其係自淨試樣之稱重質量及密度及稀釋緩衝液確定。分子除以試管之路徑長度 d 與消光係數 ϵ 的乘積。

2). 使用尺寸排除層析 (SEC) 檢測調配物中可溶性高分子量物質 (聚集體) 及低分子量水解產物 (片段)。在配備有 UV 檢測器 (檢測波長 280 nm) 及 TSK G3000SWXL 管柱 ($7.8 \times 300 \text{ mm}$) 之 Agilent Technologies 公司 1100 系列 HPLC 上實施 SEC。完整單體聚集且使用 0.20 M 磷酸鉀及 0.25 M 氯化鉀 (pH 6.2) 以 0.3 ml/min 之流速藉由等度洗脫曲線分離水解產物。

3). 實施離子交換層析 (IEC) 以檢測改變調配物中之抗-CD20 抗體的淨電荷之化學降解產物。出於此目的，使抗-CD20 抗體與羧肽酶 B 一起培育以催化鹼性胺基酸之水解。在具有 UV 檢測器 (檢測波長 280 nm) 及 Dionex ProPac WCX-10 ($4 \times 250 \text{ mm}$) 管柱之 Agilent Technologies 公司 1100 系列 HPLC 上實施離子交換層析。使用 25 mM 磷酸鉀 (pH 6.9) (流動相 A) 及溶解於 25 mM 磷酸鉀中之 120 mM 氯化鉀 (流動相 B) 之線性梯度以 0.5 mL/min 之流速分離酸性及鹼性變化形式。

4). 實施補體依賴性細胞毒性 (CDC) 分析以測定抗-CD20 抗體之活體外活性。在人類補體存在下使用補體依賴性細胞毒性 (CDC) 效能分析量測抗體裂解人類 B 成淋巴細胞樣 (WIL2-S) 細胞的能力。該分析係在 96 孔組織培養微量滴定板中實施。在此分析中，在固定量人類補體存在下將稀釋於分析稀釋劑中之不同濃度的抗-CD20 抗體參考物質、對照或試樣與 WIL2-S 細胞 (50,000 個細胞/孔) 一起培育。將板於 37°C / 5% CO_2 下在增濕培育箱中培育 1 至 2 小時。在培育階段結束時，向每一孔中添加 50 μL

氧化還原染料 ALAMARBLUE™ 且將板培育 15 至 26 小時。ALAMARBLUE™ 係在由活細胞還原時在 530 nm 之激發波長及 590 nm 之發射波長下發螢光的氧化還原染料。因此，顏色及螢光變化與可見細胞之數量成正比。繪製結果(以相對螢光單位(RFU)表示)對抗-CD20抗體濃度之圖且使用並行線圖估計相對於參考材料之抗-CD20抗體試樣的活性。

5).使用比濁度分析測定透明質酸酶活性及酶濃度。此方法係基於當透明質酸結合酸化血清白蛋白時不可溶沉澱之形成。簡言之，在酶稀釋劑(70 mM NaCl、25 mM PIPES(pH 5.5)、0.66 mg/ml明膠水解物、0.1%人類血清白蛋白)中製備範圍為2.5 U/ml至0.25 U/ml之rhuPH20透明質酸酶(Halozyme公司)工作參考標樣之稀釋系列。將測試試樣在酶稀釋劑中稀釋至1.5 U/ml之最終濃度。將30 µl標準及試樣稀釋物轉移至「黑色透明底部」96孔板(Nunc)中。隨後覆蓋該板並於37℃下預熱5分鐘。隨後藉由添加30 µl預熱之0.25 mg/ml透明質酸受質溶液(70 mM NaCl、25 mM PIPES(pH 5.5)、0.25 mg/ml乾燥透明質酸鈉(Lifecore Biomedical))起始反應。對板進行短暫振盪並於37℃下培育10分鐘。在此培育步驟之後，藉由添加240 µl血清工作溶液(2.5%馬血清、500 mM乙酸鉀，pH 4.25)終止反應。在室溫下之30分鐘形成階段後，在640 nm波長下使用微量板讀數器量測反應之渾濁度。自透明質酸受質上之酶活性產生的渾濁度降低係透明質酸酶活性之量度。相對於利用rhuPH20工作參考標樣之稀釋物產生的校準曲線測定試樣活性。

利用不同人類化2H7抗體調配物獲得之結果示於下表中：

調配物 K 係於 pH 5.3 下具有組成 30 mg/ml 人類化 2H7、30 mM 乙酸鈉、8% 海藻糖二水合物、0.02% 聚山梨醇酯 20、0 U/ml rhuPH20 之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
5℃	初始	32	0.9	98.9	0.2	27.1	67.5	103	ND
	12週	ND	0.8	98.1	1.1	27.8	65.9	110	ND
	24週	ND	0.8	98.1	1.1	25.6	68.1	89	ND
	36週	ND	0.9	98.6	0.5	27.0	68.3	97	ND
	48週	ND	1.0	97.4	1.6	25.9	68.3	96	ND
	72週	ND	0.9	97.9	1.2	25.2	68.2	109	ND
25℃	96週	ND	0.9	97.8	1.3	28.1	66.1	96	ND
	4週	ND	0.7	98.0	1.2	29.5	64.7	ND	ND
	8週	ND	0.8	97.7	1.5	32.5	61.9	ND	ND
	12週	ND	0.8	97.4	1.8	35.0	59.1	83	ND
	24週	ND	1.0	96.8	2.2	40.9	52.1	ND	ND
	2週	ND	0.7	97.8	1.6	36.0	57.7	ND	ND
40℃	4週	ND	0.8	96.6	2.5	45.1	47.4	ND	ND
	8週	ND	1.0	94.9	4.1	60.3	33.3	ND	ND

*ND 未測定



調配物L係於pH 5.3下具有組成30 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、1500 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	32	0.9	98.9	0.2	27.1	67.4	114	1309
	12週	ND	0.8	97.9	1.3	27.6	65.7	110	1520
	24週	ND	0.8	98.1	1.2	26.1	67.1	82	1112
	36週	ND	0.9	97.3	1.8	27.0	67.9	98	1166
	48週	ND	0.9	97.3	1.8	26.2	67.9	100	1620
	72週	ND	0.9	97.9	1.3	26.0	68.2	97	ND
5°C	96週	ND	0.9	97.8	1.3	28.1	66.0	96	ND
	4週	ND	0.7	98.0	1.3	29.5	64.7	ND	1147
	8週	ND	0.8	97.8	1.4	32.1	61.9	ND	847
	12週	ND	0.8	97.3	1.9	35.1	59.3	89	892
	24週	ND	1.0	96.8	2.2	41.3	51.9	ND	777
	2週	ND	0.8	97.6	1.6	35.3	57.4	ND	ND
25°C	4週	ND	0.8	96.7	2.4	45.2	46.9	ND	ND
	8週	ND	1.0	95.0	4.0	59.8	34.3	ND	ND
40°C									

*ND 未測定

調配物 M 係於 pH 5.3 下具有組成 30 mg/ml 人類化 2H7、30 mM 乙酸鈉、8% 海藻糖二水合物、0.02% 聚山梨醇酯 20、12,000 U/ml rhuPH20 之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
5℃	初始	33	0.9	98.9	0.2	27.2	67.4	103	10584
	12週	ND	0.8	97.7	1.6	26.5	66.8	111	8864
	24週	ND	0.8	97.8	1.4	25.8	68.1	85	14319
	36週	ND	0.8	97.5	1.7	27.1	68.0	96	11408
	48週	ND	0.9	96.7	2.4	26.2	67.9	95	13817
	72週	ND	0.9	97.6	1.6	26.4	68.0	98	ND
25℃	96週	ND	0.9	97.4	1.6	28.3	65.8	108	ND
	4週	ND	0.8	97.7	1.5	29.6	64.7	ND	13464
	8週	ND	0.8	97.4	1.7	32.1	61.9	ND	10975
	12週	ND	0.9	97.0	2.1	35.4	58.7	92	10394
	24週	ND	1.0	96.5	2.5	41.0	51.8	ND	819
	2週	ND	1.1	97.3	1.6	35.7	57.2	ND	ND
40℃	4週	ND	0.8	96.6	2.5	45.5	47.5	ND	ND
	8週	ND	1.0	94.9	4.1	59.9	33.3	ND	ND

*ND 未測定

調配物N係於pH 5.3下具有組成50 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、0 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性 (U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	50	0.9	98.9	0.2	27.0	67.6	107	ND
	12週	ND	0.9	98.1	1.0	26.9	66.6	86	ND
	24週	ND	0.9	97.9	1.1	25.8	67.7	88	ND
	36週	ND	1.0	97.9	1.1	27.1	68.5	92	ND
	48週	ND	1.0	97.8	1.2	26.2	67.8	95	ND
	72週	ND	1.0	97.8	1.2	26.5	67.9	101	ND
5°C	96週	ND	1.1	97.6	1.3	28.4	65.8	98	ND
	4週	ND	0.9	97.9	1.2	29.5	64.9	ND	ND
	8週	ND	0.9	97.6	1.5	32.1	61.8	ND	ND
	12週	ND	1.0	97.4	1.6	35.3	58.9	86	ND
	24週	ND	0.9	97.9	1.1	40.0	52.8	ND	ND
	2週	ND	0.9	97.5	1.6	35.3	56.9	ND	ND
40°C	4週	ND	1.1	96.2	2.7	45.2	47.8	ND	ND
	8週	ND	1.4	94.1	4.4	59.7	32.9	ND	ND

*ND 未測定

調配物O係於pH 5.3下具有組成50 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、1500 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度(mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	51	0.9	98.9	0.2	27.1	67.4	116	1537
	12週	ND	0.9	97.8	1.3	25.8	67.4	109	1454
5°C	24週	ND	0.9	97.9	1.2	26.0	67.7	84	1372
	36週	ND	1.0	97.5	1.5	27.7	67.3	93	1432
	48週	ND	1.1	97.0	2.0	26.0	68.4	102	1356
	72週	ND	1.1	97.6	1.4	26.5	68.0	97	ND
	96週	ND	1.2	97.6	1.3	28.2	65.9	104	ND
25°C	4週	ND	0.9	97.9	1.3	29.7	64.6	ND	1269
	8週	ND	0.9	97.4	1.6	32.1	62.0	ND	966
	12週	ND	1.0	97.5	1.5	35.2	58.9	89	1002
	24週	ND	1.3	96.5	2.2	40.5	52.2	ND	ND
40°C	2週	ND	0.9	97.5	1.6	35.9	56.1	ND	ND
	4週	ND	1.1	96.3	2.6	46.5	45.7	ND	ND
	8週	ND	1.4	94.6	4.0	60.5	31.9	ND	ND

*ND 未測定



調配物P係於pH 5.3下具有組成50 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、12,000 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度(mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	52	0.9	98.9	0.2	27.2	67.4	110	9932
5°C	12週	ND	0.9	97.7	1.4	26.8	67.6	102	9668
	24週	ND	0.9	97.7	1.4	25.7	68.2	ND	11292
	36週	ND	1.0	97.5	1.5	27.5	67.0	96	15469
	48週	ND	1.1	97.4	1.6	26.1	68.2	100	10832
	72週	ND	1.0	97.7	1.3	26.3	68.0	106	ND
	96週	ND	1.2	97.4	1.5	29.3	64.8	100	ND
25°C	4週	ND	0.9	97.6	1.5	29.7	64.6	ND	11765
	8週	ND	1.0	97.6	1.4	32.3	61.9	ND	11594
	12週	ND	1.1	97.1	1.8	35.4	58.8	86	10119
	24週	ND	1.2	96.4	2.4	41.1	51.8	ND	8960
40°C	2週	ND	1.1	97.3	1.6	35.9	55.5	ND	ND
	4週	ND	1.1	96.4	2.5	44.9	46.5	ND	ND
	8週	ND	1.4	94.5	4.1	60.4	33.2	ND	ND

*ND 未測定

調配物 Q 係於 pH 5.3 下具有組成 100 mg/ml 人類化 2H7、30 mM 乙酸钠、8% 海藻糖二水合物、0.02% 聚山梨醇酯 20、0 U/ml rhuPH20 之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度(mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	102	1.0	98.8	0.2	27.2	67.5	101	ND
	12週	ND	1.2	97.7	1.1	26.7	68.0	106	ND
5℃	24週	ND	1.3	97.6	1.2	25.8	67.5	84	ND
	36週	ND	1.3	97.2	1.5	27.4	67.4	95	ND
	48週	ND	1.3	97.2	1.6	26.2	68.3	89	ND
	72週	ND	1.4	97.4	1.2	26.4	68.3	106	ND
	96週	ND	1.5	97.2	1.2	28.1	66.4	96	ND
	4週	ND	1.2	97.5	1.2	31.0	63.7	ND	ND
25℃	8週	ND	1.5	97.2	1.4	32.4	61.9	ND	ND
	12週	ND	1.6	96.7	1.7	35.4	58.9	90	ND
	24週	ND	1.9	96.0	2.1	40.6	52.1	ND	ND
	2週	ND	1.4	97.1	1.6	35.4	57.7	ND	ND
40℃	4週	ND	1.8	95.5	2.7	45.6	47.3	ND	ND
	8週	ND	2.3	93.5	4.3	60.3	32.9	ND	ND

*ND 未測定

調配物R係於pH 5.3下具有組成100 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、1500 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC			離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%		
-	初始	101	1.0	98.8	0.2	27.3	67.5	98	1389
	12週	ND	1.2	97.7	1.2	25.3	67.7	104	1655
	24週	ND	1.3	97.6	1.2	26.0	67.6	82	1381
	36週	ND	1.3	96.6	2.2	26.7	68.7	95	1644
	48週	ND	1.3	96.5	2.2	26.2	68.2	94	1381
	72週	ND	1.4	97.5	1.2	26.7	68.1	106	ND
5°C	96週	ND	1.5	97.2	1.3	28.1	66.2	95	ND
	4週	ND	1.2	97.5	1.2	29.2	64.2	ND	1376
	8週	ND	1.4	97.3	1.3	32.5	60.4	ND	1018
	12週	ND	1.6	96.9	1.5	35.3	58.9	91	942
	24週	ND	1.9	96.0	2.2	40.7	53.8	ND	616
	2週	ND	1.3	97.1	1.5	35.8	55.8	ND	ND
40°C	4週	ND	1.8	95.6	2.7	45.8	47.6	ND	ND
	8週	ND	2.3	93.6	4.0	59.3	32.4	ND	ND

*ND 未測定

調配物S係於pH 5.3下具有組成100 mg/ml人類化2H7、30 mM乙酸鈉、8%海藻糖二水合物、0.02%聚山梨醇酯20、12,000 U/ml rhuPH20之液體調配物。

儲存溫度	儲存時間	蛋白濃度 (mg/ml)	尺寸排除-HPLC		離子交換-HPLC		CDC效能 (特異活性%)	酶活性(U/ml)
			HMW (%)	單體 (%)	LMW (%)	酸性變化形式%	主要峰%	
5°C	初始	101	1.0	98.8	0.2	27.4	67.4	11692
	12週	ND	1.1	97.6	1.2	25.8	68.1	10599
	24週	ND	1.2	97.6	1.2	26.1	67.2	11946
	36週	ND	1.2	97.1	1.7	26.1	69.3	14894
	48週	ND	1.3	97.0	1.8	25.7	68.4	11820
	72週	ND	1.4	97.4	1.3	26.4	68.3	ND
	96週	ND	1.5	97.1	1.4	28.1	66.2	ND
25°C	4週	ND	1.3	97.4	1.3	29.8	64.6	11897
	8週	ND	1.4	97.1	1.4	32.5	61.6	11117
	12週	ND	1.5	96.6	1.8	35.5	58.7	10763
	24週	ND	1.9	95.9	2.3	41.1	51.1	7783
40°C	2週	ND	1.4	97.0	1.6	35.6	55.9	ND
	4週	ND	1.8	95.6	2.6	46.0	48.0	ND
	8週	ND	2.2	93.8	4.0	61.4	32.7	ND

*ND 未測定

實例3：利用調配物之患者的治療

含有利妥昔單抗之方案已成為護理患有不同CD20-陽性B細胞惡性腫瘤之患者的標準。目前，利妥昔單抗係以靜脈內(IV)輸注形式經若干小時投與。該等長輸注時間及與輸注有關之副作用由一些患者作為目前治療性治療之不舒適結果得以引證。此外，確認靜脈內通路所需之程序被視為有侵害性且可為疼痛的，尤其係在患有惡性疾病且經重複治療之患者中。皮下(SC)投與可明顯簡化治療，此將投與縮短至小於10分鐘並改良患者經歷。已開發並批准重組人類透明質酸酶(rHuPH20)以改良共投與之藥物的分散及吸收。其已與利妥昔單抗組合以使可安全並舒適地SC投與大於10 mL之注射體積。此治療之目的係選擇給予與IV利妥昔單抗相當暴露之如實例1製備之具有rHuPH20之SC利妥昔單抗調配物(調配物A)的劑量及評定其在維持治療期間在雄性及雌性濾泡淋巴瘤(FL)患者中之安全及耐受性。

此實例提供來自隨機、開放性、多中心適應期Ib研究之階段1數據。將124例患者隨機至四個利妥昔單抗維持治療組中之一者：16例患者IV對照、34例患者SC投藥1 (375 mg/m²)、34例患者SC投藥2 (625 mg/m²)及40例患者SC投藥3 (800 mg/m²)。在隨機化之前，在維持情況下用至少一次IV利妥昔單抗投藥以375 mg/m²治療符合條件之患者。對於隨機化至SC小組中之一者之患者而言，由SC投藥替換單次IV投藥。按照局部實踐，患者以每2個月(q2m)或每3個月(q3m)方案接受利妥昔單抗。自總共119例患者獲得安全數據。利妥昔單抗SC通常耐受良好。未報告臨床顯著觀察或治療有關之嚴重不良事件。在46 (39%)例患者中總共報告95例不良事件(AE)。最常見文獻記載之AE係「投與相關反應」(AAR，包括疹、紅斑及輕微不適)。該等AAR係可逆

的、強度相當溫和且僅有1例事件需要任一治療(用於噁心之甲氧氯普胺(metoclopramide))。總之，AE曲線並未顯著不同於利用利妥昔單抗IV治療之患者中所預計者(僅次於AAR之最常見事件係胃腸病症及輕微感染)。在4個單獨患者中報告4個嚴重不良事件(SAE)，所有均報告為與研究藥物無關。無導致死亡、撤停或治療中斷之AE。

每一患者中SC投與之總體積介於4.4 mL與15.0 mL之間。平均注射持續時間係2 mL/min。SC組中之利妥昔單抗最大血清濃度出現在第2天與第8天(第48 h與第168 h)之間。關於在所投與SC劑量範圍內(375 mg/m²、625 mg/m²及800 mg/m²)之投藥，藥物代謝動力學參數係線性。將SC投與625 mg/m²利妥昔單抗之患者中第28天之利妥昔單抗濃度(C₂₈)及血清暴露程度(AUC₀₋₅₇)與彼等投與375 mg/m² SC之標準利妥昔單抗IV劑量的患者中者進行比較。

總而言之，皮下利妥昔單抗可快速、舒適且安全地遞送，同時在維持治療期間在FL患者中達成與經批准靜脈內調配物相當之血清暴露。患者的感受係效果良好。該等結果支持皮下利妥昔單抗之其他測試且在試驗之第2階段選擇1400 mg利妥昔單抗SC之固定劑量用於形式C_{trough}不劣性測試(C_{trough} non-inferiority testing)。

實例4：患有濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤之患者中之利妥昔單抗SQ對利妥昔單抗IV

用利用以下之維持治療來治療患有先前未經治療之濾泡性(低等級)淋巴瘤之患者：(a)利妥昔單抗SC調配物(根據實例1製備，調配物A)與CHOP或CVP組合，或(b)利妥昔單抗IV與CHOP或CVP組合。

患者將經隨機化以接受靜脈內輸注之375 mg/m²利妥昔單抗或皮下給予之1400 mg利妥昔單抗。另外，患者接受標準化學療法(CVP或CHOP)。在8個治療循環後達成完全或部分效應之患者接受維持治療達12個循環之又一最大數。每8週重複維持治療循環。關於研究治療之預期時間係96週。

期望每8週利用1400 mg SQ利妥昔單抗抗-CD20抗體之治療作為維持治療持續高達12個循環以安全且有效地治療濾泡性淋巴瘤，其視情況與化學療法(包括CHOP或CVP)組合。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其包含：
 - a. 約50 mg/ml至350 mg/ml抗-CD20抗體；
 - b. 約1 mM至100 mM緩衝劑，其提供 5.5 ± 2.0 之pH；
 - c. 約1 mM至500 mM穩定劑或兩種或更多種穩定劑之混合物；
 - d. 約0.01%至0.1%非離子型表面活性劑；及
 - e. 視情況選用有效量之至少一種透明質酸酶。
2. 如請求項1之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該抗-CD20抗體濃度係100 mg/ml至150 mg/ml，較佳 120 ± 20 mg/ml。
3. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其包含約1'000 U/ml至16'000 U/ml，較佳約2'000 U/ml或12'000 U/ml透明質酸酶。
4. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該緩衝劑之濃度係1 mM至50 mM。
5. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該緩衝劑提供5.5至6.5，較佳選自由5.5、6.0、6.1及6.5組成之群之pH。
6. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該緩衝劑係組胺酸緩衝液。
7. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該穩定劑係糖類，例如 α, α -海藻糖二水合物或蔗糖。
8. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該穩定劑之濃度係15 mM至250 mM。

9. 如請求項7之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中使用甲硫胺酸作為第二穩定劑。
10. 如請求項9之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中甲硫胺酸係以5 mM至25 mM之濃度存在。
11. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該非離子型表面活性劑係較佳選自由聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80組成之群之聚山梨醇酯、及聚乙烯-聚丙烯共聚物。
12. 如請求項11之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該聚山梨醇酯之濃度係0.02% (w/v)至0.08% (w/v)。
13. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該透明質酸酶係rHuPH20。
14. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該抗-CD20抗體係利妥昔單抗(Rituximab)。
15. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該抗-CD20抗體係奧瑞珠單抗(Ocrelizumab)。
16. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其中該抗-CD20抗體係HuMab<CD20>。
17. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其在冷凍及解凍時穩定。
18. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其用於皮下或肌肉內投與。
19. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其呈液體形式。
20. 如請求項1或2之醫藥活性抗-CD20抗體之高濃縮的穩定醫藥調配物，其呈凍乾形式。
21. 一種如請求項1至20中任一項之調配物的用途，其用於製備適用

於治療個體中可接受抗-CD20抗體治療的疾病或病症(較佳為癌症或非惡性疾病)的藥劑。

22. 如請求項21之用途，其中該調配物係與化學療法同時或依序共投與。