

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.06.16	(73) Titular(es): MEDIMMUNE, LLC ONE MEDIMMUNE WAY GAITHERSBURG, MD 20878 US
(30) Prioridade(s): 2002.06.14 US 388921 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.07.14	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.03.25 139/2015	(72) Inventor(es): CYNTHIA N. OLIVER US ERICA SHANE US BENJAMIN S. ISSAACS US CHRISTIAN B. ALLAN US STEPHEN CHANG US
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV**

(57) Resumo:

PRESENTE INVENÇÃO FORNECE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE SYNAGIS® OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO, QUE SE LIGA DE FORMA IMUNOESPECÍFICA A UM ANTIGÉNIO DE UM VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (RSV), CUJAS FORMULAÇÕES APRESENTAM ESTABILIDADE, BAIXA A NÍVEIS DETETÁVEIS DE AGREGAÇÃO, E MUITO POUCA OU NENHUMA PERDA DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE SYNAGIS® OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO, MESMO DURANTE LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE SYNAGIS® OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO, QUE SE LIGA DE FORMA IMUNOESPECÍFICA A UM ANTIGÉNIO DE RSV, SENDO ESSAS FORMULAÇÕES SUBSTANCIALMENTE LIVRES DE SURFACTANTES, SAIS INORGÂNICOS, E/OU OUTROS EXCIPIENTES COMUNS. ADICIONALMENTE, A INVENÇÃO FORNECE MÉTODOS PARA PREVENIR, TRATAR OU MELHORAR SINTOMAS ASSOCIADOS À INFEÇÃO POR RSV UTILIZANDO FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DA PRESENTE INVENÇÃO.

RESUMO

"FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV"

A presente invenção fornece formulações líquidas de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, que se liga de forma imuno-específica a um antigénio de um vírus sincicial respiratório (RSV), cujas formulações apresentam estabilidade, baixa a níveis detetáveis de agregação, e muito pouca ou nenhuma perda das atividades biológicas de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, mesmo durante longos períodos de armazenamento. Em particular, a presente invenção fornece formulações líquidas de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, que se liga de forma imuno-específica a um antigénio de RSV, sendo essas formulações substancialmente livres de surfactantes, sais inorgânicos, e/ou outros excipientes comuns. Adicionalmente, a invenção fornece métodos para prevenir, tratar ou melhorar sintomas associados à infeção por RSV utilizando formulações líquidas da presente invenção.

DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV"

Descrição

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção refere-se a processos para a preparação de formulações líquidas de palivizumab[®] ou de um fragmento de ligação antigénio do mesmo, exibindo as referidas formulações estabilidade, níveis baixos a indetetáveis de agregação, e muito pouca a nenhuma perda de atividade biológica (e.g., eficácia terapêutica) de palivizumab[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, mesmo durante ou após longos períodos de armazenamento. De um modo particular, a presente invenção refere-se a processos para a preparação de formulações líquidas de palivizumab[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, cujas formulações são substancialmente livres de surfactantes e/ou sais inorgânicos. São também divulgados métodos para prevenir, tratar ou melhorar os sintomas associados à infeção por vírus sincicial respiratório (RSV) utilizando formulações líquidas de palivizumab[®] ou de um fragmento de ligação antigénio do mesmo.

2. ESTADO DA TÉCNICA DA INVENÇÃO

O vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa líder de sérias doenças do trato respiratório inferior em bebés e crianças (Feigen et al., eds., 1987, em: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, WB Saunders, Philadelphia nas páginas 1653-1675; New Vaccine Development, Establishing Priorities, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington DC nas páginas 397-409; e Ruuskanen et

al., 1993, *Curr. Probl. Pediatr.* 23:50-79). A natureza epidémica anual da infeção por RSV é evidente a nível mundial, mas a incidência e severidade da doença de RSV numa dada época varia consoante a região (Hall, C.B., 1993, *Contemp. Pediatr.* 10:92-110). Em regiões temperadas do hemisfério norte, de um modo normal começa no final do Outono e termina no final da Primavera (Hall, C.B., 1995, em: Mandell G.L., Bernnett J.E., Dolin R., eds., 1995, *Principles and Practice of Infections Diseases*. 4ª ed., Churchill Livingstone, Nova Iorque nas páginas 1501 - 1519). É estimado que a doença por RSV resulte em 90 000 hospitalizações e cause 4 500 mortes anualmente nos Estados Unidos. A infeção primária por RSV ocorre de um modo mais frequente em crianças desde 6 semanas até 2 anos de idade e de um modo incomum nas primeiras 4 semanas de vida durante a epidemia nosocomial. (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396). Estima-se que a RSV cause tanto quanto 75% de todas as bronquiolites infantis e até cerca de 40% de todas as pneumonias pediátricas (Cunningham, C.K. et al., 1991, *Pediatrics* 88:527-532). As crianças em risco aumentado de infeção por RSV incluem bebés prematuros (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396) e crianças com displasia broncopulmonar (Groothuis et al., 1988, *Pediatrics* 82:199-203), doença cardíaca congénita (MacDonald et al., *New Engl. J. Med.* 307:397-400), imunodeficiência congénita ou adquirida (Ogra et al., 1988, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 7:246-249; e Pohl et al., 1992, *J. Infect. Dis.* 165:166-169), e fibrose quística (Abman et al., 1988, *J. Pediatr.* 113:826-830). A taxa de fatalidade em bebés com doença cardíaca ou pulmonar que estão hospitalizados com infeção por RSV é de 3% - 4% (Navas et al., 1992, *J. Pediatr.* 121:348-354).

Adultos infetados bem como bebés e crianças. Em adultos saudáveis, o RSV causa de um modo predominantes doença do

trato respiratório superior. Tem sido recentemente tornado evidente que alguns adultos, de um modo especial os idosos, têm infecções por RSV sintomáticas de um modo mais frequente que o previamente reportado (Evans, A.S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3ª ed., Plenum Medical Book, Nova Iorque nas páginas 525-544). Várias epidemias têm também sido descritas entre doentes de clínicas e jovens adultos institucionalizados (Falsey, A.R., 1991, *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12:602-608; e Garvie et al., 1980, *Br. Med. J.* 281:1253-1254). Finalmente, o RSV pode causar uma doença grave em pessoas imunossuprimidas, de um modo particular doentes que sofreram um transplante de medula óssea (Hertz et al., 1989, *Medicine* 68:269-281).

As opções de tratamento para a doença por RSV estabilizada são limitadas. A doença RSV severa do trato respiratório inferior requer de um modo frequente cuidados de suporte consideráveis, incluindo a administração de oxigênio humidificado e assistência respiratória (Fields et al., eds, 1990, *Fields Virology*, 2ª ed., Vol. 1, Raven Press, Nova Iorque nas páginas 1045-1072). O único fármaco aprovado para o tratamento da infecção é o agente antiviral ribavirina (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 1993, *Pediatrics* 92:501-504). Tem vindo a ser demonstrado como sendo eficaz no tratamento de pneumonia e bronquiolite por RSV, modificando o curso da doença severa de RSV em crianças imunocompetentes (Smith et al., 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Contudo, a ribavirina tem um número de limitações incluindo o elevado custo, necessidade de administração prolongada de aerossóis e potencial risco para mulheres grávidas bem como para profissionais de saúde que sofram exposição. A Academia Americana do Comité de Pediatria em Doenças Infeciosas reviu as suas recomendações quanto à utilização de

ribavirina. A recomendação corrente é que a decisão para utilizar ribavirina deveria ser baseada nas circunstâncias clínicas particulares e na experiência dos médicos (American Academy of Pediatrics, Summaries of Infectious Diseases. Em: Pickering L.K., ed., 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25^a ed., Elk Grove Village, IL, American Academy of Pediatrics, 2000, pág. 483-487).

Apesar de uma vacina poder prevenir a infecção por RSV, não se encontra ainda licenciada qualquer vacina para esta indicação. Um grande obstáculo para o desenvolvimento da vacina é a segurança. Uma vacina inativada por formalina, apesar de imunogénica, causou de um modo inesperado uma incidência maior e mais severa da doença do trato respiratório inferior devido a RSV em bebés imunizados do que em bebés imunizados com uma vacina contra parainfluenza preparada de um modo semelhante. (Kim et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:422-434; e Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:405-421). Têm sido abandonados vários candidatos a vacina contra RSV e outros encontram-se em desenvolvimento (Murphy et al., 1994, Virus Res. 32:13-36), mas até mesmo se os aspetos de segurança fossem resolvidos, a eficácia da vacina também deve ser melhorada. Ainda permanecem vários problemas para resolver. A imunização iria ser requerida no período neonatal imediato uma vez que o pico da incidência do trato respiratório inferior ocorre entre os 2 - 5 meses de idade. A imaturidade das respostas imunitárias neonatais juntamente com as altas titulações de anticorpos de RSV adquiridos por via materna podem fazer esperar uma redução na imunogenicidade da vacina no período neonatal (Murphy et al., 1988, J. Virol. 62:3907-3910; e Murphy et al., 1991, Vaccine 9:185-189). Finalmente, a infecção por RSV e doença primárias não protegem bem contra

a doença RSV subsequente (Henderson et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:530-534).

De um modo concorrente, a única abordagem aprovada para a profilaxia da doença RSV é a imunização passiva. Evidências iniciais sugerem que foi identificado um papel protetor para a IgG a partir de observações envolvendo anticorpos de origem materna em furões (Prince, G.A., Ph.D. diss., University of California, Los Angeles, 1975) e humanos (Lambrecht et al, 1976, *J. Infect. Dis.* 134:211-217; e Glezen et al., 1981, *J. Pediatr.* 98:708-715). Hemming et al. (Morell et al., eds., 1986, *Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins*, Academic Press, London nas páginas 285-294) reconheceu a possível utilidade de anticorpos RSV no tratamento ou prevenção de infecção por RSV durante estudos envolvendo a farmacocinética de uma globulina imune intravenosa (IVIG) em recém-nascidos suspeitos de ter sépsis neonatal. Eles notaram que um bebê, cujas secreções respiratórias resultavam em RSV, recuperava rapidamente após a infusão com IVIG. A análise subsequente de um lote de MG revelou titulações anormalmente altas de anticorpo neutralizante de RSV. Este mesmo grupo de investigadores examinou então a capacidade de soro hiperimune de globulina imune, enriquecido para anticorpo neutralizante de RSV, de proteger ratos de algodão e primatas contra a infecção por RSV (Prince et al., 1985, *Virus Res.* 3:193-206; Prince et al., 1990, *J. Virol.* 64:3091-3092; Hemming et al., 1985, *J. Infect. Dis.* 152:1083-1087; Prince et al., 1983, *Infect. Immun.* 42:81-87; e Prince et al., 1985, *J. Virol.* 55:517-520). Os resultados destes estudos sugeriam que um anticorpo neutralizante de RSV dado de um modo profilático inibia a replicação de RSV no trato respiratório em ratos de algodão. Quando dados de modo terapêutico, os anticorpos RSV reduziam a replicação viral pulmonar tanto em ratos de algodão como em modelos primatas não-humanos.

Adicionalmente, a infusão passiva de soro imune ou globulina imune não produziu patologia pulmonar aumentada em ratos de algodão que foram desafiados de um modo subsequente com RSV.

Um anticorpo humanizado dirigido para um epítipo no local antigénico da proteína F de RSV, SYNAGIS[®], que compreende regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada variável (VH) contendo as sequências de aminoácidos de SEQ ID N^o: 4 - 6, é aprovado para administração intramuscular a doentes pediátricos para a prevenção de doenças graves do trato respiratório inferior causadas por RSV em doses mensais recomendadas de 15 mg/kg de peso corporal ao longo da época de RSV (Novembro até Abril no hemisfério Norte). O SYNAGIS[®] é um compósito de sequências de anticorpo humano (95%) e de murino (5%). Ver, Johnson et al., 1997, J. Infect. Diseases 176:1215-1224 e Patente US N^o 5 824 307. A sequência de cadeia pesada humana foi derivada a partir de domínios constantes de IgG₁ humana e as regiões *framework* variáveis dos genes VH de Cor (Press et al., 1970, Biochem. J. 117:641-660) e Cess (Takashi et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:194-198). A sequência de cadeia leve humana foi derivada a partir do domínio constante de C6 e das regiões *framework* variáveis do gene VL K104 com J6-4 (Bentley et al., 1980, Nature 288:5194-5198). As sequências de murino foram derivadas a partir de um anticorpo monoclonal de murino, Mab 1129 (Beeler et al., 1989, J. Virology 63:2941-2950), num processo que envolveu o enxerto das regiões determinantes da complementaridade em *frameworks* de anticorpos humanos.

O SYNAGIS[®] tem uma atividade específica alta contra RSV *in vitro* (aproximadamente 50 - 100 vezes a de RespiGam[®]) e é conhecido como neutralizando uma vasta gama de isolados de

RSV. Uma vez que não é derivado a partir de plasma humano, o tratamento profilático com SYNAGIS® não comporta risco potencial de transmissão de agentes patogénicos transmitidos por via sanguínea.

O SYNAGIS® foi inicialmente formulado sob a forma de líquido para utilização intravenosa, a uma concentração de 10 mg/ml de SYNAGIS® numa solução salina com tampão fosfato. Uma formulação liofilizada de SYNAGIS®, a qual permite uma concentração mais elevada (100 mg/ml após reconstituição, em histidina a 50 mM e tampão de glicina a 3,2 com manitol a 6% (p/v) a um pH de 6,0) do anticorpo que a formulação líquida inicial, foi produzida mais tarde para permitir a utilização intramuscular. A formulação liofilizada de SYNAGIS® é preparada através da liofilização de SYNAGIS® a 54 mg/ml numa solução aquosa contendo histidina a 25 mM, glicina a 1,6 mM, e manitol a 3% (p/v) a um pH de 6,0. A formulação inicial líquida em PBS e a formulação liofilizada de SYNAGIS® foram testadas na fase I de ensaios clínicos em adultos saudáveis. A formulação liofilizada foi testada na fase I até à fase IV dos ensaios em doentes pediátricos. O SYNAGIS®, em doses de 15 mg/kg até 30 mg/kg para adultos foi bem tolerado, e 15 mg/kg para crianças foi seguro e eficaz para a profilaxia de RSV. A formulação liofilizada foi aprovada em 1998 pela FDA para utilização na prevenção de doença grave do trato respiratório causada por RSV em crianças com alto risco de doença RSV.

Contudo, a formulação liofilizada tem um número de limitações, incluindo o processo prolongado para a liofilização e os resultantes custos elevados para a sua produção. De um modo adicional, a formulação liofilizada tem de ser reconstituída de forma asséptica e precisa por parte dos profissionais de saúde anteriormente à sua

administração em doentes. O próprio passo de reconstituição requer determinados procedimentos específicos: (1) um diluente estéril (*i.e.*, água ou dextrose a 5% em água para administração intravenosa e para administração intramuscular) é adicionado ao tubo que contém SYNAGIS[®] liofilizado, devagar e de forma asséptica, e o tubo deve ser agitado de modo muito suave durante 30 segundos de modo a evitar a formação de espuma; (2) o SYNAGIS[®] reconstituído deve permanecer à temperatura ambiente por um mínimo de 20 minutos até a solução aclarar; e (3) a preparação reconstituída deve ser administrada dentro de seis (6) horas após a reconstituição. Tal procedimento de reconstituição é pesado e a limitação de tempo após a reconstituição pode causar grandes inconvenientes na administração da formulação a doentes, levando a desperdícios significativos, se não for reconstituído de forma própria ou se a dose reconstituída não for utilizada dentro de seis (6) horas e tiver de ser descartada.

Assim, existe uma necessidade de uma formulação líquida de SYNAGIS[®] a uma concentração comparável ou superior à da formulação liofilizada reconstituída de forma que não haja necessidade de reconstituir a formulação antes da administração. Isto permite aos profissionais de saúde uma administração muito mais rápida e fácil de SYNAGIS[®] a um doente.

As preparações líquidas de anticorpos anteriores têm prazos de validade curtos e podem perder a atividade biológica dos anticorpos resultante de instabilidades químicas e físicas durante o armazenamento. A instabilidade química pode ser causada por desamidação, racemização, hidrólise, oxidação, eliminação beta ou troca dissulfídica, e a instabilidade física pode ser causada por desnaturação dos anticorpos, agregação, precipitação ou adsorção. De entre estes, a

agregação, desamidação e oxidação são conhecidos como sendo as causas mais comuns da degradação de anticorpos (Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42 (Suppl):S4-S26; Cleland et al., 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4):307-377). Deste modo, existe uma necessidade para uma formulação de líquido estável de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio eficaz na prevenção de infeção por RSV.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada, em parte, no desenvolvimento de um processo para a preparação de formulações líquidas de concentração elevada de palivizumab (SYNAGIS®) ou de um fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1. As formulações exibem, na ausência de surfactante, sais inorgânicos e/ou outros excipientes, estabilidade, níveis baixos a indetetáveis de fragmentação e/ou agregação de anticorpos, e muito pouca a nenhuma perda de atividade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, durante a produção, transporte e armazenamento. As formulações líquidas preparadas a partir do processo da presente invenção facilitam a administração de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio para a prevenção, tratamento, manutenção e/ou melhoria da infeção por RSV ou de um ou mais sintomas da mesma. De um modo particular, as formulações líquidas preparadas a partir do processo da presente invenção permitem aos profissionais de saúde administrar de um modo rápido uma dosagem estéril de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio sem ter de reconstituir de um modo preciso e asséptico o anticorpo ou o fragmento de anticorpo anteriormente à administração tal como é necessário para a forma de dosagem liofilizada. Tais formulações líquidas de SYNAGIS® podem

também ser produzidas mais facilmente e com custos mais eficazes que a formulação liofilizada uma vez que as formulações líquidas não requerem um passo de secagem prolongado, tais como a liofilização, secagem por pulverização, etc. As formulações líquidas são feitas através de um processo através do qual o anticorpo a ser formulado se encontra em fase aquosa ao longo do processo de purificação e formulação. De um modo preferido, as formulações líquidas são feitas através de um processo que não inclui um passo de secagem, por exemplo, mas não por meio de limitação, um passo de liofilização, de secagem por pulverização, atomização ou de secagem ao ar.

Formulações líquidas de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, substancialmente livre de surfactante, sais inorgânicos, açúcares e/ou outros excipientes comuns, podem compreender histidina e uma concentração de cerca de 15 mg/ml ou superior de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio. De um modo opcional, a formulação pode adicionalmente compreender glicina. De um modo alternativo, a formulação pode adicionalmente conter outros excipientes comuns, tais como sacarídeos, polióis e aminoácidos, incluindo, mas não limitados a, arginina, lisina e metionina. A presente invenção também fornece formulações líquidas substancialmente livres de surfactante, sais inorgânicos, açúcares, e/ou outros excipientes comuns, tendo a referida formulação um pH que se encontra no intervalo entre cerca de 5,0 até cerca de 7,0, de um modo preferido cerca de 5,5 a 6,5, de um modo mais preferido cerca de 5,8 a cerca de 6,2, e de um modo ainda mais preferido cerca de 6,0, e compreendendo histidina a uma concentração de cerca de 15 mg/ml ou superior de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio.

As formulações líquidas estáveis de SYNAGIS[®] podem exibir níveis baixos a indetetáveis de fragmentação e/ou agregação de anticorpos com muito pouca a nenhuma perda de atividade(s) biológica(s) de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, durante a produção, transporte e longos períodos de armazenamento. As formulações líquidas estáveis de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio podem ter tempos de validade *in vivo* aumentados quando comparados com SYNAGIS[®] não modificado ou com um seu fragmento de ligação ao antigénio, exibindo as referidas formulações níveis baixos a indetetáveis de fragmentação e/ou agregação de anticorpos e muito pouca a nenhuma perda de atividade(s) biológica(s) de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

As formulações líquidas de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, podem ter estabilidade a 38 °C - 42 °C tal como verificado por cromatografia por exclusão de tamanho de alta eficiência (HPSEC). As formulações líquidas podem apresentar estabilidade, tal como verificado por HPSEC, nos intervalos de temperatura de 38 °C - 42 °C durante pelo menos 60 dias (em formas de realização específicas, não mais de 120 dias), de 20 °C - 24 °C durante pelo menos 1 ano, e de 2 °C -8°C durante pelo menos 3 anos. As formulações líquidas de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, podem ter níveis baixos a indetetáveis de agregação tal como medido por HPSEC. Numa forma de realização preferida, as formulações líquidas da presente invenção apresentam estabilidade a 38 ° -42 °C durante pelo menos 60 dias e apresentam níveis baixos a indetetáveis de agregação de anticorpos tal como medido por HPSEC, e adicionalmente, apresentam muito pouca a nenhuma perda de atividade(s) biológica(s) de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio quando comparados com

anticorpos de referência medidos através de ensaios de ligação de anticorpos tais como, e.g., ELISA.

A presente invenção fornece métodos para a preparação de formulações líquidas de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1. As formulações líquidas da presente invenção são preparadas mantendo SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio numa solução aquosa a qualquer momento durante a preparação. Por outras palavras, as formulações líquidas são preparadas sem o envolvimento de qualquer passo de secagem de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio ou as próprias formulações através de, por exemplo, liofilização, secagem a vácuo, etc.

Métodos para a preparação de formulações líquidas de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, podem compreender concentrar uma fração de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio concentrada a uma concentração final de cerca de 15 mg/ml, cerca de 20 mg/ml, cerca de 30 mg/ml, cerca de 40 mg/ml, cerca de 50 mg/ml, cerca de 60 mg/ml, cerca de 70 mg/ml, cerca de 80 mg/ml, cerca de 90 mg/ml, cerca de 100 mg/ml, cerca de 200 mg/ml, cerca de 250 mg/ml, ou cerca de 300 mg/ml utilizando uma membrana semipermeável com um limite de peso molecular apropriado (pm) (e.g., limite de 30 kD para SYNAGIS[®] e seus fragmentos F(ab')₂; e limite de 10 kD para fragmentos de SYNAGIS[®] tais como fragmentos Fab), e diafiltrando a fração de anticorpos concentrados para a solução tampão da formulação utilizando a mesma membrana. A solução tampão da formulação pode compreender histidina a uma concentração que vai de cerca de 1 mM até cerca de 100 mM, cerca de 10 mM até cerca de 50 mM, cerca de 20 mM até cerca de 30 mM, ou cerca de 23 mM até cerca de 27 mM, e é de um modo mais preferido cerca de 25 mM. De forma a obter um pH apropriado

para SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, é preferível que a histidina (e glicina, se adicionada) seja primeiro dissolvida em água de forma a obter uma solução tampão com um pH maior que o pH desejado e nessa altura o pH é diminuído até ao nível desejado de pH através da adição de HCl. Desta forma, a formulação de sais inorgânicos (e.g., na formação de NaCl quando, e.g., o hidrocloreto de histidina é utilizado como a fonte de histidina e o pH é aumentado até ao nível desejado através da adição de NaOH) pode ser evitada.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser esterilizadas através de uma filtração estéril utilizando um filtro de 0,2 µ ou um de 0,22 µ. As formulações líquidas esterilizadas da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo de forma a prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas associados à infeção por RSV ou um seu sintoma.

Os Kits podem compreender formulações líquidas de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio para utilização por parte de, e.g., um profissional de saúde. Os métodos de prevenção, tratamento, manutenção ou melhoria de uma infeção de RSV ou um ou mais sintomas associados à infeção por RSV ou um seu sintoma podem compreender a administração das formulações líquidas da presente invenção.

3.1 Terminologia

Tal como aqui utilizado, todas as formulações líquidas de SYNAGIS® e/ou seus fragmentos que se ligam de forma imuno-específica a um antigénio de RSV acima referido são referidos de forma coletiva como "formulações líquidas da invenção", "formulações líquidas de invenção de SYNAGIS® ou

"formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio"

Tal como aqui utilizado, o termo "modulador do recetor de citocina" refere-se a um agente que modula a fosforilação de um recetor de citocina, a ativação de uma via de transdução de sinal associada a um recetor de citocina, e/ou a expressão de uma proteína particular tal como a citocina. Tal agente pode modular de forma direta ou indireta a fosforilação de um recetor de citocina, estando a via de transdução de sinal associada com o recetor de citocina, e/ou a expressão de uma proteína particular tal como a citocina. Assim, exemplos de moduladores do recetor de citocina incluem, mas não estão limitados a, citocinas, fragmentos de citocinas, proteínas de fusão e anticorpos que se ligam de forma imuno-específica a um recetor de citocina ou um seu fragmento. De um modo adicional, exemplos de moduladores de recetor de citocinas incluem, mas não estão limitados a, péptidos, polipéptidos (e.g., recetores de citocina solúveis), proteínas de fusão e anticorpos que se ligam de forma imuno-específica a um recetor de citocina ou a um seu fragmento.

Tal como aqui utilizado, os termos "fragmento SYNAGIS®", "fragmento de ligação ao antigénio" e termos semelhantes utilizados no contexto de SYNAGIS® referem-se a um fragmento de SYNAGIS® que se liga de forma imuno-específica a um antigénio de RSV. Os fragmentos de SYNAGIS® podem ser originados através de qualquer técnica conhecida pelos peritos na especialidade. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como a papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Os fragmentos F(ab')₂ contêm as cadeias leves completas e a região variável, a região

CH₁ e a região de dobradiça da cadeia pesada. De um modo preferido, o fragmento também se liga a um antigénio RSV, de um modo mais preferido ao mesmo epítopo de SYNAGIS®.

Tal como aqui utilizado, o termo "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de uma terapia (e.g., um agente profilático ou terapêutico), a qual é suficiente para reduzir a severidade, e/ou a duração de uma infeção por RSV, melhorar um ou mais dos seus sintomas, prevenir o avançar de uma infeção por RSV ou causar a regressão de uma infeção por RSV, o que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência, despoletar ou progressão de uma infeção por RSV ou de um ou mais seus sintomas, ou aumentar ou melhorar o(s) efeito(s) profilático(s) e/ou terapêutico(s). Numa forma de realização específica, uma quantidade eficaz de um agente terapêutico ou profilático reduz um ou mais dos seguintes passos do ciclo de vida de RSV: a atracagem da partícula viral a uma célula, a introdução de informação viral genética numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas virais e a libertação de partículas virais a partir de uma célula em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%. Noutra forma de realização específica, uma quantidade eficaz de um agente terapêutico ou profilático reduz a replicação, multiplicação ou disseminação de um vírus em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo

menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%.

Tal como aqui utilizado, o termo "epítopo" refere-se a uma porção do polipéptido RSV ou proteína com atividade antigénica e imunogénica num animal, de um modo preferido um mamífero e de um modo mais preferido num humano. Um epítopo com atividade imunogénica é uma porção de um polipéptido ou proteína RSV que desencadeia uma resposta por parte dos anticorpos num animal. Um epítopo com atividade imunogénica é uma porção de um polipéptido ou proteína RSV ao qual um anticorpo se liga de forma imuno-específica tal como determinado por qualquer método bem conhecido no estado da técnica, por exemplo, através dos ensaios imunológicos aqui descritos. Os epítopos antigénicos não necessitam necessariamente de ser imunogénicos. De um modo específico, o epítopo de SYNAGIS[®] é o local antigénico A da proteína F de RSV.

Tal como aqui utilizado, o termo "excipientes" refere-se a substâncias inertes que são utilizadas de modo comum como diluente, veículo, conservantes, agentes de ligação ou agentes estabilizadores para fármacos e incluem, mas não estão limitados a, proteínas (e.g., albumina do soro, etc.), aminoácidos (e.g., ácidos aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos gordos e fosfolípidos (e.g., sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), surfactantes (e.g., SDS, polissorbato, surfactante não-iónico, etc.), sacarídeos (e.g., sacarose, maltose, trealose, etc.) e polióis (e.g., manitol, sorbitol, etc.). Ver também Remington's Pharmaceutical Sciences (de Joseph P. Remington, 18^a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA). De um modo preferido, os excipientes conferem propriedades físicas benéficas à formulação, tais

como uma estabilidade da proteína aumentada, solubilidade da proteína aumentada e viscosidade reduzida.

O termo "fragmento" tal como aqui utilizado refere-se a um péptido, polipéptido ou proteína (incluindo um anticorpo) compreendendo uma sequência de aminoácido de pelo menos 5 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 10 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 15 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 25 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 40 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 50 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 60 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 70 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 80 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 90 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 100 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 125 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 150 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 175 resíduos de aminoácidos contíguos, pelo menos 200 resíduos de aminoácidos contíguos, ou pelo menos 250 resíduos de aminoácidos contíguos, da sequência de aminoácidos de outro polipéptido ou proteína. Numa forma de realização específica, um fragmento de uma proteína ou polipéptido retém pelo menos uma função da proteína ou polipéptido. Noutra forma de realização, o fragmento de uma proteína ou polipéptido retém pelo menos duas, três ou quatro funções da proteína ou polipéptido. De um modo preferido um fragmento de um anticorpo que se liga de forma imuno específica a um antigénio RSV retém a capacidade de se ligar ao antigénio RSV.

Tal como aqui utilizado, o termo "proteína de fusão" refere-se a um polipéptido ou proteína que compreende uma

sequência de aminoácido de uma primeira proteína, polipéptido ou seu fragmento, análogo ou derivado, e uma sequência de aminoácidos de uma proteína ou polipéptido heterólogo (*i.e.*, uma segunda proteína, polipéptido ou seu fragmento, análogo ou derivado, diferente do da primeira proteína ou seu fragmento, análogo ou derivado funcional). Numa forma de realização, a proteína de fusão compreende um agente profilático ou terapêutico em fusão com uma proteína, polipéptido ou péptido heterólogo. De acordo com esta forma de realização, a proteína, polipéptido ou péptido heterólogo pode ser ou não de um tipo diferente do agente profilático ou terapêutico.

Tal como aqui utilizado, o termo "bebé humano" refere-se a um humano com menos de 24 meses, de um modo preferido com menos de 16 meses, menos de 12 meses, menos de 6 meses, menos de 3 meses, menos de 2 meses ou menos de 1 mês de idade.

Tal como aqui utilizado, o termo "bebé humano nascido prematuramente" refere-se a um humano nascido a menos de 40 semanas de idade gestacional, de um modo preferido com menos de 35 semanas de idade gestacional, que é menos que 6 meses de idade, de um modo preferido menos de 3 meses de idade, de modo mais preferido menos de 2 meses de idade e de modo ainda mais preferido menos de 1 mês de idade.

Tal como aqui utilizado, o termo "alta concentração" refere-se a uma concentração de 50 mg/ml ou superior, de um modo preferido 95 mg/ml ou superior de um anticorpo ou seu fragmento que se liga de modo imuno específico a um antigénio RSV numa formulação de anticorpo.

Tal como aqui utilizado, o termo "célula hospedeira" inclui uma célula alvo transfetada ou transformada com uma

molécula de ácido nucleico e a progenia ou potencial progenia de tal célula. A progenia de tal célula pode não ser idêntica à célula parental transfetada com a molécula de ácido nucleico devido a mutações ou influências ambientais que podem ocorrer nas gerações seguintes ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

Tal como aqui utilizado, o termo "liga-se de um modo imuno específico a um antigénio RSV" e termos análogos refere-se a anticorpos ou seus fragmentos que se ligam de modo específico a um seu antigénio RSV e não se ligam de um modo específico a outros polipéptidos. Os anticorpos ou fragmentos que se ligam de modo imuno específico a um antigénio RSV podem reagir de forma cruzada com antigénios relacionados. De um modo preferido, os anticorpos ou fragmentos que se ligam de modo imuno específico ao antigénio RSV não reagem de forma cruzada com outros antigénios. Os anticorpos ou fragmentos que se ligam de modo imuno específico a um antigénio RSV podem ser identificados, por exemplo, através de imunoensaios, BIAcore, calorimetria de titulação isotérmica ou outras técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio liga-se de um modo específico a um antigénio RSV quando se liga com afinidade superior à de qualquer antigénio de reação cruzada tal como determinado quando se utilizam técnicas experimentais, tais como radioimunoensaios (RIA) e ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISAs). Ver, *e.g.*, Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, Nova Iorque nas páginas 332-336 para uma discussão no que diz respeito a especificidade de anticorpos.

O termo "em combinação" tal como aqui utilizado refere-se à

utilização de mais que uma terapia (e.g., agentes profiláticos e/ou terapêuticos). A utilização do termo "em combinação" não restringe a ordem na qual as terapias (i.e., agentes profiláticos e/ou terapêuticos) são administradas ao indivíduo com uma infecção por RSV. Uma primeira terapia (e.g., um agente profilático e/ou terapêutico) pode ser administrada anteriormente a (e.g., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, ou 12 semanas antes), de modo concomitante com ou subsequente à (e.g., 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, ou 12 semanas após) administração de uma segunda terapia (e.g., um agente profilático e/ou terapêutico) a um indivíduo com uma infecção por RSV.

Tal como aqui utilizado, o termo "sal inorgânico" refere-se a quaisquer compostos, que não contenham carbonos, que resultam da recolocação de parte ou da totalidade do hidrogénio ácido ou de um ácido por um metal ou um grupo que atue como um metal e são utilizados de modo frequente como compostos de ajustamento da tonicidade em composições farmacêuticas e preparações de materiais biológicos. Os sais inorgânicos mais comuns são o NaCl, KCl, NaH₂PO₄, etc.

Um anticorpo "isolado" ou "purificado" encontra-se normalmente livre de material celular ou outras proteínas contaminantes da fonte celular ou de tecido a partir da qual a proteína é derivada, ou substancialmente livres de precursores químicos ou outros químicos quando é sintetizado quimicamente. A linguagem "substancialmente

livre de material celular" inclui preparações de um anticorpo nas quais o polipéptido/proteína é separado das componentes celulares das células a partir das quais é isolado e produzido de forma recombinante. Dessa forma, um anticorpo que é substancialmente livre de material celular inclui preparações do anticorpo com menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, ou 1%, (de peso seco) de proteína contaminante. Quando o anticorpo é produzido de forma recombinante, também é de modo preferido substancialmente livre de meio de cultura, *i.e.*, o meio de cultura representa menos de cerca de 20%, 10%, ou 5% do volume da preparação de proteína. Quando o anticorpo é produzido por síntese química, é de um modo preferido substancialmente livre de precursores químicos ou outros químicos, *i.e.*, é separado de precursores químicos ou outros químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. De um modo concordante, tais preparações de anticorpo têm menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% (de peso seco) de precursores químicos ou compostos além do anticorpo de interesse. Numa forma de realização preferida da presente invenção, os anticorpos são isolados ou purificados.

Tal como aqui utilizado, a frase "níveis baixos a indetetáveis de agregação" refere-se a amostras contendo não mais que 5%, não mais que 4%, não mais que 3%, não mais que 2%, não mais que 1%, e de um modo mais preferido não mais que 0,5%, de agregação por peso de proteína tal como medido através de Cromatografia por exclusão de peso de alto desempenho (HPSEC).

Tal como aqui utilizado, a frase "níveis baixos a indetetáveis de fragmentação" refere-se a amostras contendo o mesmo a não mais que 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99%, da proteína total, por exemplo, num pico único tal como determinado através de Cromatografia por exclusão de peso

de alto desempenho (HPSEC), ou em dois (2) picos (cadeias pesada e leve) através de Eletroforese de Gel Capilar (rCGE), representando o SYNAGIS® não degradado ou um seu fragmento não degradado o qual se liga de modo imuno específico ao antigénio RSV, e contendo quaisquer outros picos únicos contendo mais que 5%, mais que 4%, mais que 3%, mais que 2%, mais que 1%, ou mais que 0,5% de proteína total cada. O termo "Electroforese Capilar em Gel com Redução (CGE)" tal como aqui utilizado refere-se a electroforese em gel capilar sob condições de redução suficientes para reduzir as pontes dissulfito em SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao anticorpo.

Tal como aqui utilizado, os termos "controla", "controlando" e "controle" referem-se a efeitos benéficos que um indivíduo deriva de uma terapia (e.g., SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio), os quais não resultam numa cura de uma infeção por RSV. Em algumas formas de realização, é administrado a um indivíduo uma ou mais terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) para "controlar" a infeção por RSV ou um seu sintoma de forma a prevenir a progressão ou o agravamento da infeção.

Tal como aqui utilizado, o termo "modificado" no contexto de formas modificadas de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que tenha sido alterado por qualquer método conhecido no estado da técnica de forma a aumentar o seu tempo de meia vida (ver, e.g., Secção 5.1.1., *infra*). SYNAGIS® e os seus fragmentos de ligação ao antigénio com tempos de meia vida *in vivo* aumentados e métodos para a sua preparação também divulgados na Publicação Internacional N° WO 02/060919, depositada a 12 de Dezembro de 2001, de seu título "Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses" por L. Johnson *et al.* o termo "modificado" no

contexto de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio também se refere a SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio modificado por ligação covalente de qualquer tipo de molécula a SYNAGIS[®] ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio. Por exemplo, mas não de forma limitativa, o SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio podem ser modificados, e.g., por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação através de grupos protetores/de bloqueio, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc.

Tal como aqui utilizado, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa ser aprovado por uma agência reguladora do governo federal ou estatal ou alistada na farmacopeia americana, farmacopeia europeia ou outra farmacopeia reconhecida de um modo geral para utilização em animais, de um modo mais particular em humanos.

Tal como aqui utilizado, o termo "poliol" refere-se a um açúcar que contém muitos grupos -OH comparados com um sacarídeo normal.

Tal como aqui utilizado, os termos "previne", "prevenir", e "prevenção" refere-se à prevenção ou redução da recorrência, despoletar, desenvolvimento ou progressão de uma infeção por RSV, ou a prevenção ou redução da severidade e/ou duração de uma infeção por RSV ou de um ou mais dos seus sintomas.

Tal como aqui utilizado, os termos "agente profilático" e "agentes profiláticos" referem-se a qualquer/quaisquer agente(s) que possam ser utilizados na prevenção de uma infeção por RSV ou de um ou mais dos seus sintomas. Em certas formas de realização, o termo "agente profilático"

refere-se a SYNAGIS® ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio. De acordo com estas formas de realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser uma componente de uma formulação líquida da invenção. Em certas formas de realização, o termo "agente profilático" não se refere a SYNAGIS® nem a um seu fragmento de ligação ao antigénio. Ainda noutras formas de realização, o termo "agente profilático" não se refere a anticorpos ou seus fragmentos que não SYNAGIS® que se liga de forma imuno específica ao antigénio RSV. De um modo preferido, um agente profilático é um agente que é conhecido como sendo útil, ou já foi ou está correntemente em utilização na prevenção ou impedimento do despoletar, desenvolvimento, progressão e/ou agravamento de uma infeção por RSV ou seus sintomas.

Tal como aqui utilizado, o termo "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se à quantidade de uma formulação líquida da invenção que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência, despoletar ou progressão de uma infeção por RSV. Numa forma de realização específica uma quantidade profilaticamente eficaz de um agente profilático reduz um ou mais dos seguintes passos do ciclo de vida do RSV: a atracagem da partícula viral a uma célula, a introdução de informação viral genética numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas virais e a libertação de partículas virais a partir de uma célula em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%. Noutra forma de realização específica, uma quantidade eficaz de um agente profilático reduz a replicação, multiplicação ou

disseminação de um vírus em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%.

Tal como aqui utilizado, o termo "antigénio RSV" refere-se a uma proteína, polipéptido ou péptido RSV, ao qual um anticorpo se liga de forma imuno específica.

Tal como aqui utilizado, o termo "sacarídeo" refere-se a uma classe de moléculas que são álcoois poliídricos. Os sacarídeos são referidos de modo comum como carbohidratos e podem conter diferentes quantidades de unidades de açúcar (sacarídeo), e.g., monossacáridos, dissacáridos ou polissacáridos.

O termo "pequena molécula" e termos análogos inclui, mas não está limitado a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compostos orgânicos ou inorgânicos (*i.e.*, incluindo compostos hetero-orgânicos e/ou ganometálicos) com um peso molecular inferior a cerca de 10 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a 5 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a 1 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos com um peso molecular inferior a 500 gramas por mole, e sais, ésteres e outras formas farmacêuticamente aceitáveis de tais compostos.

Tal como aqui utilizado, os termos "estabilidade" e

"estável" no contexto uma formulação líquida que compreende SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio refere-se à resistência de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio na formulação à desmontagem térmica e química, agregação, degradação ou fragmentação sob dadas condições de produção, preparação, transporte e armazenagem. As formulações "estáveis" da invenção retêm atividade biológica igual ou superior a 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,5% sob dadas condições de produção, preparação, transporte e armazenagem. A estabilidade de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser verificada por graus de agregação, degradação ou fragmentação através de métodos conhecidos pelos peritos na especialidade, incluindo, mas não limitado a, Eletroforese Capilar em Gel por Redução (rCGE), Electroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de Sódio (SDS-PAGE) e HPSEC, comparado com uma referência, que é, uma forma de SYNAGIS® liofilizada comercialmente disponível reconstituída a 100 mg/ml numa solução tampão de histidina a 47 mM / glicina a 3 mM com manitol a 5,6% a um pH de 6,0. A referência regularmente dava um pico único ($\geq 97\%$ de área) por HPSEC. A estabilidade global de uma formulação líquida que contém SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga de forma imuno específica ao antigénio RSV pode ser aferida através de vários ensaios imunológicos incluindo, por exemplo, ELISA ou radioensaio utilizando o epítipo específico de RSV.

Tal como aqui utilizado, o termo "referência padrão SYNAGIS®" ou termos análogos referem-se a formas de SYNAGIS® liofilizadas comercialmente disponíveis, tal como descrito em *Physicians' Desk Reference*, 56ª edição, 2002. O SYNAGIS® reconstituído pode conter, e.g., os seguintes excipientes: histidina a 47 mM, glicina a 3,0 mM e manitol

a 5,6% e o ingrediente ativo, o anticorpo, a uma concentração de 100 miligramas por ml de solução.

Os termos "indivíduo" e "doente" são aqui utilizados de forma intermutável. Tal como aqui utilizado, os termos "indivíduo" e "indivíduos" referem-se a um animal, de um modo preferido um mamífero incluindo um não-primata (e.g., uma vaca, porco, cavalo, gato, cão, rato e ratinho) e um primata (e.g., um chimpanzé, um macaco tal como um macaco cinomologo e um humano), e de modo mais preferido um humano.

Tal como aqui utilizado, o termo "substancialmente livre de surfactante" refere-se a uma formulação de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, contendo a referida formulação menos de 0,0005%, menos de 0,0003%, ou menos de 0,0001% de surfactantes e/ou menos de 0,0005%, menos de 0,0003%, ou menos de 0,0001% de surfactante.

Tal como aqui utilizado, o termo "substancialmente livre de sais inorgânicos" refere-se a uma formulação de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, contendo a referida formulação menos de 0,0005%, menos de 0,0003%, ou menos de 0,0001% de sais inorgânicos.

Tal como aqui utilizado, o termo "surfactante" refere-se a substâncias orgânicas contendo estruturas anfipáticas; nomeadamente, elas são compostas por grupos de tendências de solubilidade opostas, de um modo típico uma cadeia de hidrocarbonetos solúvel em óleo e um grupo iónico solúvel em água. Os surfactantes podem ser classificados, dependendo da carga da fração de superfície ativa, em surfactantes aniónicos, catiónicos e não-iónicos. Os surfactantes são de um modo frequente utilizados como agentes molhantes, emulsificantes e de dispersão para

várias composições e preparações farmacêuticas de materiais biológicos.

Tal como aqui utilizado, os termos "agente terapêutico" e "agentes terapêutico" referem-se a qualquer/quaisquer agente(s) que possam ser utilizados no tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou de um ou mais dos seus sintomas. Em certas formas de realização, o termo "agente terapêutico" refere-se a SYNAGIS® ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio. De acordo com estas formas de realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser uma componente de uma formulação líquida da invenção. Em certas formas de realização, o termo "agente terapêutico" não se refere a SYNAGIS® nem a um seu fragmento de ligação ao antigénio. Ainda noutras formas de realização, o termo "agente terapêutico" não se refere a anticorpos ou seus fragmentos que não SYNAGIS® que se liga de forma imuno específica ao antigénio RSV. De um modo preferido, um agente terapêutico é um agente que é conhecido como sendo útil, ou já foi ou está correntemente em utilização no tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV sintomas da mesma.

Tal como aqui utilizado, o termo "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se à quantidade de uma formulação líquida da invenção que reduz ou alivia a progressão, agravamento e/ou duração de uma infecção por RSV e/ou alivia um ou mais sintomas associados à infecção por RSV. No que diz respeito ao tratamento de uma infecção por RSV, uma quantidade terapêuticamente eficaz refere-se à quantidade de agente terapêutico suficiente para reduzir ou inibir a replicação do vírus, inibir ou reduzir a infecção da célula dentro do vírus, inibir ou reduzir a produção de partículas virais, inibir ou reduzir a libertação de partículas virais, inibir ou reduzir a disseminação do

vírus para outros tecidos ou indivíduos, ou melhorar um ou mais sintomas associados à infecção. Numa forma de realização específica uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente profilático reduz um ou mais dos seguintes passos do ciclo de vida do RSV: a atracagem da partícula viral a uma célula, a introdução de informação viral genética numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas virais e a libertação de partículas virais a partir de uma célula em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%. Noutra forma de realização específica, uma quantidade eficaz de um agente terapêutico reduz a replicação, multiplicação ou disseminação de um vírus em pelo menos 5%, de um modo preferido pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou pelo menos 100%.

Tal como aqui utilizado, os termos "terapias" e "terapia" podem referir-se a quaisquer protocolos, métodos e/ou agentes que podem ser utilizados na prevenção, tratamento, controlo e melhoria de uma infecção de RSV ou de um ou mais dos seus sintomas. Em certas formas de realização, os termos Em determinadas formas de realização, os termos "terapias" e "terapia" referem-se a terapias biológicas e/ou outras terapias úteis para o tratamento de uma infecção por RSV conhecidas pelo pessoal médico especialista.

Tal como aqui utilizado, os termos "tratar", "tratando" e "tratamento" referem-se a uma redução ou melhoria da progressão, severidade e/ou duração da infecção por RSV e/ou a uma redução ou melhoria de um ou mais sintomas de uma infecção por RSV. Em formas de realização específicas, tais termos referem-se a uma redução ou inibição da replicação do vírus sincicial respiratório (RSV), a inibição ou redução na disseminação de um vírus sincicial respiratório (RSV) a outros tecidos ou pessoas, a inibição ou redução da infecção de uma célula com um vírus sincicial respiratório (RSV), ou a melhoria de um ou mais sintomas associados a uma infecção com vírus sincicial respiratório (RSV).

Tal como aqui utilizado, "protocolo" inclui esquemas de dosagem e regimes de dosagem. Os protocolos aqui incorporados são métodos de utilização e incluem protocolos profiláticos e terapêuticos.

Tal como aqui utilizado, o termo "modulador do recetor de células T" refere-se a um agente que modula a fosforilação de um recetor de células T, a ativação de uma via de transdução de sinal associada a um recetor de células T, e/ou a expressão de uma proteína particular tal como uma citocina. Tal agente pode modular de forma direta ou indireta a fosforilação de um recetor de células T, estando a via de transdução de sinal associada com o recetor de células T, e/ou a expressão de uma proteína particular tal como uma citocina. Exemplos de moduladores do recetor de células T incluem, mas não estão limitados a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusão e anticorpos que se ligam de forma imuno-específica a um recetor de células T ou um seu fragmento. De um modo adicional, exemplos de moduladores do recetor de células T incluem, mas não estão limitados a, péptidos, polipéptidos (e.g.,

recetores de células T solúveis), proteínas de fusão e anticorpos que se ligam de forma imuno-específica a um recetor de células T ou um seu fragmento.

Tal como aqui utilizado, o termo "muito pouca ou nenhuma perda de atividade biológica" refere-se a atividades do anticorpo, incluindo capacidades de ligação específicas de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao anticorpo tal como medido através de vários ensaios imunológicos, incluindo, mas não limitados a ELISA e radioimunoensaios. Numa forma de realização, o SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio da formulação líquida da invenção retém aproximadamente 50%, de um modo preferido 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% da capacidade de se ligar de forma imuno-específica ao antigénio RSV quando comparado com o anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio referência tal como medido por um ensaio imunológico conhecido de um perito na especialidade ou aqui descrito. Por exemplo, um ensaio baseado em ELISA pode ser utilizado para comparar a capacidade de uma formulação líquida de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio se ligarem de forma imuno-específica ao antigénio RSV para um padrão de referência SYNAGIS®. Neste ensaio, as placas são revestidas com um antigénio RSV e o sinal de ligação de uma concentração pré-estabelecida de um padrão de referência SYNAGIS® é comparado com o sinal de ligação da mesma concentração de um anticorpo ou fragmento de anticorpo teste.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 é um diagrama esquemático que apresenta o esboço para a preparação de SYNAGIS® purificado.

A Fig. 2 apresenta o fluxograma do estudo clínico para a comparação entre a formulação líquida de SYNAGIS® e a formulação liofilizada de SYNAGIS®.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As formulações líquidas aqui descritas fornecem uma preparação de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio pronta para utilizar na administração a um indivíduo sem ter que reconstituir a preparação de forma precisa e asséptica e aguardar por um período de tempo até a solução aclarar antes da administração da formulação ao indivíduo. Isto simplifica o procedimento de administração da formulação a um indivíduo por parte de um profissional de saúde. De um modo adicional, devido à sua alta estabilidade durante o armazenamento, as formulações podem conter SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio a concentrações na gama de cerca de 15 mg/ml até cerca de 300 mg/ml sem causar efeitos adversos na(s) atividade(s) biológica(s) SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio devido à agregação da proteína e/ou fragmentação da mesma durante um armazenamento prolongado. Tal estabilidade não só assegura a eficácia de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio mas também reduz os riscos possíveis de causar efeitos adversos a um indivíduo. De um modo adicional, o processo de produção das formulações líquidas da presente invenção é simplificado e mais eficaz que o processo de produção para a versão liofilizada uma vez que todos os estádios de produção das formulações líquidas são levados a cabo numa solução aquosa, sem envolvimento de um passo de secagem, tal como liofilização e secagem por pulverização. De um modo concordante, é também mais eficaz em termos de custos.

5.1 Formulações Líquidas de SYNAGIS®

As formulações líquidas aqui descritas fornecem formulações

de anticorpo que são substancialmente livres de surfactante, sais inorgânicos e/ou outros excipientes e ainda exibem elevada estabilidade durante longos períodos de armazenagem. Numa forma de realização específica, tais formulações de anticorpo são homogéneas. As formulações podem conter histidina a concentrações entre 1 e 100 mM e SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio a concentrações de cerca de 15 mg/mL até cerca de 300 mg/mL. As formulações podem não conter outros ingredientes além de água ou solventes adequados. Uma forma modificada do SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio com aumento do tempo de meia vida e/ou da afinidade pode ser utilizada nas formulações líquidas.

A concentração de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio o qual é incluído nas formulações líquidas, pode ter pelo menos 15 mg/mL, pelo menos 20 mg/mL, pelo menos 25 mg/mL, pelo menos 30 mg/mL, pelo menos 35 mg/mL, pelo menos 40 mg/mL, pelo menos 45 mg/mL, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos 55 mg/mL, pelo menos 60 mg/mL, pelo menos 65 mg/mL, pelo menos 70 mg/mL, pelo menos 75 mg/mL, pelo menos 80 mg/mL, pelo menos 85 mg/mL, pelo menos 90 mg/mL, pelo menos 95 mg/mL, pelo menos 100 mg/mL, pelo menos 105 mg/mL, pelo menos 110 mg/mL, pelo menos 115 mg/mL, pelo menos 120 mg/mL, pelo menos 125 mg/mL, pelo menos 130 mg/mL, pelo menos 135 mg/mL, pelo menos 140 mg/mL, pelo menos 150 mg/mL, pelo menos 200 mg/mL, pelo menos 250 mg/mL, ou pelo menos 300 mg/mL.

A concentração de histidina que é incluída nas formulações líquidas podem variar entre cerca de 1 mM até cerca de 100 mM, cerca de 10 mM até cerca de 50 mM, cerca de 20 mM até cerca de 30 mM, ou cerca de 23 mM até cerca de 27 mM, e é de um modo mais preferido cerca de 25 mM. A histidina pode encontrar-se sob a forma de L-histidina, D-histidina, ou

uma mistura das duas, mas a L-histidina é a mais preferida. A histidina pode também encontrar-se sob a forma de hidratos. A histidina pode ser utilizada numa forma de um sal farmacologicamente aceitável, tal como (e.g., monohidrocloreto e dihidrocloreto), hidrobrometo, sulfato, acetato, etc. A pureza da histidina deveria ser pelo menos 98%, de um modo preferido pelo menos 99%, e de um modo ainda mais preferido pelo menos 99,5%.

O pH da formulação não deve ser igual ao do ponto isoelétrico do anticorpo particular a ser utilizado na formulação (e.g., o ponto isoelétrico de SYNAGIS[®] varia entre 8,65 e 9,43) e pode variar de cerca de 5,0 até cerca de 7, de um modo preferido de cerca de 5,5 até cerca de 6,5, de um modo mais preferido de cerca de 5,8 até cerca de 6,2, e de um modo ainda mais preferido até cerca de 6,0.

Em adição à histidina e a SYNAGIS[®] ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio, as formulações podem conter adicionalmente glicina a uma concentração inferior a 150 mM, inferior a 100 mM, inferior a 50 mM, inferior a 3,0 mM, inferior a 2,0 mM, ou inferior a 1,8 mM, e de um modo mais preferido 1,6 mM. A quantidade de glicina na formulação não deve causar um efeito tampão significativo tal que possa ser evitada a precipitação do anticorpo no seu ponto isoelétrico. A glicina pode também ser utilizada na forma de um sal farmacologicamente aceitável, tal como o hidrocloreto, hidrobrometo, sulfato, acetato, etc. A pureza da glicina deve ser de pelo menos 98%, de um modo preferido pelo menos 99% e de um modo mais preferido pelo menos 99,5%. A glicina pode não ser incluída nas formulações líquidas.

De um modo opcional, as formulações podem adicionalmente compreender outros excipientes, tais como sacarídeos (e.g.,

sacarose, manose, trealose, etc.) e polióis (e.g., manitol, sorbitol, etc.). Numa forma de realização, o outro excipiente é o sacarídeo. Numa forma de realização específica, o sacarídeo é sacarose, a qual se encontra a uma concentração que varia entre cerca de 1% e cerca de 20%, de um modo preferido entre cerca de 5% e cerca de 15%, de um mais modo preferido entre cerca de 8% e cerca de 10%. Noutra forma de realização, o outro excipiente é um poliól. De um modo preferido, contudo, as formulações líquidas da presente invenção não contém manitol. Numa forma de realização específica, um poliól é um polissorbato (e.g., Tween 20), o qual se encontra dentro de uma gama de concentrações entre cerca de 0,001% e de um modo preferido entre cerca de 1%, de um modo preferido entre cerca de 0,01 até cerca de 0,1.

As formulações líquidas podem apresentar estabilidade a intervalos de temperatura de 38 °C - 42°C durante pelo menos 60 dias e, em algumas formas de realização, não mais de 120 dias, de 20 °C - 24 °C durante pelo menos 1 ano, de 2 °C - 8 °C (em particular, a 4 °C) durante pelo menos 3 anos, pelo menos 4 anos ou pelo menos 5 anos e a -20 °C durante pelo menos 3 anos, pelo menos 4 anos ou pelo menos 5 anos, tal como verificado através de cromatografia por exclusão de tamanho de alto desempenho HPSEC. Nomeadamente, as formulações líquidas têm níveis baixos a indetetáveis de agregação e/ou fragmentação tal como aqui definido, após o armazenamento pelos períodos acima definidos. De um modo preferido, não mais que 5%, não mais que 4%, não mais que 3%, não mais que 2%, não mais que 1%, e de um modo preferido não mais que 0,5%, de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, formam um agregado tal como medido através de HPSEC, após a armazenagem pelos períodos acima definidos. De um modo adicional, as formulações líquidas podem apresentar quase nenhuma perda

de atividade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, durante o armazenamento prolongado sob as condições acima descritas, tal como verificado através de vários ensaios imunológicos incluindo, por exemplo, o ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA) e radioimunoensaio para medir a capacidade de ligação ao antigénio RSV de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, ou, por exemplo, por um ensaio C3a/C4a de forma a medir a capacidade de ativação complementar de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio. As formulações líquidas podem reter após o armazenamento pelos períodos acima definidos mais de 80%, mais de 85%, mais de 90%, mais de 95%, mais de 98%, mais de 99%, ou mais de 99,5% da atividade(s) biológica(s) que tinha antes do armazenamento.

As formulações líquidas podem ser preparadas como formas de dosagem unitárias. Por exemplo, uma dosagem unitária por frasco-ampola pode conter 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, ou 20 ml de diferentes concentrações de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio variando de cerca de 15 mg/ml até cerca de 300 mg/ml de concentração de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga de forma imuno específica a RSV. Se necessário, estas preparações podem ser ajustadas a uma concentração desejada através da adição de um diluente estéril a cada frasco-ampola.

5.1.1 SYNAGIS®

São aqui descritas formulações líquidas compreendendo SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. São também aqui descritas formulações líquidas de SYNAGIS®, um anticorpo monoclonal humanizado o qual neutraliza uma vasta gama de isolados de RSV. A sequência de aminoácidos de

SYNAGIS[®] é divulgada, e.g., em Johnson et al., 1997, J. Infectious Disease 176:1215-1224, e na Patente U.S. N° 5 824 307, e os seus V_HCDRs e V_LCDRs são apresentados na Tabela 1, *infra*. As propriedades e utilizações de SYNAGIS[®] são também descritas em, e.g., outros pedidos de patente, ver, e.g., Pedido de Patente U.S. N° 09/724 396 depositado a 28 de Novembro de 2000; Patente U.S. N° 6885493 (Pedido N° 09/996 265) depositado a 28 de Novembro de 2001 e a Patente U.S. N° 7179900 (Pedido N° 10/403 180) depositado a 31 de Março de 2003.

Tabela 1. Sequências CDR de SYNAGIS[®]

CDR	Sequência	SEQ ID N ^a :
VH1	T <u>S</u> GM SVG	1
VH2	DIWWD <u>D</u> <u>K</u> <u>K</u> DYNPSL <u>K</u> <u>S</u>	2
VH3	<u>S</u> MI <u>T</u> <u>N</u> WYFDV	3
VL1	<u>K</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> VG YMH	4
VL2	DT <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u>	5
VL3	FQGS <u>G</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>F</u> T	6

Adicionalmente, a presente invenção também engloba formulações líquidas estáveis de formas modificadas de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que têm tempos de meia vida aumentados. De um modo particular, a presente invenção engloba uma forma modificada de SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio com um tempo de meia vida num indivíduo, de um modo preferido um humano, de mais de 3 dias, mais de 7 dias, mais de 10 dias, de um modo preferido mais de 15 dias, mais de 25 dias, mais de 30 dias, mais de 35 dias, mais de 40 dias, mais de 45 dias, mais de 2 meses, mais de 3 meses, mais de 4 meses, ou mais de 5 meses. Prolongando os tempos de meia vida de

SYNAGIS[®] e dos seus fragmentos de ligação ao antigénio, é possível reduzir a quantidade e/ou frequência de dosagem do anticorpo ou fragmento de ligação ao anticorpo.

De modo a prolongar a circulação do soro de um anticorpo *in vivo*, podem ser utilizadas várias técnicas. Por exemplo, podem ser acopladas moléculas de polímero inerte, tais como polietilenoglicol de alto peso molecular (PEG) ao anticorpo com ou sem um ligando multifuncional tanto através de conjugação específica no local do PEG à extremidade terminal N- or C- do anticorpo ou via grupos amino epsilon presentes nos resíduos de lisina. Pode ser usada a derivatização linear ou ramificada que resulta na perda minimal da atividade biológica. O grau de conjugação pode ser monitorizado de perto através de SDS-PAGE e espectrometria de massa de forma a assegurar uma própria conjugação de moléculas de PEG com os anticorpos. As moléculas de PEG que não reagirem podem ser separadas dos conjugados PEG-anticorpo através de cromatografia por exclusão de tamanho ou por cromatografia de troca iónica. Os anticorpos derivados de PEG podem ser testados para atividade de ligação bem como para a sua eficácia *in vivo* utilizando métodos conhecidos pelos peritos na especialidade, por exemplo, através de imunoensaios aqui descritos.

Um anticorpo com um tempo de meia vida aumentado *in vivo* também pode ser originado através da introdução de uma ou mais modificações no aminoácido (*i.e.*, substituições, inserções ou deleções) num domínio constante de IgG, ou seu fragmento de ligação FcRn (de um modo preferido um domínio do fragmento Fc ou Fc dobradiça). Ver, *e.g.*, Publicação Internacional N^o WO 98/23289; Publicação Internacional N^o WO 97/34631; e Patente U.S. N^o 6 277 375. O SYNAGIS[®] e os

seus fragmentos de ligação ao antigénio com tempos de meia vida *in vivo* aumentados e os métodos para a sua preparação são divulgados no Pedido Internacional N° WO 02/060919, depositado a 12 de Dezembro de 2001 e com o título "Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses" de L. Johnson *et al.*

Adicionalmente, um anticorpo pode ser conjugado com albumina de forma a tornar o anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio mais estável *in vivo* ou ter um tempo de meia vida mais longo *in vivo*. As técnicas são bem conhecidas no estado da técnica, ver *e.g.*, Publicações Internacionais N°s WO 93/15199, WO 93/15200, e WO 01/77137; e Patente Europeia N° EP 413 622.

As formulações líquidas podem compreender SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que tenha sido modificado, por exemplo, através de glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivação através de grupos protetores/de bloqueio, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. E reter a atividade de ligação ao antigénio de RSV.

5.1.2 Conjugados de Anticorpo

As formulações líquidas podem compreender SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio (incluindo formas modificadas com tempos de meia vida aumentados) conjugado com uma ou mais frações, incluindo mas não limitado a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusão, moléculas de ácido nucleico, pequenas moléculas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgânicas e moléculas orgânicas.

As formulações líquidas podem compreender SYNAGIS® recombinante de fusão ou conjugado de forma química (incluindo ambas conjugações covalente e não-covalente) a uma proteína heteróloga ou polipéptido (ou fragmento de ligação ao antigénio, de um modo preferido a um polipéptido de pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 60, pelo menos 70, pelo menos 80, pelo menos 90 ou pelo menos 100 aminoácidos) para gerar proteínas de fusão. A fusão não precisa necessariamente de ser direta, mas pode ser utilizada para identificar como alvo um polipéptido heterólogo para um tipo celular particular, tanto *in vitro* como *in vivo*, através da fusão ou conjugação do anticorpo com outro anticorpo específico para recetores de superfície celular particulares. Um anticorpo de fusão ou conjugado com um polipéptido heterólogo pode também ser utilizado em imunoenaios *in vitro* e métodos de purificação utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Ver *e.g.*, a Publicação Internacional N° WO 93/21232; Patente Europeia N° EP 439,095; Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; Patente U.S. N° 5 474 981; Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432; e Fell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452.

As composições podem compreender uma proteína, péptido ou polipéptido heteróloga/o de fusão ou conjugada/o com um fragmento de ligação ao antigénio de SYNAGIS®. Por exemplo, um polipéptido heterólogo pode ser fundido ou conjugado com um fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv ou fragmento F(ab)₂. São conhecidos no estado da técnica métodos para fundir ou conjugar um polipéptido numa porção de anticorpo. Ver, *e.g.*, Patentes U.S. N°s 5 336 603, 5 622 929, 5 359 046, 5 349 053, 5 447 851, e 5 112 946; Patentes Europeias

Nºs EP 307 434 e EP 367 166; Publicações Internacionais Nºs WO 96/04388 e WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; e Vil et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341.

Podem ser geradas proteínas de fusão adicionais através de técnicas de embaralhamento genético, embaralhamento de motivos, embaralhamento de exões e embaralhamento de codões (referidos de modo coletivo como "embaralhamento de DNA"). O embaralhamento de DNA pode ser empregue na alteração das atividades de SYNAGIS[®] ou seus fragmentos (e.g., um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antigénio com afinidades superiores e taxas de dissociação mais baixas). Ver, de um modo geral, Patentes U.S. Nºs 5 605 793; 5 811 238; 5 830 721; 5 834 252; e 5 837 458, e Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; e Lorenzo e Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308- 313. O SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, ou o ácido nucleico que codifica para SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, pode ser alterado se for indivíduo a mutagenese ao acaso anterior à recombinação através de PCR predisposta a erro, inserção de nucleótidos ao acaso ou por outros métodos. O SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, pode ser recombinado com um ou mais componentes, motivos, secções, partes, domínios, fragmentos, etc. de uma ou mais moléculas heterólogas.

Além disso, o SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser fundido com uma sequência marcadora, tal como um péptido para facilitar a purificação. Em formas de realização preferidas, a sequência de aminoácidos marcadora é o péptido hexa-histidina, tal como o tag fornecido num

vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outros, muitos dos quais se encontram comercialmente disponíveis. Tal como descrito em Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por exemplo, a hexa-histidina confere uma purificação conveniente da proteína de fusão. Outros tags de péptidos úteis para a purificação incluem, mas não estão limitados a, tag hemaglutinina "HA", o qual corresponde a um epítipo derivado a partir da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, Cell 37:767) e o tag "bandeira".

As formulações líquidas podem compreender SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio conjugado com um agente de diagnóstico ou detetável ou qualquer outra molécula para a qual se deseja que o soro de meia vida seja aumentado. Tal anticorpo pode ser útil para a monitorização ou prognóstico do desenvolvimento ou progressão de uma infeção por RSV como parte de um procedimento clínico de teste, tal como a determinação da eficácia de uma terapia em particular. Tal diagnóstico e deteção pode ser alcançado acoplando SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio a uma substância detetável incluindo, mas não limitada a, várias enzimas, tais como mas não limitadas a, peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos, tais como mas não limitados a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; materiais fluorescentes, tais como mas não limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como mas não limitados a, luminol; materiais bioluminescentes, tais como mas não limitados a, luciferase, luciferina e aequorina; materiais radioativos, tais como mas não limitados a, iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio

(^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), e tecnécio (^{99}Tc), tálio (^{201}Tl), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd), molibdénio (^{99}Mo), xénon (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , and ^{117}Tm ; metais emissores de positrões utilizando várias tomografias emissoras de positrões, iões metálicos paramagnéticos não-radioativos e moléculas que são marcadas radioactivamente ou conjugadas com radioisótopos específicos. A substância detetável pode ser acoplada ou conjugada tanto de forma direta com SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio ou de forma indireta, através de um intermediário (tal como, por exemplo, um ligando conhecido no estado da técnica) utilizando técnicas conhecidas na arte. Ver, e.g., Patente U.S. N^o 4 741 900 para iões metálicos que possam ser conjugados com anticorpos para uso como um diagnóstico de acordo com a presente invenção.

SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio podem ser conjugados com uma fração terapêutica. Um fragmento de anticorpo ou de ligação ao antigénio pode ser conjugado com uma fração terapêutica tal como uma citocina, e.g., um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um ião metálico radioativo, e.g., alfa-emissores. A citocina ou o agente citostático ou citocida incluem qualquer agente que seja prejudicial para as células. Exemplos incluem o paclitaxel, a citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunomicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e seus análogos e homólogos. As frações terapêuticas incluem, mas não estão limitadas a, antimetabolitos (e.g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-

tioguanina, citarabina, dacarbazina de 5-fluorouracilo), agentes alquilantes (e.g., mecloretamina, clorambucilo de tioepa, melfalano, carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU)), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e platina (II) de cisdiclorodiamina (DDP) (cisplatina); antraciclinas (e.g., daunorrubicina (formalmente daunomicina) e doxorubicina); antibióticos (e.g., dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)); Moléculas de Auristatina (e.g., auristatina PHE, briostatina 1, solastatina 10, ver Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3802-8 (2002), Woyke et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., *Anticancer Drugs* 12:735-40 (2001), Wall et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:76-80 (1999), Mohammad et al., *Int. J. Oncol.* 15:367-72 (1999), agentes anti-mitóticos (e.g., vincristina and vinblastina); hormonas (e.g., glucocorticoides, progestatinas, androgéneos, e estrogéneos); inibidores da enzima de reparação de DNA (e.g., etoposido ou topotecano); inibidores de cinase (e.g., composto ST1571, mesilato de imatinibe (Kantarjian et al., *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002)), e os compostos descritos nas Patentes U.S. N°s 6 245 759, 6 399 633, 6 383 790, 6 335 156, 6 271 242, 6 242 196, 6 218 410, 6 218 372, 6 057 300, 6 034 053, 5 985 877, 5 958 769, 5 925 376, 5 922 844, 5 911 995, 5 872 223, 5 863 904, 5 840 745, 5 728 868, 5 648 239, e 5 587 459); inibidores da transferase de farnesil (e.g., R115777, BMS 214662, e os descritos em, por exemplo, Patentes U.S. N°s: 6 458 935, 6 451 812, 6 440 974, 6 436 960, 6 432 959, 6 420 387, 6 414 145, 6 410 541, 6 410 539, 6 403 581, 6 399 615, 6 387 905, 6 372 747, 6 369 034, 6 362 188, 6 342 765, 6 342 487, 6 300 501, 6 268 363, 6 265 422, 6 248 756, 6 239 140, 6 232 338, 6 228 865, 6 228 856, 6 225 322, 6 218

406, 6 211 193, 6 187 786, 6 169 096, 6 159 984, 6 143 766, 6 133 303, 6 127 366, 6 124 465, 6 124 295, 6 103 723, 6 093 737, 6 090 948, 6 080 870, 6 077 853, 6 071 935, 6 066 738, 6 063 930, 6 054 466, 6 051 582, 6 051 574, e 6 040 305); inibidores da topoisomerase (e.g., camptotecina, irinotecano, SN 38, topotecano, 9 aminocamptotecina, GG 211 (GI 147211), DX 8951f; IST 622, rubitecano, pirazoloacridina, XR 5000, saintopina, UCE6, UCE1022, TAN 1518A, TAN 1518B, KT6006, KT6528, ED 110, NB 506, ED 110, NB 506, rebecamicina, e bulgareína); ligandos ao sulco menor do DNA tais como o corante Hoescht 33342 e Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta lapachona; BC 4 1; e sais farmacologicamente aceitáveis, solvatos, clatratos, e seus pro-fármacos (Ver, e.g., Rothenberg, M.L., *Annals of Oncology* 8:837-855(1997); e Moreau et al., *J. Med. Chem.* 41:1631-1640(1998)). As frações terapêuticas podem também ser oligonucleótidos anti-senso (e.g., os descritos nas Patentes U.S. N°s 6 277 832, 5 998 596, 5 885 834, 5 734 033, e 5 618 709); imunomoduladores (e.g., anticorpos e citocinas); anticorpos (e.g., rituximab (Rituxan®), calicheamicina (Mylotarg®), ibritumomab tiuxetano (Zevalin®), e tositumomab (Bexxar®)); e inibidores da desamidase de adenosina (e.g., Fosfato de fludarabina e 2 Clorodesoxiadenosina).

Adicionalmente, um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo podem ser conjugados com uma fração terapêutica ou fração de fármaco que modifica uma dada resposta biológica. A fração terapêutica ou frações de fármacos não são para ser construídas limitadas aos agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como abrina, ricina A,

exotoxina de pseudomonas, toxina da cólera, ou toxina da difteria; uma proteína tal como um fator de necrose tumoral, α -interferão, β -interferão, fator de crescimento do tecido nervoso, fator de crescimento derivado de plaquetas, ativador de plasminogénio dos tecidos, um agente apoptótico, e.g., TNF- α , TNF- β , AIM I (ver, Publicação Internacional N° WO 97/33899), AIM II (ver, Publicação Internacional N° WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6:1567-1574), e VEGF (ver, Publicação Internacional N° WO 99/23105); ou um modificador de resposta biológica tal como, por exemplo, uma linfocina (e.g., interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-4 ("IL-4"), interleucina-6 ("IL-6"), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interferão- α , β , γ , fator de estimulação de colónia de macrófagos granulócitos ("GM-CSF"), e fator de estimulação de colónia de granulócitos ("G-CSF")), ou um fator de crescimento (e.g., hormona do crescimento ("GH")).

Além disso, um anticorpo pode ser conjugado com frações terapêuticas tais como iões metálicos radioativos, e.g., alfa-emissores tais como ^{213}Bi ou quelantes macrocíclicos úteis para a conjugação de iões radiometálicos, incluindo mas não limitados a, ^{131}In , ^{13}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , a polipéptidos. Em certas formas de realização, o quelante macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) o qual pode ser fixado ao anticorpo através de uma molécula de ligação. Tais moléculas de ligação são conhecidas de modo comum no estado da técnica e descritas em Denardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; e Zimmerman et al., 1999, Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50.

São conhecidas técnicas para conjugar frações terapêuticas a anticorpos, ver *e.g.*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.

De um modo alternativo, SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser conjugado com um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo tal como descrito por Segal na Patente U.S. N° 4 676 980, a qual é aqui incorporada na sua totalidade, por referência.

SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser fixado a suportes sólidos, os quais são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do antigénio alvo. Tais suportes sólidos incluem, mas não estão limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, *nylon*, poliestireno, cloreto de polivinilo ou polipropileno.

A fração terapêutica ou conjugado de fármaco a SYNAGIS[®] ou a um seu fragmento de ligação ao antigénio deve ser escolhido de modo a alcançar o efeito profilático ou terapêutico desejado para a infeção por RSV num indivíduo.

Um clínico ou qualquer outro profissional médico deve considerar o seguinte aquando da decisão sobre que fração terapêutica ou de fármaco conjugar com SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio: a severidade da infeção, e a condição do indivíduo.

SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, com ou sem um fração terapêutica conjugada, pode ser utilizado como agente terapêutico.

5.2 Método para preparar as Formulações de Anticorpo

A presente invenção fornece métodos para preparar as formulações líquidas de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio de acordo com a reivindicação 1. A Figura 1 é um diagrama esquemático que apresenta um esboço para a preparação de SYNAGIS® purificado. Os métodos para a preparação de formulações líquidas podem compreender: purificação do anticorpo a partir de meio condicionado (tanto lotes únicos ou lotes agrupados de meio) e concentrar uma fração contendo o SYNAGIS® purificado a uma concentração final de anticorpo de cerca de 15 mg/ml, cerca de 20 mg/ml, cerca de 30 mg/ml, cerca de 40 mg/ml, cerca de 50 mg/ml, cerca de 60 mg/ml, cerca de 70 mg/ml, cerca de 80 mg/ml, cerca de 90 mg/ml, cerca de 100 mg/ml, cerca de 200 mg/ml, cerca de 250 mg/ml, ou cerca de 300 mg/ml utilizando uma membrana semipermeável com um limite de peso molecular apropriado (pm) (e.g., limite de 30 kD para moléculas de anticorpo totais e fragmentos F(ab')₂; e limite de 10 kD para fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab), e diafiltrando a fração de anticorpos concentrado para a solução tampão da formulação utilizando a mesma membrana. A solução tampão da presente invenção compreende histidina a uma concentração que vai de cerca de 1 mM até cerca de 100 mM, cerca de 10 mM até cerca de 50 mM, cerca de 20 mM até

cerca de 30 mM, ou cerca de 23 mM até cerca de 27 mM, e é de um modo mais preferido cerca de 25 mM. As formulações podem compreender adicionalmente glicina a uma concentração inferior a 100 mM, inferior a 50 mM, inferior a 3.0 mM, inferior a 2.0 mM, ou inferior a 1.8 mM, e de um modo mais preferido 1.6 mM. A quantidade de glicina na formulação não deve causar um efeito tampão significativo de forma a evitar a precipitação do anticorpo no seu ponto isoelétrico. O pH da formulação pode variar desde cerca de 5,0 até cerca de 7,0, de um modo preferido desde cerca de 5,5 até cerca de 6,5, de um modo mais preferido desde cerca de 5,8 até cerca de 6,2, e de um modo mais preferido cerca de 6,0. De forma a obter um pH apropriado para um anticorpo em particular, é preferível que a histidina (e glicina, se adicionada) seja primeiro dissolvida em água de forma a obter uma solução tampão com um pH maior que o pH desejado e nessa altura o pH é diminuído até ao nível desejado de pH através da adição de HCl. Desta forma, a formação de sais inorgânicos (e.g., na formação de NaCl quando, e.g., é adicionado hidrocloreto de histidina como fonte de histidina e o pH é aumentado até ao nível desejado através da adição de NaOH) pode ser evitada.

As formulações líquidas podem ser preparadas como formas de dosagem unitárias através da preparação de um frasco-ampola contendo uma alíquota da formulação líquida para uma toma única. Por exemplo, uma dosagem unitária por frasco-ampola pode conter 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, ou 20 ml de diferentes concentrações de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio variando de cerca de 15 mg/ml até cerca de 300 mg/ml de concentração de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga de forma imuno específica a RSV. Se necessário, estas preparações podem ser ajustadas a uma

concentração desejada através da adição de um diluente estéril a cada frasco-ampola.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser esterilizadas através de vários métodos de esterilização, incluindo filtração estéril, radiação, etc. Numa forma de realização mais preferida, a formulação de anticorpo diafiltrada sofre uma filtração esterilizada com um filtro de 0,2 μ ou um de 0,22 μ pré-esterilizado. As formulações líquidas esterilizadas da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo de forma a prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas associados à infecção por RSV ou um seu sintoma.

Apesar de a invenção se dirigir a formulações líquidas não-liofilizadas, deve ser notado que para o propósito de equivalentes as formulações da invenção podem ser liofilizadas, se desejado. Assim, a invenção engloba formas liofilizadas das formulações apesar de tais formulações liofilizadas não serem necessárias e dessa forma, não preferidas.

5.3 Métodos de Preparação de SYNAGIS[®]

O SYNAGIS[®] e um seu fragmento de ligação ao antigénio contido nas formulações líquidas aqui descritas podem ser preparados através de qualquer método conhecido no estado da técnica para a síntese de anticorpos, de um modo particular, através de síntese química ou, de um modo preferido, através de técnicas de expressão recombinante.

A sequência de nucleótidos que codifica para os domínios variáveis das cadeias leve e pesada de SYNAGIS[®] podem ser obtidos a partir de, por exemplo, o pedido de patente co-pendente 09/724 396, depositado a 28 de Novembro de 2000 e

da Patente US N° 6885493 (09/996 265), depositada a 28 de Novembro de 2001, ambas por Young et al. Ver também, Patente US N° 5 824 307 de Johnson et al. Em certas formas de realização, um ácido nucleico que codifica para SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser quimicamente sintetizado ou montado a partir de oligonucleótidos tal como é conhecido no estado da técnica, e depois amplificado por PCR, clonagem ou outro método conhecido no estado da técnica.

A expressão recombinante de um anticorpo (tal como SYNAGIS®) requer a construção de um vetor de expressão contendo uma sequência de nucleótidos que codifique para um anticorpo. Uma vez obtida uma sequência de nucleótidos que codifique para uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido a partir de tecnologia de DNA recombinante utilizando técnicas bem conhecidas no estado da técnica tal como discutido nas secções anteriores. Os métodos que são bem conhecidos para os especialistas na técnica podem ser utilizados para construir vetores de expressão contendo sequências que codificam para anticorpos e sinais de controlo de tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas e recombinação genética *in vivo*. A sequência de nucleótidos que codifica para a região variável da cadeia pesada, região variável da cadeia leve, ambas as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, um fragmento de ligação ao epítipo das regiões variáveis das cadeias pesada e leve, uma ou mais regiões determinantes da complementaridade (CDRs) de um anticorpo podem ser clonadas para um tal vetor de expressão. Um vetor de expressão preparado de tal forma pode ser então introduzido em células hospedeiras

apropriadas para a expressão do anticorpo. De um modo concordante, a divulgação inclui células hospedeiras contendo um polinucleótido que codifica para SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

A célula hospedeira pode ser co-transfetada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor codificando para um polipéptido derivado de cadeia pesada e o segundo vetor codificando para um polipéptido derivado de cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores de seleção idênticos, os quais permitem expressão semelhante de polipéptidos de cadeia pesada e leve ou diferentes marcadores de seleção de forma a garantir a manutenção de ambos os plasmídeos. De um modo alternativo, um vetor único pode ser utilizado o qual codifica e é capaz de expressar, ambos os polipéptidos de cadeia leve e pesada. Em tais situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada de forma a evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, *Nature*, 322:52, 1986; e Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2 197, 1980). As sequências que codificam para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genómico.

Para a produção a longo prazo e de alto rendimento de anticorpos recombinantes, é preferida a expressão estável. Por exemplo, as linhas celulares que expressam de forma estável a molécula de anticorpo podem sofrer engenharia genética. Em vez de utilizar vetores de expressão que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado através de elementos de controlo de expressão (e.g., promotor, potenciador de rendimento, sequências, terminadores de transcrição, locais de poliadenilação, etc.), e um marcador de seleção. No seguimento da introdução do DNA estranho, as células geneticamente modificadas podem ser permitidas

crescer durante 1 - 2 dias em meio enriquecido, e depois serem transferidas para um meio seletivo. O marcador de seleção no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem de forma estável o plasmídeo nos seus cromossomas e cresçam de modo a formar *foci* que podem por sua vez ser clonados e expandidos para linhas celulares. Este método pode ser utilizado de modo vantajoso para a engenharia de linhas celulares que expressem a molécula de anticorpo. Tais linhas celulares de engenharia genética podem ser úteis de um modo particular no rastreio e avaliação de composições que interagem de modo direto ou indireto com a molécula de anticorpo.

Um número de sistemas de seleção pode ser utilizado, incluindo mas não limitado a, cinase de timidina do vírus do herpes simplex (Wigler et al., Cell, 11:223, 1977), fosforibosiltransferase de hipoxantineguanina (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202, 1992), e fosforibosiltransferase de adenina (Lowy et al., Cell, 22:8-17, 1980) podem ser empregues genes em células tk⁻, hgp^{rt}⁻ ou apr^t⁻, respetivamente. Além disso, a resistência ao antimetabolito pode ser utilizada como a base da seleção para os seguintes genes: *dhfr*, o qual confere resistência à metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:357, 1980 e O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527, 1981); *gpt*, o qual confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); *neo*, o qual confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Wu and Wu, Bioterapia, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:573-596, 1993; Mulligan, Science, 260:926-932, 1993; e Morgan e Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62: 191-217, 1993; e May, TIB TECH, 11(5):155-2 15, 1993); e *hygro*, o qual confere resistência à higromicina (Santerre et al., Gene, 30:147,

1984). Os métodos conhecidos de um modo comum no estado da técnica da tecnologia de DNA recombinante podem ser aplicados de forma rotineira à seleção dos clones recombinantes desejados, e tais métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; e Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados através de amplificação por vetores (para uma revisão, ver Bebbington e Hentschel, 1987, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. Academic Press, Nova Iorque). Quando um marcador no sistema de vetores que expressa o anticorpo é amplificável, o aumento do nível do inibidor presente na cultura da célula hospedeira irá aumentar o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está associada com o gene do anticorpo, a produção do anticorpo irá também aumentar (Crouse et al., *Mol., Cell. Biol.*, 3:257, 1983).

Uma vez produzida uma molécula de anticorpo através de expressão recombinante, a mesma pode ser purificada através de qualquer método conhecido no estado da técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, através de cromatografia (e.g., troca iônica, afinidade, de um modo particular por afinidade para o antigénio específico após a purificação com Proteína A, e cromatografia em coluna por tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou através de qualquer outra

técnica padrão para a purificação de proteínas. Adicionalmente, o SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno podem ser fundidos com as sequências de proteína, polipéptido ou péptido heterólogo aqui descritas ou conhecidas de outra forma no estado da técnica para facilitar a purificação.

Os fragmentos de ligação ao antígeno de SYNAGIS® que se liga de modo imuno específico a RSV podem ser gerados através de qualquer técnica conhecida. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos através de clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como a papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Os fragmentos F(ab')₂ contêm a cadeia leve completa, e a região variável, a região CH₁ e a região dobradiça da cadeia pesada.

5.4 Métodos de Monitorização da Estabilidade e Agregação das Formulações de Anticorpo

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a estabilidade das formulações de proteína, incluindo as formulações de anticorpo, baseados nas estruturas físicas e químicas das proteínas tal como nas suas atividades biológicas. Por exemplo, de forma a estudar a desnaturação de proteínas, encontram-se disponíveis métodos tais como absorção de transferência de carga, análise térmica, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, NMR, e HPSEC. Ver, por exemplo, Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(sup):S4-S26. O rCGE, e HPSEC são os métodos mais comuns e mais simples para aferir a formação de agregados de proteína, degradação de proteína e fragmentação de proteína. De um modo concordante, a

estabilidade das formulações líquidas da presente invenção podem ser aferidas através destes métodos.

Por exemplo, a estabilidade das formulações líquidas da presente invenção podem ser avaliadas através de HPSEC ou rCGE, onde a área percentual dos picos representa o SYNAGIS[®] não degradado ou os fragmentos de SYNAGIS[®] de ligação ao antigénio não degradados. De um modo particular, aproximadamente 250 µg de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio (aproximadamente 25 µl de uma formulação líquida compreendendo 10 mg/ml de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio) é injetado numa coluna TOSOH TSK G3000SW_{XL} (7,8 mm x 30 cm) equipada com uma pré-coluna TSK SW x 1 (6,0 mm x 4,0 cm), SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio é eluído de forma isocrática com fosfato de dissódio a 0,1 M contendo sulfato de sódio a 0,1 M e 0,05% de azida de sódio, a uma taxa de fluxo de 0,8 a 1,0 ml/min. A proteína eluída é detetada utilizando a absorvância UV a 280 nm. O padrão de referência SYNAGIS[®] é corrido no ensaio como um controlo, e os resultados são reportados como a percentagem de área do pico do monómero do produto comparado com todos os outros picos excluindo o pico de volume incluído observado aproximadamente aos 12 a 14 minutos. Os picos que eluem antes do pico do monómero são registados como agregado percentual.

As formulações líquidas aqui descritas apresentam níveis baixos a indetetáveis de agregação tal como medido por HPSEC ou rCGE, isto é, não mais de 5%, não mais de 4%, não mais de 3%, não mais de 2%, não mais de 1%, e de um modo mais preferido não mais de 0,5% de agregado por peso de proteína, e níveis baixos a indetetáveis de fragmentação, isto é, 80% ou mais, 85% ou mais, 90% ou mais, 95% ou mais, 98% ou mais, ou 99% ou mais, ou 99,5% ou mais da área total

do pico no(s) pico(s) que representam os anticorpos intactos ou os seus fragmentos. No caso de SDS-PAGE, pode ser obtida a densidade ou a radioatividade de cada banda marcada ou corada com um radioisótopo pode ser medida e a % de densidade ou a % de radioatividade da banda que representa SYNAGIS[®] ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio não degradados.

A estabilidade das formulações líquidas aqui descritas pode ser aferida através de qualquer ensaio que meça a atividade biológica de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio na formulação. As atividades biológicas de um anticorpo incluem, mas não estão limitadas a, atividade de ligação ao antigénio, atividade de ativação de complemento, atividade de ligação ao recetor de Fc, e por aí e assim por diante. A atividade de ligação ao antigénio de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio podem ser medidos através de um qualquer método conhecido para os peritos na especialidade, incluindo mas não limitados a ELISA, radioimunoensaio, *Western blot*, e semelhantes. A atividade de ativação de complemento pode ser medida através de um ensaio de C3a/C4a no sistema onde SYNAGIS[®] ou um seu fragmento de ligação ao antigénio é colocado a reagir na presença de componentes de complemento com células que expressem um antigénio RSV. *Ver também* Harlow et al., *Anticorpos: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988) (aqui incorporado por referência na sua totalidade). Um ensaio baseado em ELISA, e.g., pode ser utilizado para comparar a capacidade de uma formulação líquida de SYNAGIS[®] ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio de se ligar de forma imuno específica a um antigénio de RSV para um padrão de SYNAGIS[®] referência. Neste ensaio, as placas são revestidas com um antigénio RSV (de um modo particular, o local antigénico A da proteína F de RSV) e o sinal de ligação de uma concentração pré-

definida de um padrão de referência SYNAGIS® é comparado com o sinal de ligação da mesma concentração da formulação líquida de SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio.

A pureza das formulações de anticorpo líquidas aqui descritas podem ser medidas através de qualquer método bem conhecido no estado da técnica para um perito na especialidade tal como, e.g., HPSEC. A esterilidade das formulações de anticorpo líquidas pode ser aferida da seguinte maneira: meio de digestão com feijão de soja-caseína estéril e meio tioglicolato fluído são inoculados com uma formulação líquida de anticorpo teste através da filtração da formulação de anticorpo líquida através de um filtro estéril com uma porosidade nominal de 0,45 µm. Quando se utilizar o método Sterisure™ ou Steritest™, cada dispositivo de filtro é preenchido de forma asséptica com aproximadamente 100 ml de meio de digestão com feijão de soja-caseína estéril ou meio tioglicolato fluído. Quando se utilizar o método convencional, o filtro utilizado é transferido de forma asséptica para 100 ml de meio de digestão com feijão de soja-caseína estéril ou meio tioglicolato fluído. Os meios são incubados a temperaturas apropriadas e observados três vezes durante um período de 14 dias para evidências de crescimento bacteriano ou fúngico.

5.5 Utilização Profilática e Terapêutica das Formulações de Anticorpo

As terapias baseadas em anticorpos podem envolver a administração a um indivíduo, de um modo preferido um mamífero, de um modo mais preferido um humano, as formulações aqui descritas para a prevenção, tratamento,

manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações profiláticas e terapêuticas da invenção compreendem SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao anticorpo a concentrações de cerca de 15 mg/ml até cerca de 300 mg/ml numa solução contendo histidina.

As formulações líquidas aqui descritas podem conter SYNAGIS® modificado ou seus fragmentos de ligação ao antigénio que têm tempos de meia vida *in vivo* melhorados quando comparados com anticorpos conhecidos que se ligam de forma imuno específica ao antigénio RSV (e.g., SYNAGIS® não modificado).

As formulações líquidas aqui descritas podem ser administradas a um mamífero, de um modo preferido um humano, para tratar, controlar ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações líquidas aqui descritas podem ser administradas a um humano com fibrose quística, displasia pulmonar, doença cardíaca congénita, imunodeficiência congénita ou imunodeficiência adquirida, ou a um humano que sofreu um transplante de medula óssea de forma a prevenir, tratar, controlar ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações líquidas aqui descritas podem ser administradas a um humano bebé, de um modo preferido um humano bebé nascido prematuramente ou um humano bebé com risco de hospitalização por uma infecção por RSV de forma a prevenir, controlar ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações líquidas aqui descritas podem ser administradas a uma pessoa idosa de forma a prevenir, controlar ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações líquidas aqui descritas podem ser administradas a um indivíduo numa instituição ou casa de grupo (e.g., um lar ou orfanato).

As formulações líquidas da presente invenção podem ser utilizadas localmente ou de forma sistêmica no corpo de um indivíduo de modo profilático ou terapêutico. As formulações aqui descritas podem também ser de modo vantajoso utilizadas em combinação com outras terapias úteis na prevenção, tratamento, manutenção ou melhoramento de uma infecção por RSV (e.g., um agente profilático ou terapêutico que não SYNAGIS®). Podem ser utilizados exemplos não limitativos de agentes profiláticos ou terapêuticos em combinação com as formulações líquidas aqui descritas, ver Secção 5.6, *infra*.

Quando são utilizadas uma ou mais terapias, as mesmas podem ser administradas de modo separado, sob qualquer forma apropriada e através de qualquer via adequada. Pode ser administrada uma formulação líquida aqui descrita a um mamífero, de um modo preferido um humano, de modo concorrente com uma ou mais terapias (e.g., um ou mais um agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. O termo "de modo concorrente" não é limitado à administração de terapias exatamente ao mesmo tempo, mas em vez disso é suposto que a formulação líquida aqui descrita e outra terapia possam ser administradas em sequência e dentro de um intervalo de tempo tal que o SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio contido na formulação líquida possa atuar em conjunto com a outra terapia de forma a fornecer um benefício aumentado relativamente à sua utilização isolada. Por exemplo, uma formulação líquida aqui descrita e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoramento de uma infecção por RSV podem ser administrados ao mesmo tempo ou de modo sequencial em

qualquer ordem a diferentes pontos no tempo; contudo, se não forem administrados ao mesmo tempo, devem ser administrados de modo suficientemente próximo no tempo de forma a fornecer o efeito terapêutico ou profilático desejado.

Uma formulação líquida aqui descrita ou uma ou mais terapias adicionais (e.g., um ou mais um agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administrados com intervalo de menos de 1 hora, a um intervalo de cerca de 1 hora, a um intervalo entre cerca de 1 hora até cerca de 2 horas, a um intervalo entre cerca de 2 horas até cerca de 3 horas, a um intervalo entre cerca de 3 horas até cerca de 4 horas, a um intervalo entre cerca de 4 horas até cerca de 5 horas, a um intervalo entre cerca de 5 horas até cerca de 6 horas, a um intervalo entre cerca de 6 horas até cerca de 7 horas, a um intervalo entre cerca de 7 horas até cerca de 8 horas, a um intervalo entre cerca de 8 horas até cerca de 9 horas, a um intervalo entre cerca de 9 horas até cerca de 10 horas, a um intervalo entre cerca de 10 horas até cerca de 11 horas, a um intervalo entre cerca de 11 horas até cerca de 12 horas, não mais que 24 horas e não mais que 48 horas de intervalo. Uma formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias adicionais (e.g., um ou mais um agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administrados na mesma visita ao doente. Uma formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias adicionais (e.g., um ou mais um agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administrados com cerca de 2 a 4 dias de intervalo, a cerca de 4 a 6 dias de intervalo, a

cerca de 1 semana de intervalo, a cerca de 1 a 2 semanas de intervalo ou mais de 2 semanas de intervalo. Uma formulação líquida aqui descrita e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para a prevenção, tratamento, manutenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administrados num intervalo de tempo no qual ambos os agentes ainda se encontram ativos. Um perito na especialidade seria capaz de determinar tal intervalo de tempo através da determinação do tempo de meia vida dos agentes administrados.

Uma formulação líquida aqui descrita e uma ou mais outras terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, controle ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administradas de um modo cíclico a um indivíduo. A terapia cíclica envolve a administração de uma primeira terapia por um período de tempo, seguida pela administração de uma segunda terapia e/ou terceira terapia por um período de tempo e repetindo esta administração sequencial. A terapia cíclica pode reduzir o desenvolvimento de resistências a uma ou mais das terapias, evitando ou reduzindo os efeitos colaterais de uma ou mais das terapias, e/ou melhora a eficácia do tratamento.

Uma formulação líquida e uma ou mais outras terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, controle ou melhoria de uma infecção por RSV ou um seu sintoma podem ser administradas num ciclo de menos de 3 semanas, cerca de uma vez em cada duas semanas, cerca de uma vez em cada 10 dias, ou cerca de uma vez por semana. Um ciclo pode compreender a administração de uma terapia (e.g., um agente profilático ou terapêutico) por infusão durante cerca de 90 minutos em cada ciclo, cerca de 1 hora em cada ciclo, cerca de 45

minutos em cada ciclo. Cada ciclo pode compreender pelo menos 1 semana de descanso, pelo menos 2 semanas de descanso ou pelo menos 3 semanas de descanso. O número de ciclos administrados é de cerca de 1 a cerca de 12 ciclos, de um modo mais típico cerca de 2 a cerca de 10 ciclos, e de um modo mais típico de cerca de 2 a cerca de 8 ciclos.

De um modo geral, a administração de produtos de origem das espécies ou da reatividade das espécies (no caso dos anticorpos) é de um modo preferido das mesmas espécies das do doente. Assim, podem ser administrados anticorpos humanos ou humanizados, derivados de fragmentos, ou análogos, a um doente humano para terapia ou profilaxia.

5.6 Agentes úteis em combinação com formulações SYNAGIS®

Métodos para prevenir, gerir, tratar, ou melhorar uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma podem compreender administrar uma formulação líquida aqui divulgada a um indivíduo que necessite da mesma, sozinha ou em combinação com uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não sejam SYNAGIS®. Métodos para prevenir, gerir, tratar, ou melhorar uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma podem compreender administrar uma formulação líquida aqui divulgada a um indivíduo que necessite da mesma, sozinha ou em combinação com uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos) que não sejam SYNAGIS®. As composições podem compreender uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo e um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos que não sejam SYNAGIS® e métodos para prevenir, gerir, tratar, ou melhorar uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma podem utilizar as referidas composições.

Agentes terapêuticos ou profiláticos incluem, mas não estão limitados a, pequenas moléculas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (e.g., nucleótidos DNA e RNA incluindo, mas não estando limitados a, sequências de nucleótidos antissenso, hélices triplas, RNA de interferência (RNAi), e sequências de nucleótidos que codificam proteínas biologicamente ativas, polipéptidos ou péptidos), anticorpos, moléculas inorgânicas sintéticas ou naturais, agentes miméticos, e moléculas orgânicas sintéticas ou naturais.

Qualquer terapia que seja conhecida como sendo útil, ou que tenha sido usada ou que esteja presentemente a ser usada para a prevenção, gestão, tratamento, ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma pode ser usada em combinação com uma formulação líquida aqui descrita. Ver, e.g., Gilman et al., Goodman e Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. et al. (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996, para informação acerca das terapias (e.g., agentes profiláticos ou terapêuticos) que tenham sido ou que estejam presentemente a ser usadas para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Exemplos de tais agentes incluem, não estando limitados a, agentes imunomoduladores, agentes anti-inflamatórios (e.g., adrenocorticoides, corticosteroides (e.g., beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos anti-inflamatórios não-esteroides (e.g., aspirina,

ibuprofeno, diclofenac, e inibidores COX-2), analgésicos, antagonistas de leucotrienos (e.g., montelucaste, metilxantinas, zafirlucaste, e zileuton), beta2-agonistas (e.g., albuterol, biterol, fenoterol, isoetarina, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina formoterol, salmeterol, e salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (e.g., brometo de ipratrópio e brometo de oxitrópio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, anti-histamínicos, agentes anti-maláricos (e.g., hidroxicloroquina)), e agentes antivirais.

Uma formulação líquida aqui divulgada pode ser usada em combinação com um anticorpo monoclonal ou quimérico, ou com uma linfocina ou um fator de crescimento hematopoiético (tal como, e.g., IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, e interferão α , β , e γ), que, por exemplo, serve para aumentar o número ou a atividade de células efetoras que interagem com o anticorpo. Uma formulação líquida aqui divulgada pode também ser vantajosamente utilizada em combinação com outros anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfocinas ou fatores de crescimento hematopoiéticos (tais como, e.g., IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, e interferão α , β , e γ), que, por exemplo, servem para aumentar a resposta imunitária. As formulações líquidas aqui divulgadas podem também ser vantajosamente utilizadas em combinação com um ou mais fármacos usados para tratar a infecção por RSV tais como, por exemplo agentes antivirais. As formulações líquidas aqui divulgadas podem ser usadas em combinação com um ou mais dos seguintes fármacos: NIH-351 (Gemini Technologies), vacina RSV recombinante (MedImmune Vaccines, Inc. Pedidos de patente U.S. Nos. 60/358 934 depositado em 21 de Fevereiro, 2002, 10/373 567 depositado em 21 de Fevereiro, 2003, 10/371 099 depositado em 21 de Fevereiro, 2003, 10/371 122 depositado em 21 de Fevereiro,

2003, 10/371,264 depositado em 21 de Fevereiro, 2003, 60/466 181 depositado em 25 de Abril, 2003 e 60/465 811 depositado em 25 de Abril, 2003), RSVf-2 (Intracel), F-50042 (Pierre Fabre), T-786 (Trimeris), VP-36676 (ViroPharma), RFI-641 (American Home Products), VP-14637 (ViroPharma), PFP-1 e PFP-2 (American Home Products), vacina RSV (Avant Immunotherapeutics), e F-50077 (Pierre Fabre).

5.6.1 Agentes imunomoduladores

Qualquer agente imunomodulador bem conhecido para um perito na especialidade pode ser usado de acordo com os métodos aqui divulgados para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Agentes imunomoduladores podem afetar um ou mais ou todos os aspetos da resposta imunitária num indivíduo. Aspetos da resposta imunitária incluem, não estando limitados a, a resposta inflamatória, a cascata complemento, diferenciação de leucócitos e linfócitos, proliferação, e/ou função efetora, contagens de monócitos e basófilos, e a comunicação celular entre células do sistema imunitário. Em certas formas de realização da invenção, um agente imunomodulador modula um aspeto da resposta imunitária. Um agente imunomodulador modula mais que um aspeto da resposta imunitária. A administração de um agente imunomodulador a um indivíduo inibe ou reduz um ou mais aspetos das capacidades de resposta imunitária do indivíduo. O agente imunomodulador acentua um ou mais aspetos de uma resposta imunitária de um indivíduo. Um agente imunomodulador não é um agente anti-inflamatório. Um agente imunomodulador é um agente que não é um agente quimioterapêutico.

Exemplos de agentes imunomoduladores incluem, não estando

limitados a, agentes proteínáceos tais como citocinas, péptidos miméticos, e anticorpos (e.g., humanos, humanizados, quiméricos, monoclonais, policlonais, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab ou F(ab)₂ ou fragmentos de ligação a epítipo), moléculas de ácidos nucleicos (e.g., moléculas de ácido nucleico antissenso e hélices triplas), pequenas moléculas, compostos orgânicos e compostos inorgânicos. Em particular, agentes imunomoduladores incluem, não estando limitados a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Imurano, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (e.g., FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamidas (e.g., leflunamida), moduladores de recetores de células T, e moduladores de recetores de citocinas.

Exemplos de moduladores de recetores de células T incluem, não estando limitados a, anticorpos anti-receptor de células T (e.g., anticorpos anti-CD4 (e.g., cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1® (IDEC e SKB), mAB 4162W94, Orthoclone e OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticorpos anti-CD3 (e.g., Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson), ou Rituxan (IDEC)), anticorpos anti-CD5 (e.g., um imunoconjugado anti-CD5 ligado a ricina), anticorpos anti-CD7 (e.g., CHH-380 (Novartis)), anticorpos anti-CD8, anticorpos monoclonais anti-ligando CD40 (e.g., IDEC-131 (IDEC)), anticorpos anti-CD52 (e.g., CAMPATH 1H (Ilex)), anticorpos anti-CD2 (e.g., MEDI-507 (MedImmune, Inc., Publicações Internacionais Nos. WO 02/098370 e WO 02/069904), anticorpos anti-CD11a (e.g., Xanelim (Genentech)), e anticorpos anti-B7 (e.g., IDEC-114 (IDEC)), CTLA4-imunoglobulina, e LFA-3TIP (Biogen,

Publicação Internacional No. WO 93/08656 e Patente U.S. No. 6 162 432).

Exemplos de moduladores de recetores de citocina incluem, não estando limitados a, recetores de citocina solúveis (e.g., o domínio extracelular de um recetor de TNF- α ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, o domínio extracelular de um recetor IL-1 β ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, e o domínio extracelular de um recetor de IL-6 ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo), citocinas ou fragmentos das mesmas (e.g., interleucina IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23, TNF- α , TNF- β , interferão (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ , e GM-CSF), anticorpos anti-recetor de citocina (e.g., anticorpos anti-recetor de IFN, anticorpos anti-recetor de IL-2 (e.g., Zenapax (Protein Design Labs)), anticorpos anti-recetor de IL-3, anticorpos anti-recetor de IL-4, anticorpos anti-recetor de IL-6, anti-recetor de IL-9, anticorpos anti-recetor de IL-10, anticorpos anti-recetor IL-12, anticorpos anti-recetor de IL-13, anticorpos anti-recetor de IL-15, e anticorpos anti-recetor de IL-23), anticorpos anti-citocina (e.g., anticorpos anti-IFN, anticorpos anti-TNF- α , anticorpos anti-IL-1 β , anticorpos anti-IL-3, anticorpos anti-IL-6, anticorpos anti-IL-8 (e.g., ABX-IL-8 (Abgenix)), anticorpos anti-IL-9, anticorpos anti-IL-12, anticorpos anti-IL-13, anticorpos anti-IL-15, e anticorpos anti-IL-23).

Um modulador de recetores de citocina é IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12 ou um, fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos. Um modulador de recetores de citocina é um anticorpo anti-IL-1 β , anticorpo anti-IL-6, anticorpo anti-IL-9, anticorpo anti-recetor de IL-12, ou anticorpo anti-TNF- α . Um modulador de recetores de citocinas é o domínio

extracelular de um recetor de TNF- α ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Um agente imunomodulador pode ser selecionado para interferir com as interações entre os subconjuntos de células T auxiliares (TH1 ou TH2) e células B para inibir a formação de anticorpos neutralizantes. Anticorpos que interferem com ou bloqueiam as interações necessárias à ativação das células B pelas células TH (T auxiliares), e assim bloqueiam a produção de anticorpos neutralizantes, que são úteis como agentes imunomoduladores nos métodos da invenção. Por exemplo, a ativação de células B por células T requer que ocorram certas interações (Durie et al., *Immunol. Today*, 15(9):406-410 (1994)), tal como a ligação do ligando CD40 na célula T auxiliar ao antigénio CD40 na célula B, e a ligação dos ligandos CD28 e/ou CTLA4 na célula T ao antigénio B7 na célula B. Sem ambas as interações, a célula B não consegue ser ativada para induzir a produção do anticorpo neutralizante.

A interação do ligando de CD40 (CD40L)-CD40 é um ponto desejável para bloquear a resposta imunitária devido à sua ampla atividade na ativação e função de células T auxiliares bem como a ausência de redundância na sua via sinalizadora. Assim, numa forma de realização específica da invenção, a interação de CD40L com CD40 é bloqueada transientemente no momento da administração de um ou mais dos agentes imunomoduladores. Isto pode ser realizado através do tratamento com um agente que bloqueia o ligando de CD40 na célula TH e interfere com a ligação normal do ligando de CD40 na célula T auxiliar com o antigénio de CD40 na célula B. Um anticorpo para o ligando de CD40 (anti-CD40L) (disponível a partir da Bristol-Myers Squibb Co; ver, e.g., pedido de patente Europeu 555 880, publicado em 18 de Agosto, 1993) ou uma molécula solúvel de CD40

podem ser selecionados e usados como um agente imunomodulador de acordo com os métodos aqui divulgados.

Um agente imunomodulador pode ser selecionado para inibir a interação entre células TH1 e linfócitos T citotóxicos ("CTLs") para reduzir a ocorrência de destruição mediada por CTL. Um agente imunomodulador pode ser selecionado para alterar (e.g., inibir ou suprimir) a proliferação, diferenciação, atividade e/ou função das células T CD4⁺ e/ou células T CD8⁺. Por exemplo, anticorpos específicos para células T podem ser usados como agentes imunomoduladores para eliminar, ou alterar a proliferação, diferenciação, atividade e/ou função das células T CD4⁺ e/ou CD8⁺.

Um agente imunomodulador que reduz ou inibe uma ou mais atividades biológicas (e.g., a diferenciação, proliferação, e/ou funções efetoras) de subconjuntos TH0, TH1, e/ou TH2 de células T auxiliares CD4⁺ é administrado a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos da invenção. Um exemplo de tal agente imunomodulador é IL-4. IL-4 acentua a atividade específica de antigénio das células TH2 à custa da função das células TH1 (ver, e.g., Yokota et al, 1986 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:5894-5898; e Pat. U.S. No. 5 017 691). Outros agentes imunomoduladores que afetam a atividade biológica (e.g., diferenciação, proliferação, e/ou funções efetoras) de células T auxiliares (em particular, células TH1 e/ou TH2) incluem, não estando limitados a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23, e interferão (IFN)- γ .

Um agente imunomodulador administrado a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos aqui divulgados pode ser uma citocina que evita a apresentação de antigénio. Um agente imunomodulador usado nos métodos da

invenção é IL-10. IL-10 também reduz ou inibe a ação dos macrófagos que envolve a eliminação bacteriana.

Um ou mais agentes imunomoduladores podem ser administrados a um indivíduo com uma infecção por RSV previamente a, subsequentemente a, ou concomitantemente com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo. Um ou mais agentes imunomoduladores podem ser administrados em combinação com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a um indivíduo com uma infecção por RSV para reduzir ou inibir um ou mais aspetos da resposta imunitária se for considerado necessário por um perito na especialidade. Qualquer técnica bem conhecida para um perito na especialidade pode ser usada para medir um ou mais aspetos da resposta imunitária num indivíduo particular, e assim determinar quando é que é necessário administrar um agente imunomodulador ao referido indivíduo. Numa forma de realização preferida, uma contagem absoluta média de linfócitos de aproximadamente 500 células/mm³, preferencialmente 600 células/mm³, 650 células/mm³, 700 células/mm³, 750 células/mm³, 800 células/mm³, 900 células/mm³, 1000 células/mm³, 1100 células/mm³, ou 1200 células/mm³ é mantida num indivíduo. Numa outra forma de realização preferida, não é administrado um agente imunomodulador a um indivíduo com uma infecção por RSV se a sua contagem absoluta de linfócitos for de 500 células/mm³ ou menos, 550 células/mm³ ou menos, 600 células/mm³ ou menos, 650 células/mm³ ou menos, 700 células/mm³ ou menos, 750 células/mm³ ou menos, ou 800 células/mm³ ou menos.

Um ou mais agentes imunomoduladores podem ser administrados em combinação com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a um indivíduo com uma infecção por RSV de modo a reduzir ou inibir

transientemente um ou mais aspetos da resposta imunitária. Tal inibição ou redução transiente de um ou mais aspetos do sistema imunitário pode durar horas, dias, semanas ou meses. Preferencialmente, a inibição ou redução transiente num ou mais aspetos da resposta imunitária dura algumas horas (e.g., 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, ou 48 horas), alguns dias (e.g., 3 dias, 4 dias, 5 dias, 6 dias, 7 dias, ou 14 dias), ou algumas semanas (e.g., 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas ou 6 semanas). A redução ou inibição transiente de um ou mais aspetos da resposta imunitária acentua o(s) efeito(s) profilático(s) e/ou terapêutico(s) de uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Proteínas, polipéptidos ou péptidos (incluindo anticorpos) que são utilizados como agentes imunomoduladores podem ser derivados da mesma espécie do recetor das proteínas, polipéptidos ou péptidos de modo a reduzir a probabilidade de uma resposta imunitária a essas proteínas, polipéptidos ou péptidos. Quando o indivíduo é um humano, as proteínas, polipéptidos, ou péptidos que são utilizados como agentes imunomoduladores podem ser humanos ou humanizados.

Moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas, polipéptidos, ou péptidos com atividade imunomoduladora ou proteínas, polipéptidos, ou péptidos com atividade imunomoduladora podem ser administradas a um indivíduo com uma infeção por RSV de acordo com os métodos aqui divulgados. Além disso, moléculas de ácido nucleico que codifica derivados, análogos, ou fragmentos de proteínas, polipéptidos, ou péptidos com atividade imunomoduladora, ou derivados, análogos, ou fragmentos de proteínas, polipéptidos, ou péptidos com atividade imunomoduladora podem ser administrados a um indivíduo com uma infeção por

RSV de acordo com os métodos aqui divulgados. Tais derivados, análogos, e fragmentos retêm a atividade imunomoduladora da proteína, polipéptido, ou péptido selvagem na sua completa sequência.

Agentes que estão comercialmente disponíveis e que são conhecidos como funcionando como agentes imunomoduladores são usados nos métodos aqui divulgados. A atividade imunomoduladora de um agente pode ser determinada *in vitro* e/ou *in vivo* por qualquer técnica bem conhecida para um perito na especialidade, incluindo, e.g., por ensaios CTL, ensaios de proliferação, e ensaios imunológicos (e.g. ELISAs) para a expressão de proteínas particulares tais como moléculas co-estimulatórias e citocinas.

5.6.2 Agentes anti-inflamatórios

Qualquer agente anti-inflamatório, incluindo agentes úteis em terapias para desordens inflamatórias, bem conhecidas para um perito na especialidade, podem ser usadas de acordo com métodos aqui divulgados para prevenir, tratar, gerir, ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Exemplos não limitantes de agentes anti-inflamatórios incluem fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), fármacos anti-inflamatórios esteroides, anticolinérgicos (e.g., sulfato de atropina, metilnitrato de atropina, e brometo de ipratrópio (ATROVENT™)), beta2-agonistas (e.g., abuterol (VENTOLIN™ e PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutlaína (BRETHAIRE™ e BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™, e VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™), e salmeterol (SEREVENT™ e SEREVENT DISKUS™)), e metilxantinas (e.g., teofilina (UNIPHYL™, THEO-DUR™, SLO-

BID™, e TEHO-42™)). Exemplos de NSAIDs incluem, não estando limitados a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), cetoralac (TORADOL™), oxaprozina (DIAPROT™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) e nabumetona (RELAFEN™). Tais NSAIDs funcionam através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (e.g., COX-1 e/ou COX-2). Exemplos de fármacos anti-inflamatórios esteroides incluem, não estando limitados a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (e.g., metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISON™ e DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ e PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inibidores de eicosanoides (e.g., prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos (ver Tabela 2, *infra*, para exemplos não limitantes de leucotrieno e dosagens típicas de tais agentes)).

5.6.3 Agentes antivirais

Qualquer agente antiviral bem conhecido para um perito na especialidade (em particular, um útil para o tratamento, prevenção, gestão, ou melhoria de uma infeção por RSV) pode ser usado de acordo com os métodos aqui divulgados para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Exemplos não limitantes de agentes antivirais incluem proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusão anticorpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e pequenas moléculas que inibem e/ou reduzem a ligação de um vírus ao seu recetor, a internalização de um vírus numa célula, a replicação de um vírus, ou libertação de um vírus

de uma célula. Em particular, agentes antivirais incluem, não estando limitados a, análogos nucleosídicos (e.g., zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, e ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferões alfa e outros interferões, e AZT.

Em formas de realização específicas, o agente antiviral é um agente anticorpo que não SYNAGIS® que é imuno específico para um antígeno viral. Tal como usado aqui, o termo "antígeno viral" inclui, não estando limitado a, qualquer péptido, polipéptido e proteína de RSV (e.g., glicoproteína RSV F e glicoproteína RSV G) que é capaz de desencadear uma resposta imunitária.

A infecção viral é RSV e o antígeno antiviral é um anticorpo que não seja SYNAGIS® que se liga de forma imuno específica a um antígeno de RSV. Em certas formas de realização, um anticorpo anti-antígeno RSV liga-se de forma imuno específica a um antígeno RSV do Grupo A de RSV. O anticorpo anti-antígeno RSV liga-se de forma imuno específica a um antígeno RSV do Grupo B de RSV. O anticorpo anti-antígeno RSV liga-se de forma imuno específica a um antígeno de RSV do Grupo e reage de forma cruzada com o antígeno análogo do outro Grupo. O anticorpo anti-antígeno RSV liga-se de forma imuno específica a uma nucleoproteína RSV, fosfoproteína RSV, proteína RSV da matriz, pequena proteína RSV hidrofóbica, RNA polimerase dependente de RNA RSV, proteína RSV F, e/ou proteína RSV G. O anticorpo anti-antígeno RSV liga-se a variantes alélicas de uma nucleoproteína RSV, uma proteína RSV nucleocapsídica, um fosfoproteína RSV, uma proteína da matriz RSV, uma glicoproteína RSV de ligação, uma glicoproteína RSV de fusão, uma proteína nucleocapsídica RSV, uma proteína da matriz RSV, uma

pequena proteína hidrofóbica RSV, uma RNA polimerase dependente de RNA RSV, uma proteína RSV F, uma proteína RSV L, uma proteína RSV P, e/ou uma proteína RSV G.

Terapias antivirais e as suas dosagens, vias de administração e uso recomendado são conhecidos no estado da técnica e foram descritos na literatura, como no Physician's Desk Preference (57th ed., 2003). Informação adicional sobre infecções respiratórias virais está disponível no Cecil Textbook of Medicine (18th ed., 1988).

5.7 Métodos de administração das formulações SYNAGIS®

Métodos de tratamento, profilaxia, e melhoria de uma infecção por RSV ou de um ou mais sintomas da mesma podem compreender administrar a um indivíduo uma quantidade eficaz de formulações líquidas da invenção. O indivíduo pode ser um mamífero tal como não-primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cães, ratos etc.) e um primata (e.g., macaco tal como macaco cinomolgo e um humano). O indivíduo pode ser um humano. O indivíduo pode ser uma criança humana ou uma criança humana nascida prematuramente.

Vários sistemas de libertação são conhecidos e podem ser usados para administrar uma formulação líquida da presente invenção. Métodos para administrar formulações líquidas de SYNAGIS® aqui divulgadas incluem, não estando limitados a, administração parentérica (e.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), administração em epidural, administração tópica, administração pulmonar, e administração mucosa (e.g., vias intranasal e oral). Formulações líquidas aqui divulgadas são administradas intramuscularmente, intravenosamente, ou

subcutaneamente e, preferencialmente, intramuscularmente. As formulações podem ser administradas através de qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção em bólus, por absorção através das camadas epitelial ou mucocutânea (e.g., mucosa oral, retal e intestinal, etc.) e podem ser administradas juntamente com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. Adicionalmente, pode ser utilizada administração pulmonar, e.g., através do uso de um inalador ou nebulizador.

A invenção fornece também que uma formulação líquida aqui divulgada é embalada num recipiente hermeticamente selado tal como uma ampola ou saqueta indicando a quantidade de SYNAGIS® ou fragmentos de ligação ao antigénio do mesmo. As formulações líquidas aqui divulgadas podem estar num recipiente hermeticamente selado indicando a quantidade e a concentração de um anticorpo ou fragmento de anticorpo. A formulação líquida aqui divulgada pode ser fornecida num recipiente hermeticamente selado a pelo menos 15 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL, ou 300 mg/mL e, mais preferencialmente, 105 mg/mL, numa quantidade de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, ou 20 mL e, mais preferencialmente, 1,2 mL.

A quantidade de formulações líquidas aqui divulgadas que serão eficazes na prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma pode ser determinada através de técnicas clínicas padrão. Por exemplo, a dosagem da composição que será eficaz no tratamento, prevenção ou melhoria de sintomas associados a uma infeção por RSV pode ser determinada através da administração da formulação a um rato do algodão, medindo o

título de RSV após submeter o rato do algodão a 10^5 pfu de RSV e comparando o título de RSV ao obtido para um rato do algodão ao qual a formulação não foi administrada. De forma concordante, uma dosagem que resulte numa diminuição log 2 ou uma redução de 99% no título de RSV no rato do algodão submetido a 10^5 pfu de RSV relativamente ao rato do algodão submetido a 10^5 pfu de RSV mas ao qual não foi administrada a formulação é a dosagem da formulação que pode ser administrada a um humano para prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. A dosagem da formulação que será eficaz na prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma pode ser determinada através da administração da formulação a um modelo animal (e.g., um rato do algodão ou macaco) e medindo o título do soro de SYNAGIS® ou fragmentos de ligação ao antigénio do mesmo. De forma concordante, uma dosagem da formulação que resulte num título do soro de pelo menos 1 µg/mL, preferencialmente 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, pelo menos 35 µg/mL, pelo menos 40 µg/mL, pelo menos 50 µg/mL, pelo menos 75 µg/mL, pelo menos 100 µg/mL, pelo menos 125 µg/mL, pelo menos 150 µg/mL, pelo menos 200 µg/mL, pelo menos 250 µg/mL, pelo menos 300 µg/mL, pelo menos 350 µg/mL, pelo menos 400 µg/mL, ou pelo menos 450 µg/mL pode ser administrada a um humano para prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Adicionalmente, ensaios *in vitro* podem opcionalmente ser realizados para ajudar a identificar intervalos de dosagem ótimos.

A dose precisa a ser empregue na formulação dependerá também da via de administração, e da seriedade da infeção por RSV, e deverá ser decidida de acordo com o juízo do profissional de saúde e as circunstâncias de cada paciente.

Doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas dosagem-resposta derivadas de sistemas de teste *in vitro* ou em modelo de animal (*e.g.*, o rato do algodão ou macaco cinomolgo).

Para anticorpos (*e.g.*, SYNAGIS[®]), proteínas, polipéptidos, péptidos e proteínas de fusão, a dosagem administrada a um doente é tipicamente cerca de 1 mg/kg a 30 mg/kg do peso corporal do doente. Preferencialmente, a dosagem administrada a um doente é entre 10 mg/kg e 20 mg/kg do peso corporal do doente, mais preferencialmente 15 mg/kg do peso corporal do doente. Geralmente, os anticorpos humanos tem um tempo de meia vida mais extenso dentro do corpo humano que os anticorpos de outras espécies, devido à resposta imunitária aos polipéptidos estranhos. Assim, dosagens mais baixas de anticorpos humanos e administração menos frequente são muitas vezes possíveis. Além disso, a dosagem, volume e frequência de administração de formulações líquidas aqui divulgadas podem ser reduzidas aumentando a concentração de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo nas formulações, aumentando a afinidade e/ou avidéz de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, e/ou aumentando o tempo de meia vida de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Doses exemplificativas de uma pequena molécula incluem quantidades miligrama ou micrograma da pequena molécula por quilograma de indivíduo ou peso de amostra (*e.g.*, cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 500 miligramas por quilograma, cerca de 100 microgramas por quilograma a cerca de 5 miligramas por quilograma, ou cerca de 1 micrograma por quilograma a cerca de 50 microgramas por quilograma).

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma formulação líquida estável da presente invenção para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para diminuir os títulos de RSV. Uma quantidade eficaz de formulações líquidas aqui divulgada reduz os títulos de RSV no pulmão tal como medido, por exemplo, pela concentração de RSV em amostras de saliva ou de uma lavagem dos pulmões de um mamífero. A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma formulação líquida aqui divulgada para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir uma resposta imunitária no mamífero.

A um mamífero, preferencialmente um humano, é administrada uma primeira dose de formulação líquida aqui divulgada compreendendo 30 mg/kg ou menos, 15 mg/kg ou menos, 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5 mg/kg ou menos de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 1 µg/mL, preferencialmente pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 5 µg/mL, pelo menos 10 µg/mL, pelo menos 15 µg/mL, pelo menos 20 µg/mL, pelo menos 25 µg/mL, pelo menos 30 µg/mL, pelo menos 35 µg/mL, pelo menos 40 µg/mL, 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35, 40 dias) após administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Uma formulação líquida aqui divulgada compreende SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo e pode ser administrada a um indivíduo uma primeira dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg para induzir um título do soro de

cerca de 40 µg/mL ou superior, 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título do soro do referido SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é menor que 50 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo 30 mg/kg ou menos, 15 mg/kg ou menos, 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos ou 0,5 mg/kg ou menos de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 1 µg/mL, preferencialmente pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 5 µg/mL, pelo menos 10 µg/mL, pelo menos 15 µg/mL, pelo menos 20 µg/mL, ou pelo menos 25 µg/mL 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35, 40 dias) após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título do soro do referido SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é menor que 30 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo 30 mg/kg ou menos, 15 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos ou 0,5 mg/kg ou menos de um SYNAGIS® modificado ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma, que tem um tempo

de meia vida aumentado *in vivo* numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 1 µg/mL, preferencialmente pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 5 µg/mL, pelo menos 10 µg/mL, pelo menos 15 µg/mL, pelo menos 20 µg/mL, ou pelo menos 25 µg/mL 25 dias (preferencialmente 30, 35, ou 40 dias) após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título do soro do referido SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é menor que 30 µg/mL, 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo 30 mg/kg ou menos, 15 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5 mg/kg ou menos de um SYNAGIS® modificado ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma que tem um tempo de meia vida *in vivo* aumentado numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 1 µg/mL, preferencialmente pelo menos 2 µg/mL, pelo menos 5 µg/mL, pelo menos 10 µg/mL, pelo menos 15 µg/mL, pelo menos 20 µg/mL, ou pelo menos 25 µg/mL 25 dias (preferencialmente 30, 35, ou 40 dias) após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título do soro do referido SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é menor que 30 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose da formulação líquida aqui divulgada compreendendo aproximadamente 30 mg/kg ou menos,

15 mg/kg ou menos (preferencialmente 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5 mg/kg ou menos) de uma forma modificada de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo que tem um tempo de meia vida in vivo aumentado para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 30 µg/mL, preferencialmente pelo menos 35 µg/mL, pelo menos 40 µg/mL, ou pelo menos 50 µg/mL 25 dias (preferencialmente 30, 35, ou 40 dias) após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada para entrega a nível dos pulmões compreendendo 30 mg/kg ou menos, 15 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, 0,5 mg/kg ou menos, ou 0,01 mg/kg ou menos de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título de pelo menos 20 ng por mg de proteína pulmonar (preferencialmente pelo menos 40 ng/mg, pelo menos 60 ng/mg, pelo menos 80 ng/mg, pelo menos 50 ng/mg, pelo menos 75 ng/mg, pelo menos 100 ng/mg, ou pelo menos 150 ng/mg) numa amostra de intubação ou lavagem do pulmões do referido mamífero 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35, ou 40 dias) após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título do soro do referido SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é menor que 100 ng/mL de proteína 30 dias após a administração da primeira dose e previamente à administração de uma dose subsequente.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5 mg/kg ou menos de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 35 µg/mL, pelo menos 40 µg/mL, pelo menos 50 µg/mL, pelo menos 80 µg/mL, pelo menos 100 µg/mL, pelo menos 120 µg/mL, pelo menos 150 µg/mL, pelo menos 200 µg/mL, pelo menos 250 µg/mL, ou pelo menos 300 µg/mL 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35 ou 40 dias) após a administração da primeira dose. A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada a primeira dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo aproximadamente 15 mg/kg de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título do soro de pelo menos 100 µg/mL, pelo menos 125µg/mL, pelo menos 150 µg/mL, pelo menos 200 µg/mL, pelo menos 250 µg/mL, pelo menos 300 µg/mL, pelo menos 350 µg/mL, pelo menos 400 µg/mL, ou pelo menos 450 µg/mL 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35 ou 40 dias) após a administração da primeira dose. O termo "aproximadamente 15 mg/kg" tal como usado aqui refere-se a um intervalo entre 14 mg/kg e 16 mg/kg.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada a dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para a prevenção de uma infeção por RSV ou a sintoma da mesma numa quantidade eficaz para

induzir um título do soro profilaticamente eficaz de menos de 10 µg/mL, menos de 8 µg/mL, menos de 5 µg/mL, menos de 3 µg/mL, menos de 1 µg/mL, ou menos de 0,5 µg/mL 30 dias após a administração da dose, em que o referido título do soro profilaticamente eficaz é o título do soro que reduz a incidência de infecção por RSV no humano ou o título do soro num rato do algodão que resulta num título de RSV 5 dias após submeter a RSV 10^5 pfu que seja 99% menor que o título RSV no rato do algodão 5 dias após submissão a 10^5 pfu de RSV num rato do algodão ao qual não foi administrada a dose prévia à submissão. Preferencialmente, a dose da composição terapêutica ou farmacêutica compreende 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5 mg/kg ou menos de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

A um mamífero, preferencialmente um humano, pode ser administrada uma dose de uma formulação líquida aqui divulgada compreendendo SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo para o tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma numa quantidade eficaz para induzir um título terapeuticamente eficaz do soro de menos de 10 µg/mL, menos de 8 µg/mL, menos de 5 µg/mL, menos de 3 µg/mL, menos de 1 µg/mL, ou menos de 0,5 µg/mL 30 dias após a administração da dose, em que o referido título do soro terapeuticamente eficaz é o título do soro que reduz a severidade ou extensão de infecção por RSV ou é o título do soro num rato do algodão que resulta num título de RSV no rato 5 dias após submeter a RSV 10^5 pfu que é 99% menor que o título de RSV 5 dias após submissão a com 10^5 pfu de RSV num rato do algodão ao qual não foi administrada a dose prévia à submissão. Preferencialmente, a dose da formulação líquida da presente invenção compreende 12 mg/kg ou menos, 10 mg/kg ou menos, 5 mg/kg ou menos, 3 mg/kg ou menos, 1 mg/kg ou menos, ou 0,5

mg/kg ou menos de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Formulações aqui divulgadas podem ser administradas uma vez por mês imediatamente antes ou durante a época de RSV. As formulações podem ser administradas a cada dois meses imediatamente antes ou durante a época de RSV. As formulações estáveis aqui divulgadas podem ser administradas uma vez imediatamente antes ou durante a época de RSV. O termo "época de RSV" refere-se ao período no qual a infeção por RSV tem maior probabilidade de ocorrer. Tipicamente, a época de RSV no hemisfério norte começa em Novembro e dura até Abril.

Uma formulação líquida compreendendo aproximadamente 5 mg/kg ou menos (preferencialmente 1,5 mg/kg ou menos) de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo pode ser administrada cinco vezes, 3 vezes ou 1 a 2 vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano. Aproximadamente 1,5 mg/kg de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, nas formulações líquidas aqui divulgadas podem ser administrados mensalmente cinco vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. 3 mg/kg de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo na formulação líquida aqui divulgada podem ser administrados mensalmente 3 vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. 5 mg/kg de um SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo numa formulação líquida aqui divulgada podem ser administrados mensalmente uma a duas vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente.

15 mg/kg de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao

antigénio do mesmo na formulação líquida aqui divulgada pode ser administrada a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente cinco vezes durante uma época RSV, em que o referido SYNAGIS[®] ou fragmento de anticorpo tem um tempo de meia vida aumentado *in vivo*. Aproximadamente 5 mg/kg ou menos (preferencialmente 1,5 mg/kg ou menos) de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo na formulação líquida aqui divulgada podem ser administrados cinco vezes, 3 vezes, ou 1 a 2 vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano. 3 mg/kg de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, que tem um tempo de meia vida *in vivo* aumentado, na formulação líquida aqui divulgada podem ser administrados mensalmente três vezes durante uma época RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. 5 mg/kg de SYNAGIS[®] ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, que tem um tempo de meia vida aumentado *in vivo*, na formulação líquida aqui divulgada podem ser administrados a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente duas vezes durante uma época RSV.

5.8 Ensaios biológicos

5.8.1 Imuno especificidade dos anticorpos da invenção

Os anticorpos da presente invenção ou fragmentos dos mesmos podem ser caracterizados de uma variedade de maneiras bem conhecidas para um perito na especialidade. Em particular, anticorpos da invenção ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos numa formulação líquida aqui divulgada podem ser submetidos a ensaios quanto à capacidade de se ligarem de forma imuno específica a um epítipo de um vírus sincicial respiratório. Tal ensaio pode ser realizado em

solução (e.g., Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), em *beads* (esferas) (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), em *chips* (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), em bactérias (Patente U.S. No. 5 223 409), em esporos (Patentes U.S. Nos. 5 571 698; 5 403 484; e 5 223 409), em plasmídeos (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) ou em fago (Scott e Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; e Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310). SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo numa formulação líquida aqui divulgada pode ser submetido a ensaios quanto à sua especificidade e afinidade.

SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo aqui divulgado pode ser submetido a ensaio quanto à ligação imuno específica a um antigénio RSV e reatividade cruzada com outros antigénios através de qualquer método conhecido no estado da técnica. Ensaio imunológicos que podem ser usados para analisar a ligação imuno específica e reatividade cruzada incluem, não estando limitados a, sistemas de ensaios competitivos e não competitivos usando técnicas tal como *western blots*, radioensaio, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), ensaios imunológicos "sandwich", ensaios de imunoprecipitação, reações precipitina, reações de precipitina de difusão de gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imunoradiométricos, ensaios imunológicos fluorescentes, ensaios imunológicos de proteína A, para mencionar alguns. Tais ensaios são rotineiros e bem conhecidos no estado da técnica (ver, e.g., Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que é aqui inteiramente incorporado pela referência).

5.8.2 Ensaaios *in vitro* e *in vivo*

Uma formulação líquida ou uma terapia de combinação aqui divulgada pode ser testada *in vitro* e/ou *in vivo* em vários ensaios ou sistemas de modelos animais adequados quanto à sua atividade.

Uma formulação líquida aqui divulgada para tratar, gerir, prevenir ou melhorar uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma pode ser testada quanto à sua capacidade para inibir a replicação viral ou reduzir a carga viral em ensaios *in vitro*. Por exemplo, a replicação viral pode ser analisada por um ensaio em placa tal como descrito, e.g., por Johnson et al., 1997, *Journal of Infectious Diseases* 176:1215-1224. Uma formulação líquida aqui divulgada administrada de acordo com os métodos da invenção pode também ser submetida a ensaio quanto à sua capacidade para inibir ou regular negativamente a expressão dos polipéptidos virais. Técnicas conhecidas para aqueles peritos na especialidade, incluindo, não estando limitadas a, análise *western blot*, análise *northern blot* e RT-PCR podem ser usadas para medir a expressão de polipéptidos virais e/ou títulos virais.

Uma formulação líquida aqui divulgada pode ser testada em sistemas de modelo animal adequados previamente ao uso em humanos. Tais sistemas de modelo animal incluem, não estando limitados a, ratos, ratinhos, galinhas, vacas, macacos, porcos, cães, coelhos, etc. Qualquer Sistema animal bem conhecido no estado da técnica pode ser usado. Vários aspetos do procedimento podem variar; os referidos aspetos incluem, não estando limitados a, o regime temporal de administração das terapias (e.g., agentes profiláticos e/ou terapêuticos) quer se tais terapias são administradas

separadamente ou como uma mistura, e a frequência de administração das terapias.

Podem ser usados modelos animais para avaliar a eficácia dos métodos aqui divulgados para tratar, gerir, prevenir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Modelos animais para a infecção por RSV incluem, não estando limitados a, aqueles descritos por, e.g., Piedimonte et al., *Am J Physiol* 1999, 277:L831-L840; McArthur-Vaughan et al., *J. Med. Primatol.* 2002, 31(2):61-73; e Byrd et al., *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25(6): 1363-8. Numa forma de realização específica, a ratos do algodão é administrada uma formulação líquida compreendendo SYNAGIS[®] de acordo com os métodos da invenção, são submetidos a 10^5 pfu de RSV, e quatro ou mais dias depois, os ratos são sacrificados e o título de RSV e o título de SYNAGIS[®] soro são determinados. De uma forma concordante, uma dosagem que resulta num decréscimo log 2 uma redução de 99% no título de RSV no rato do algodão submetido a 10^5 pfu de RSV relativamente ao rato do algodão submetido a 10^5 pfu de RSV mas ao qual não foi administrada a formulação é a dosagem da formulação que pode ser administrada a um humano para o tratamento, prevenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. Além disso, nesta forma de realização, os tecidos (e.g., os tecidos do pulmão) dos ratos sacrificados podem ser examinados quanto a alterações histológicas.

A administração de uma formulação líquida aqui divulgada de acordo com os métodos da presente invenção pode ser testada quanto à sua capacidade para diminuir o decurso temporal de uma infecção por RSV em pelo menos 25%, preferencialmente pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. Uma formulação líquida aqui divulgada pode também ser testada quanto à sua

capacidade para aumentar o período de sobrevivência de humanos que sofrem de uma infecção por RSV em pelo menos 25%, preferencialmente pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. Além disso, uma formulação líquida da invenção pode ser testada quanto à sua capacidade para reduzir o período de hospitalização de um humano que sofre de uma infecção por RSV em pelo menos 60%, preferencialmente pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. Técnicas conhecidas para aqueles peritos na especialidade podem ser usadas para analisar a função de uma formulação líquida da invenção *in vivo*.

Mais, quaisquer ensaios *in vitro* ou *in vivo* conhecidos para aqueles peritos na especialidade podem ser usados para avaliar a utilidade profilática e/ou terapêutica de uma formulação líquida da invenção aqui divulgada para uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma.

5.8.3 Ensaios de toxicidade

A toxicidade e/ou eficácia dos protocolos profiláticos e/ou terapêuticos aqui divulgados podem ser determinados através de procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, e.g., para determinar a LD50 (a dose letal para 50% da população) e a ED50 (a dose terapêuticamente eficaz em 50% da população). A razão de doses entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a razão LD50/ED50. Terapias que exibem elevados índices terapêuticos são preferidas. Enquanto terapias que exibem efeitos secundários tóxicos podem ser usadas, deverá tratar-se de desenhar um sistema de entrega que seja dirigido a tais agentes para o local do tecido afetado de forma a minimizar

potenciais danos em células não infectadas e, dessa forma, reduzir os efeitos secundários.

Os dados obtidos a partir dos ensaios de culturas celulares e estudos animais podem ser usados na formulação de um intervalo de dosagens dos agentes profiláticos e/ou terapêuticos para uso em humanos. A dosagem de tais agentes baseia-se preferencialmente num intervalo de concentrações de circulação que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro deste intervalo dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada. Para qualquer terapia usada no método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir um intervalo de concentrações de circulação no plasma que incluía a IC50 (*i.e.*, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição meio-máxima de sintomas) tal como determinado em cultura celular. Tal informação pode ser usada para mais precisamente determinar doses úteis em humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, for exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho.

5.9 Kits

Um pacote farmacêutico ou *kit* pode compreender um ou mais recipientes contendo uma formulação líquida aqui divulgada para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infeção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma. As formulações líquidas aqui divulgadas compreendem SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo fundido de forma recombinante ou conjugado quimicamente a outro grupo, incluindo mas não estando limitado a, uma proteína heteróloga, um polipéptido heterólogo, um péptido

heterólogo, uma molécula de grandes dimensões, uma pequena molécula, uma sequência marcadora, um agente diagnóstico ou detetável, um grupo funcional terapêutico, um grupo funcional farmacológico, um ião metálico radioativo, um segundo anticorpo, e um suporte sólido.

Aqui divulgados são *kits* que podem ser usados nos métodos acima. Um *kit* pode compreender uma formulação líquida aqui divulgada, em um ou mais recipientes. Um *kit* pode compreender uma formulação líquida aqui divulgada, em um ou mais recipientes, e um ou mais outros agentes profiláticos ou terapêuticos úteis para a prevenção, gestão ou tratamento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas da mesma, em um ou mais outros recipientes. O *kit* pode compreender adicionalmente instruções para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV (e.g., usando as formulações líquidas da invenção sozinhas ou em combinação com outro agente profilático ou terapêutico), bem como informação sobre os efeitos secundários e dosagem para o método de administração. Opcionalmente associados a tal(is) recipiente(s) pode estar um aviso, na forma prescrita pela agência reguladora governamental do fabrico, uso ou venda e fármacos ou produtos biológicos, que reflita a aprovação pela agência de fabrico uso ou venda para administração humana.

6. EXEMPLOS

6.1 Exemplo 1 (Estudo de estabilidade)

Uma formulação de anticorpo da presente invenção compreendendo, num transportador aquoso, 25 mM de histidina, 1,6 mM de glicina, e SYNAGIS[®] a pH 6 foi preparada de acordo com o seguinte protocolo:

Para uma solução de 1 kg de tampão: em 800 g de água, 3,875 g de histidina (base livre) e 0,12 g de glicina foram dissolvidos. O pH foi ajustado com HCl 6 N para $6,0 \pm 0,2$. Adicionou-se água para levar a massa total até 1,0 kg (qs).

Para a diafiltração: Após uns passos de cromatografia no processo de purificação, SYNAGIS[®] foi concentrado até um alvo de 150 g/L. O produto concentrado é submetido a diafiltração num tampão de formulação. O produto formulado foi diluído até uma concentração de fabrico alvo de 103 ± 3 g/L.

Para um estudo de estabilidade, duas formulações foram preparadas: uma continha 105 mg/mL de SYNAGIS[®] e a outra continha 160 mg/mL de SYNAGIS[®]. A estabilidade de cada formulação foi medida usando HPSEC em termos de graus de formação de agregado e fragmentação durante o armazenamento a 2-8°C durante até 15 meses e a 38-42°C durante até 1 ano. Para a análise HPSEC, tipicamente, uma coluna TosoHaas G3000WXL com uma fase móvel contendo 0,1 M de fosfato de sódio e 0,1 M de sulfato de sódio, pH 6,8, é usada a um fluxo de 0,8 mL/min. Uma amostra contendo 250 mg de proteína num volume apropriado é injetada na coluna e os picos de proteína são detetados através de 280 nm UV e/ou fluorescência (excitação a 280 nm e emissão a 340 nm).

Os dados mostraram que não houve um aumento detetável na agregação quando cada formulação de SYNAGIS[®] foi armazenada a 2-8°C durante 15 meses tal como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Percentagem de agregados durante o armazenamento a 2-8°C.

Mês	% Agregados	
	105 mg/mL	160 mg/mL
0	0,3	0,4
5	0,3	0,3
8	0,4	---
12	0,4	---
15	0,4	0,5

± erro de 0,1%.

Quando as formulações foram armazenadas a 38-42°C durante 60 dias, foi observado cerca de 1,5% de aumento de agregado com a formulação contendo 105 mg/mL de SYNAGIS® e foi observado 2,0% de aumento com a formulação contendo 160 mg/mL de SYNAGIS®.

6.2 Exemplo 2 (Estudo clínico)

A formulação líquida da presente invenção compreendendo 100 mg/mL de SYNAGIS® numa solução aquosa contendo 25 mM de histidina e 1,6 mM de glicina a pH 6 é testada quanto à segurança e tolerabilidade num estudo de fase I, grupo paralelo, dupla ocultação, randomizado em dois locais. Os fármacos em estudo são uma formulação líquida (Liq) de SYNAGIS® e uma formulação liofilizada (Lio) presentemente licenciada de SYNAGIS®. Um total de 48 voluntários foi randomizado para um de quatro grupos de tratamento:

GRUPO 1:	N=12	3 mg/kg SYNAGIS® (Liq) nos dias 0 e 30 do estudo (IM)
GRUPO 2:	N=12	3 mg/kg SYNAGIS® (Lio) nos dias 0 e 30 do estudo (IM)
GRUPO 3:	N=12	15 mg/kg SYNAGIS® (Liq) no dia 0 do estudo (IV)
GRUPO 4:	N=12	15 mg/kg SYNAGIS® (Lio) no dia 0 do estudo (IV)

Os sinais vitais serão obtidos antes e 30 minutos após cada dose do fármaco em estudo. Efeitos adversos serão monitorizados durante 30 dias após uma última dose de fármaco em estudo e efeitos adversos sérios serão monitorizados até ao dia 60 do estudo.

No dia 0 do estudo, a todos os voluntários será colhido sangue para a concentração de SYNAGIS® do soro antes do doseamento, no fim da infusão (apenas grupos de dose IV), e a 0,25, 0,5, 1, 4, 8, e 12 horas após a injeção IM ou fim da infusão. Subsequentemente, amostras de sangue para determinação dos níveis de SYNAGIS® serão colhidas diariamente ao longo do dia 5 do estudo e nos dias 7, 14, 21, 30, 37 (apenas grupos IM), e 60 do estudo. Amostras de soro para os anticorpos anti-SYNAGIS® serão colhidas nos dias 0, 7, 14, 21, 30, 37 (apenas grupos IM), e 60 do estudo. Amostras para química do soro e CBC com diferencial e plaquetas, e amostras de urina para análise à urina serão colhidas no dia 0 do estudo bem como 7 dias após cada dose de SYNAGIS® (dia 7 do estudo para os grupos IV e dias 7 e 37 do estudo para os grupos IM). Testes a β HCG na urina serão realizados no dia do doseamento antes de cada dose de SYNAGIS® (dia 0 do estudo para os grupos IV e dias 0 e 30 do estudo para os grupos IM). Um diagrama de fluxo do estudo é mostrado na Fig. 2.

6.2.1 Procedimentos do estudo

A. Seleção de voluntários

OS voluntários neste estudo serão adultos saudáveis do sexo masculino ou feminino. O voluntário será aconselhado por um investigador (médico) que cuidará das questões e preocupações do voluntário e assegurará um consentimento informado escrito para participação no estudo. O consentimento informado escrito será obtido antes de conduzir os procedimentos do estudo ou da administração do fármaco em estudo.

a. Critérios de inclusão

Os voluntários devem *cumprir todos* os seguintes critérios:

1. Sexo masculino ou feminino.
2. Idade de 18 até 49 anos no momento da primeira dose do fármaco em estudo.
3. Peso ≤ 150 kg.
4. Consentimento informado escrito obtido do voluntário.
5. Voluntários do sexo feminino, a menos que sejam estéreis cirurgicamente, devem ter usado um método eficaz de evitar a gravidez (incluindo contraceptivos orais ou implantados, DIU, preservativo feminino, diafragma com espermicida, capuz cervical, abstinência, use de um preservativo pelo parceiro sexual ou parceiro sexual estéril) durante 14 dias antes da primeira dose de fármaco em estudo, devem concordar em continuar a usar tais precauções durante 30 dias após uma dose final de fármaco em estudo, e devem ter um teste de gravidez do soro negativo dentro de 2 dias antes da primeira dose de fármaco em estudo.
6. Saudáveis por historial médico e exame físico.

7. Capacidade para completar o período de seguimento (*follow-up*) de 60 dias tal como requerido pelo protocolo.

b. Critérios de exclusão

Os voluntários não podem ter *nenhum* dos seguintes:

1. Doença aguda no início do estudo
2. Febre $\geq 99,5^{\circ}\text{F}$ no início do estudo
3. Qualquer terapia com fármacos 7 dias antes do dia 0 do estudo (excetuando contraceptivos)
4. Doação de sangue em excesso de 400 mL dentro de 6 meses antes do início do estudo
5. Recebimento de produtos de imunoglobulina ou produtos sanguíneos dentro de 60 dias antes da entrada no estudo
6. Recebimento de qualquer terapia com fármaco investigacional ou vacina padrão dentro de 120 dias antes da primeira dose de fármaco em estudo neste protocolo 60 dias após uma dose final de fármaco em estudo
7. Historial de imunodeficiência
8. Historial de doenças ou reações alérgicas com probabilidade de serem exacerbadas por qualquer componente do fármaco em estudo
9. Historial médico prévio ou evidência de doença intercorrente que possa comprometer a segurança do voluntário no estudo
10. Evidência de vírus da hepatite A, B, ou C ou HIV-1
11. No rastreio (deve ser dentro de 21 dias antes da entrada no estudo) de qualquer um dos seguintes: CBC: Hgb $< 12,0$ gm/dL; WBC $< 4000/\text{mm}^3$; contagem de plaquetas $< 120000/\text{mm}^3$ (ou valores laboratoriais normais); AST, ALT, BUN, creatinina $>$ limite

superior do normal; outros valores laboratoriais anormais no painel de rastreio para os quais a opinião do investigador principal é de que são clinicamente significativos; outros valores laboratoriais anormais no painel de rastreio para os quais a opinião do investigador principal é de que potencialmente confundem a análise dos resultados do estudo

12. Mãe a amamentar
13. Historial de abuso de álcool ou drogas nos últimos 2 anos
14. Evidência de qualquer doença sistémica no exame físico

B. Randomização

a. Procedimentos de randomização de voluntários e atribuição de tratamento

Na visita de rastreio, os voluntários serão avaliados pelo investigador principal para avaliar a elegibilidade para entrada no estudo. Um registo será mantido para todos os voluntários rastreados. Os voluntários que assinem um consentimento informado e que cumpram os critérios de elegibilidade entrarão no estudo e. Quando um voluntário chega ao local do estudo para randomização (dia 0 do estudo), o investigador irá confirmar que o voluntário cumpre todos os critérios de inclusão e de exclusão. O investigador irá então atribuir um número de identificação de doente (PID). Os números de identificação de doente serão atribuídos sequencialmente dentro de cada um dos locais do estudo começando com #101 no local 1 e com #201 no local 2. Os voluntários serão considerados como tendo entrado no estudo quando o PID é atribuído. Uma lista de

randomização fornecida ao farmacêutico em cada local do estudo irá conter atribuições dos quatro grupos de tratamento para os voluntários naquele local do estudo. O investigador irá notificar a MedImmune através de transmissão fac-símile (fax) a 301-527-4217 que um voluntário foi randomizado. Os voluntários aos quais tenha sido atribuído um PID e que não recebam qualquer fármaco em estudo, que recebam uma infusão incompleta do fármaco em estudo, que não recebam ambas as injeções IM do fármaco em estudo, ou que não completem pelo menos 50% das visitas do estudo podem ser substituídos ao critério do patrocinador. Voluntários que desistam devido a um efeito adverso cujo estado não possa ser apurado serão substituídos. Os voluntários que desistam devido a razões que não sejam um efeito adverso podem ser substituídos. Aos voluntários substituídos será atribuído um novo PID. Os voluntários que sejam substituídos continuarão a ser seguidos para segurança de acordo com o protocolo.

b. Ocultação

Este é um estudo de dupla ocultação. A ocultação para a atribuição da formulação liofilizada ou líquida aos voluntários nos grupos IM ou IV. De forma a manter a ocultação durante a administração das duas formulações de SYNAGIS[®], o farmacêutico do estudo em cada local irá preparar o fármaco em estudo num local fisicamente afastado da estação de tratamento e blindado contra a observação do investigador principal ou de qualquer pessoal do estudo diretamente envolvido na condução do estudo. Para a injeção IM, o farmacêutico irá preparar seringas de 5 mL com aparência idêntica contendo o volume calculado de um dos SYNAGIS[®] líquido ou liofilizado reconstituído. Para infusão IV, o farmacêutico irá preparar sacos de infusão de 200 mL

com aparência idêntica contendo o volume calculado de um dos SYNAGIS[®] líquido ou liofilizado reconstituído. As etiquetas não identificarão se a seringa/saco contém o SYNAGIS[®] líquido ou liofilizado reconstituído. Um monitor independente que irá rever apenas o registo da farmácia, o estatístico e o gestor de fornecimentos clínicos na MedImmune, e o farmacêutico do estudo no local do estudo são os únicos indivíduos que têm acesso à lista de randomização que identifica a atribuição do tratamento do estudo a um voluntário. Estes indivíduos não devem revelar a informação sobre a randomização a ninguém. No caso de um tratamento do estudo para um voluntário se tornar do conhecimento do investigador, a MedImmune deverá ser notificada imediatamente pelo investigador. Todas as instâncias de falta de ocultação serão documentadas no relatório do estudo.

C. Fármaco em estudo

a. Fornecimentos e responsabilidade do fármaco em estudo

O patrocinador irá fornecer ao investigador quantidades adequadas de SYNAGIS[®] líquido, SYNAGIS[®] liofilizado, e diluente (água estéril para injeção). O fármaco em estudo deverá ser armazenado a 2°C a 8°C (36°F a 46°F) e não deverá ser congelado.

O SYNAGIS[®] líquido será fornecido em ampolas de 3 mL contendo 100 mg produto líquido estéril numa volume de 1 mL (histidina 25 mM, mM glicina 1,6, a pH 6,0).

O SYNAGIS[®] liofilizado será fornecido em ampolas de 5 mL contendo 100 mg de produto liofilizado estéril que quando

formulado (antes da liofilização) contém histidina 25 mM, glicina 1,6 mM, e manitol 3% (p/v) a pH 6,0.

O farmacêutico do estudo é necessário para manter registos precisos de responsabilidade do fármaco. Aquando da conclusão do estudo, todos os registos de responsabilidade do fármaco em estudo serão devolvidos ao patrocinador. Todo o fármaco em estudo não usado será devolvido ao patrocinador.

b. Regimes de tratamento

Os seguintes regimes de tratamento foram empregues neste estudo:

GRUPO 1:	N=12	3 mg/kg SYNAGIS [®] (Liq) nos dias 0 e 30 do estudo (IM)
GRUPO 2:	N=12	3 mg/kg SYNAGIS [®] (Lio) nos dias 0 e 30 do estudo (IM)
GRUPO 3:	N=12	15 mg/kg SYNAGIS [®] (Liq) no dia 0 do estudo (IV)
GRUPO 4:	N=12	15 mg/kg SYNAGIS [®] (Lio) no dia 0 do estudo (IV)

c. Encomenda e preparação do fármaco em estudo

A dose de fármaco em estudo para administração deve ser preparada pelo farmacêutico do estudo. A forma de prescrição do fármaco em estudo indicando o PID e o peso corporal do voluntário serão enviados ao farmacêutico do estudo pelo investigador (ou designado). O farmacêutico do estudo irá então usar esta informação para preparar o fármaco em estudo.

Para preparar SYNAGIS[®] líquido ou liofilizado para administração, o farmacêutico deverá remover a porção

removível da tampa da ampola e limpar a borracha com etanol a 70% ou equivalente. A ampola deverá ser ventilada. As doses para cada voluntário serão calculadas tal como descrito abaixo com base no peso do voluntário (para a 0,1 quilograma mais próxima) no dia em que SYNAGIS[®] é administrado. A dose deverá ser arredondada para a 0,1 mL mais próxima. Todas as preparações de fármaco em estudo devem ser administradas dentro de 6 horas após entrarem na ampola de SYNAGIS[®]. Se não forem administradas dentro de 6 horas deverá ser usado uma nova ampola ou ampolas.

Preparação do SYNAGIS[®] líquido

- (1) **Para injeções IM:** O volume necessário de SYNAGIS[®] líquido (100 mg/mL) será obtido juntando os conteúdos de todas as ampolas necessárias com uma seringa de 5 mL.

Dose (mL) = [Peso do voluntário (kg) x Nível de dosagem (3 mg/kg)] ÷ Concentração do fármaco (100 mg/mL)

Exemplo: Um voluntário que pese 75,6 kg recebe 2,3 mL de SYNAGIS[®]

$(75,6 \text{ kg} \times 3 \text{ mg/kg}) \div 100 \text{ mg/mL} = 2,268 \text{ mL}$
(arredondado para 2,3 mL)

- (2) **Para infusões IV:** O volume necessário de SYNAGIS[®] líquido (100 mg/mL) será obtido juntando os conteúdos de todas as ampolas necessárias com uma com uma seringa de 20 mL (ou maior).

Dose (mL) = [Peso do voluntário (kg) x Nível de dosagem (15 mg/kg)] ÷ Concentração do fármaco (100 mg/mL)

Este volume de SYNAGIS® líquido será então injetado num saco de infusão vazio de 200 mL e diluído com diluente 1:4 adicionando quatro volumes de diluente ao saco para uma concentração final de 20 mg/mL de SYNAGIS®.

Exemplo: Um voluntário que pese 71,4 kg recebe 10,7 mL de SYNAGIS®

$(71,4 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg}) \div 100 \text{ mg/mL} = 10,71 \text{ mL}$
(arredondado para 10,7 mL)

e 42,8 mL de diluente (4 x 10,7) para um volume de infusão total de 53,5 mL.

Preparação do SYNAGIS® liofilizado

- (1) **Para injeções IM:** Um (1) mL de diluente deverá ser adicionado lentamente à ampola de SYNAGIS® liofilizado para uma concentração final de 100 mg/mL de SYNAGIS®. A ampola deverá ser então suavemente agitada rotativamente durante 30 segundos para evitar a formação de espuma. O SYNAGIS® reconstituído deverá ficar à temperatura ambiente durante um mínimo de 20 minutos até o SYNAGIS® ficar clarificado. O volume necessário de SYNAGIS® liofilizado reconstituído (100 mg/mL) será obtido juntando os conteúdos de todas as ampolas necessárias com uma seringa de 5 mL.

Dose (mL) = [Peso do voluntário (kg) x Nível de dosagem (3 mg/kg)] ÷ Concentração do fármaco (100 mg/mL)

Exemplo: Um voluntário que pese 75,6 kg recebe 2,3 mL de SYNAGIS®

$$(75,6 \text{ kg} \times 3 \text{ mg/kg}) \div 100 \text{ mg/mL} = 2,268 \text{ mL}$$

(arredondado para 2,3 mL)

- (2) Para infusões IV: Cinco (5) mL de diluente deverá ser adicionado lentamente à ampola de SYNAGIS® liofilizado para uma concentração final de 20 mg/mL de SYNAGIS®. A ampola deverá ser então suavemente agitada rotativamente durante 30 segundos para evitar a formação de espuma. O SYNAGIS® reconstituído deverá ficar à temperatura ambiente durante um mínimo de 20 minutos até o SYNAGIS® ficar clarificado. O volume necessário de SYNAGIS® liofilizado reconstituído (20 mg/mL) será obtido juntando os conteúdos de todas as ampolas necessárias com uma seringa de 20 mL (ou maior) e injetando este volume num saco de infusão vazio de 200 mL.

$$\text{Dose (mL)} = [\text{Peso do voluntário (kg)} \times \text{Nível de dosagem (15 mg/kg)}] \div \text{Concentração do fármaco (20 mg/mL)}$$

Exemplo: Um voluntário que pese 71,4 kg recebe 53,6 mL de SYNAGIS®

$$(71,4 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg}) \div 20 \text{ mg/mL} = 53,55 \text{ mL}$$

(arredondado para 53,6 mL)

e 42,8 mL de diluente (4 x 10,7) para um volume de infusão total de 53,5 mL.

d. Administração do fármaco em estudo

O fármaco em estudo para os grupos de tratamento IM e IV serão distribuídos pela farmácia em seringas de 5 mL com aparência idêntica e sacos de infusão de 200 mL com aparência idêntica, respectivamente.

Injeção IM

O fármaco em estudo será administrado por injeção IM no músculo deltoide (após confirmar que a agulha não está a atingir um vaso sanguíneo) usando uma técnica asséptica padrão. Os voluntários permanecerão em observação no local do estudo durante pelo menos 30 minutos após a injeção.

Infusão IV

Previamente à administração do fármaco, um cateter IV será colocado numa veia acessível usando técnicas de introdução padrão. A obstrução do cateter IV será mantida por uma infusão IV constante de dextrose a 5% para injeção USP a um fluxo de 10 a 25 mL/h. A infusão de dextrose será interrompida, e o SYNAGIS® será infundido através de um filtro de baixa ligação a proteína de 0,22 a um fluxo de aproximadamente 1-2 mL/minuto. Após o SYNAGIS® ter sido administrado, os tubos IV deverão ser lavados (*flushed*) e mantidos abertos com 5% Dextrose para injeção USP a 10 a 25 mL/h até o cateter IV ser removido.

e. Medicamentos concomitantes

Todas as medicações concomitantes usadas pelo voluntário desde o dia 0 do estudo até ao dia 60 do estudo serão

registadas no formulário de relatório do caso. Os voluntários não podem receber os seguintes:

1. Medicação imunossupressora (corticosteroides inalados e tópicos são permitidos).
2. Agentes investigacionais desde 120 dias antes da entrada no estudo até ao dia 60 do estudo.

O patrocinador deverá ser notificado se algum voluntário receber medicações concomitantes proibidas. Os voluntários podem receber medicações para tratar efeitos adversos se for considerado necessário pelo investigador ou pelo médico do voluntário.

D. Agendamento das avaliações dos voluntários

Todos os voluntários aos quais tenha sido atribuído um PID e recebam algum fármaco em estudo serão seguidos de acordo com o protocolo independentemente do número de doses de fármaco em estudo recebidas, a menos que o consentimento para o *follow-up* seja retirado. O patrocinador deverá ser notificado sobre todos os desvios ao protocolo desde visitas de protocolo ou avaliações e estas avaliações, se aplicáveis, deverão ser reagendadas ou realizadas no espaço de tempo mais próximo relativamente ao agendamento original.

Os voluntários serão instruídos a ligar ao pessoal do estudo para reportar quaisquer anomalias durante os intervalos entre visitas do estudo e para se dirigirem ao local do estudo se for necessária avaliação médica e a urgência da situação o permitir. Para emergências e outras visitas não planeadas a uma instalação médica que não seja o local do estudo, os registos médicos serão obtidos pelo investigador. O planeamento do rastreio e procedimentos de

visita do estudo é apresentado na Tabela 4, seguida de uma descrição detalhada de cada visita.

Tabela 4 Planeamento das avaliações dos voluntários

	Ras- treio	0	1	2	3	4	5	7	14	21	30	37	60
Consentimento informado escrito	x												
Verificação dos critérios de elegibilidade	x	x											
Historial médico	x												
Exame físico	x												
Altura e peso corporal ^g	x	x									x ^d		
Análise à urina	x	x						X				x ^d	
Hepatite A, B, C	x												
βHCG ^b do Soro	x												
βHCG ^b da Urina		x									x ^d		
Química ^c do Soro	x	x						X				x ^d	
CBC, Diferencial, Plaquetas	x	x						X				x ^d	
Nível de SYNAGIS [®] no Soro		x ^a	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x ^d	x
Anticorpo Anti-SYNAGIS [®]		x						X	x	x	x	x ^d	x
Sinais vitais ^e		x									x ^d		
Randomização/ atribuição de PID		x											
Injeção do fármaco em estudo (Grupos IM)		x									x ^d		
Infusão do fármaco em estudo (Grupos IV)		x											
Avaliação de Eventos Adversos ^f		x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x ^d	x

a. O sangue será amostrado para a concentração de SYNAGIS[®] do soro antes do doseamento, no fim da infusão (apenas grupos de dose IV), e a 0,25, 0,5, 1, 4, 8, e 12 horas após a injeção/fim da infusão.

b. Apenas voluntários do sexo feminino.

c. ALT, AST, BUN, Creatinina.

d. Apenas grupos de dose IM.

e. Sinais vitais obtidos antes e 30 minutos após cada dose.

- f. Eventos adversos até 30 dias após cada dose. Eventos adversos sérios até ao dia 60 do estudo.
- g. Peso corporal apenas no dia 30 do estudo.

a. Rastreio

Nota: Todas as avaliações laboratoriais de rastreio devem ser realizadas até 21 dias antes da entrada no estudo (Dia 0 do estudo). As avaliações de rastreio podem ser realizadas durante mais de uma visita.

1. Consentimento informado escrito
2. Verificar critérios de elegibilidade
3. Rastreio do historial médico
4. Rastreio do exame físico
5. Altura e peso corporal
6. Análise da urina
7. Colheita de sangue para rastreio
 - Soro para anticorpo da hepatite A, antigénio de superfície da hepatite B, anticorpo da hepatite C
 - β HCG no soro (apenas voluntários do sexo feminino)
 - Painel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas

Dia 0 do estudo: Dose 1

Visita 1

Verificar critérios de elegibilidade

1. Altura e peso corporal
2. Análise da urina
3. β HCG na urina (apenas voluntários do sexo feminino)
4. Colheita de sangue de linha de base

- Painel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
5. Randomização e atribuição de PID
 6. Sinais vitais antes da administração do fármaco em estudo (temperatura, tensão arterial, frequência cardíaca, taxa respiratória)

Nota: Todos os pontos acima deverão ser completados antes da administração do fármaco em estudo.

1. Administração do fármaco em estudo
2. Monitorizar os sinais vitais 30 minutos após injeção ou fim da infusão
3. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios
4. Colheita de sangue pós-dose.
 - Soro para níveis de SYNAGIS® imediatamente após a conclusão da infusão (apenas grupos de dose IV dose) e a 0,25, 0,5, 1, 4, 8, e 12 horas após injeção/fim da infusão

Dia 1 do estudo: amostragem farmacocinética da dose 1

Visita 2

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® do soro durante 24 horas
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 2 do estudo: amostragem farmacocinética da dose 1**Visita 3**

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® do soro durante 48 horas
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 3 do estudo: amostragem farmacocinética da dose 1**Visita 4**

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® do soro durante 72 horas
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 4 do estudo: amostragem farmacocinética da dose 1**Visita 5**

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® do soro durante 96 horas
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 5 do estudo: amostragem farmacocinética da dose 1**Visita 6**

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® do soro durante 120 horas
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia do estudo 7:**Visita 7**

1. Análise da Urina
2. Colheita de sangue
 - Painel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
3. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 14±1 do estudo:**Visita 8**

1. Colheita de sangue
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 21±1 do estudo:**Visita 9**

1. Colheita de sangue
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 30±1 do estudo:**Visita 10**

Todos os voluntários

1. Colheita de sangue
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
2. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios
Apenas voluntários nos grupos IM
3. Peso corporal
4. β HCG da Urina
5. Sinais vitais antes da administração do fármaco em estudo
6. Administração do fármaco em estudo
7. Monitorizar os sinais vitais 30 minutos após a injeção

Dia 37 \pm 1 do estudo:

Visita 11

Apenas voluntários em grupos IM

1. Análise à urina
2. Colheita de sangue
 - Painel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas
 - Soro para nível SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
3. Monitorizar efeitos adversos e eventos adversos sérios

Dia 60 \pm 2 do estudo:

Visita 12

Colheita de sangue

- Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS
1. Monitorizar eventos adversos sérios

E. Métodos de avaliação de voluntários

a. Avaliações de laboratório de rotina

Testes de laboratório de rotina durante o rastreio e durante o estudo serão realizados no laboratório clínico local de cada sítio do estudo. Testes de gravidez da urina serão realizados durante o estudo no sítio no estudo usando um teste licenciado. Os resultados laboratoriais anormais deverão ser repetidos o mais cedo possível (preferencialmente dentro de 24-48 horas).

b. Avaliações farmacocinéticas e imunológicas

A concentração do SYNAGIS[®] do soro e anticorpos anti-SYNAGIS[®] será medida através de MedImmune, Inc. através de ELISA.

F. Conclusão do estudo e perda para *follow-up*

Os voluntários serão considerados como tendo completado o estudo se foram seguidos até ao dia 60 do estudo. Deverá ser especificado no formulário do relatório do caso se o voluntário completou ou não os procedimentos de *follow-up* do estudo até ao dia 60 do estudo. Os voluntários serão considerados perdidos-no-*follow-up* apenas se não tiver sido estabelecido qualquer contacto até ao estudo estar completo de tal modo que não existe informação suficiente para determinar o estado do voluntário no dia 60 do estudo. O investigador deverá documentar as tentativas de reestabelecer contacto com os voluntários em falta durante o período do estudo. Se o contacto com um voluntário em

falta for reestabelecido, o *follow-up* deverá ser retomado de acordo com o protocolo.

Avaliações farmacocinéticas e imunológicas serão efetuadas com base em concentração de SYNAGIS® e anticorpos anti-SYNAGIS® do soro medidas por ELISA.

Equivalentes

Os peritos na especialidade reconhecerão ou estarão aptos a determinar, usando nada mais que a experimentação de rotina, muitos equivalentes às formas específicas de realização de invenção aqui descritas.

A citação ou discussão de uma referência não deverá ser interpretada como uma admissão que tal constitui estado da técnica relativamente à invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MedImmune, LLC

<120> Formulações líquidas estabilizadas de anticorpo anti-RSV

<130> PC/PG431000EPB

<150> 60/388,921

<151> 2002-06-14

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr ser Gly Met ser val Gly
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp val
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

Lisboa, 11 de Junho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparação de uma formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab, caracterizado por compreender:

(a) concentrar uma fração purificada de palivizumab ou de um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo até uma concentração final de cerca de 70 mg/mL, cerca de 80 mg/mL, ou cerca de 90 mg/mL, cerca de 100 mg/mL ou 200 mg/mL usando uma membrana semipermeável e submeter a diafiltração o palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab concentrado num tampão de formulação compreendendo 10 mM a 50 mM de histidina e menos de 3 mM de glicina, em que o palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab está numa fase aquosa durante a preparação da formulação aquosa estável de palivizumab, e em que a formulação aquosa de elevada concentração é estável a 38° C a 42° C durante pelo menos 60 dias, tal como avaliado através de cromatografia de exclusão de tamanho de alta eficiência (HPSEC); ou

(b) concentrar uma fração purificada de palivizumab ou de um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo até uma concentração final de cerca de 150 mg/mL e submeter a diafiltração o palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab concentrado num tampão de formulação compreendendo 25 mM de histidina e 1,6 mM de glicina, em que o palivizumab ou o fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab está numa

fase aquosa durante a preparação da formulação aquosa estável de palivizumab, e em que a formulação aquosa de elevada concentração é estável a 2° C a 8° C durante pelo menos 15 meses, tal como avaliado através de HPSEC.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1a, caracterizado por o tampão da formulação compreender cerca de 20 mM a cerca de 30 mM de histidina, cerca de 23 mM a cerca de 27 mM de histidina, ou cerca de 25 mM de histidina.
3. Processo de acordo com as reivindicações 1a ou 2, caracterizado por o tampão da formulação compreender menos de 2 mM de glicina ou 1,6 mM de glicina.
4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável ter um pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0, um pH de cerca de 5,5 a cerca de 6,5, ou um pH de cerca de 6,0.
5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender adicionalmente a esterilização da formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab.
6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender a purificação do palivizumab ou do fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab a partir de meio condicionado antes de se concentrar o palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio palivizumab e se submeter a diafiltração o

palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab concentrado no tampão da formulação.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser preparada como uma dosagem unitária contendo 1 mL.
8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1a ou 2 a 6, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab compreender pelo menos 85 mg/mL, pelo menos 90 mg/mL, pelo menos 95 mg/mL ou pelo menos 100 mg/mL de palivizumab ou de fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab.
9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1a ou 2 a 6, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab compreender 95 mg/mL ou 100 mg/mL de palivizumab ou de fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab.
10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 - 6, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab compreender 103 ± 3 mg/mL de palivizumab ou de fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab.
11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser substancialmente livre de surfactantes e sais inorgânicos.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser substancialmente livre de outros excipientes.
13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab não compreender manitol.
14. Processo de acordo com a reivindicação 1b, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de Palivizumab ser estável a 2° C a 8° C durante 15 meses tal como avaliado através de HPSEC.
15. Processo de acordo com a reivindicação 1(b), caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser estável a 38-42°C durante 60 dias tal como avaliado através de HPSEC.
16. Processo de acordo com as reivindicações 1a ou 2 - 14, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de Palivizumab ser estável a 2° C a 8° C durante pelo menos 3 anos tal como avaliado através de HPSEC.
17. Processo de acordo com a reivindicação 1a, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser estável a 38° C a 42° C durante não mais de 120 dias tal como avaliado através de HPSEC.

- 18.** Processo de acordo com as reivindicações 1a, 2 - 13, 16 ou 17, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab ser estável a 20° C a 24° C durante pelo menos 1 ano tal como avaliado através de HPSEC.
- 19.** Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab conter não mais de 3% de agregação em peso de proteína tal como medido através de HPSEC.
- 20.** Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a formulação aquosa estável de elevada concentração de palivizumab conter 98% ou mais de proteína total num pico simples tal como determinado através de HSPEC e não conter outros picos simples contendo cada um mais de 2% de proteína total.
- 21.** Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores caracterizado por não envolver um passo de secagem.

Lisboa, 11 de Junho de 2015

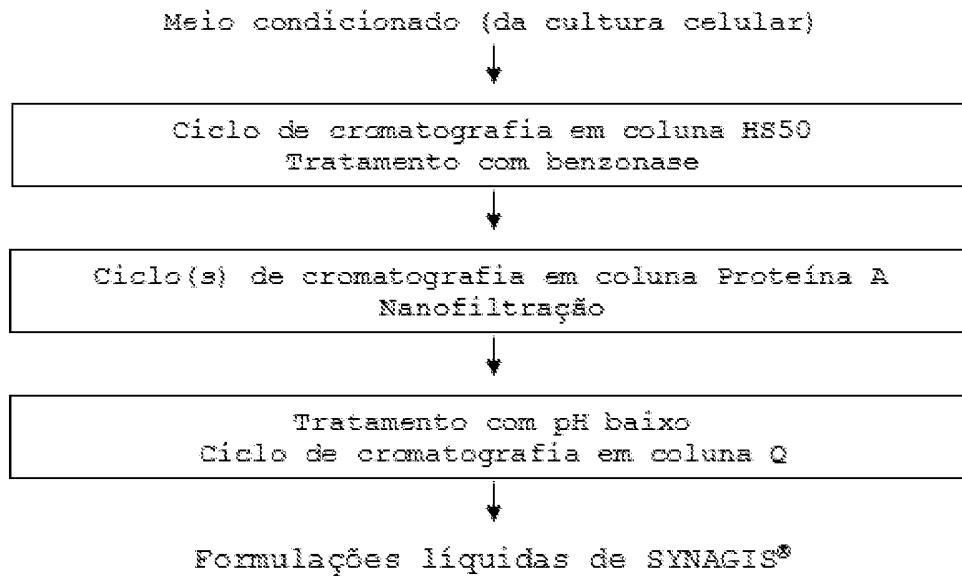


Figura 1

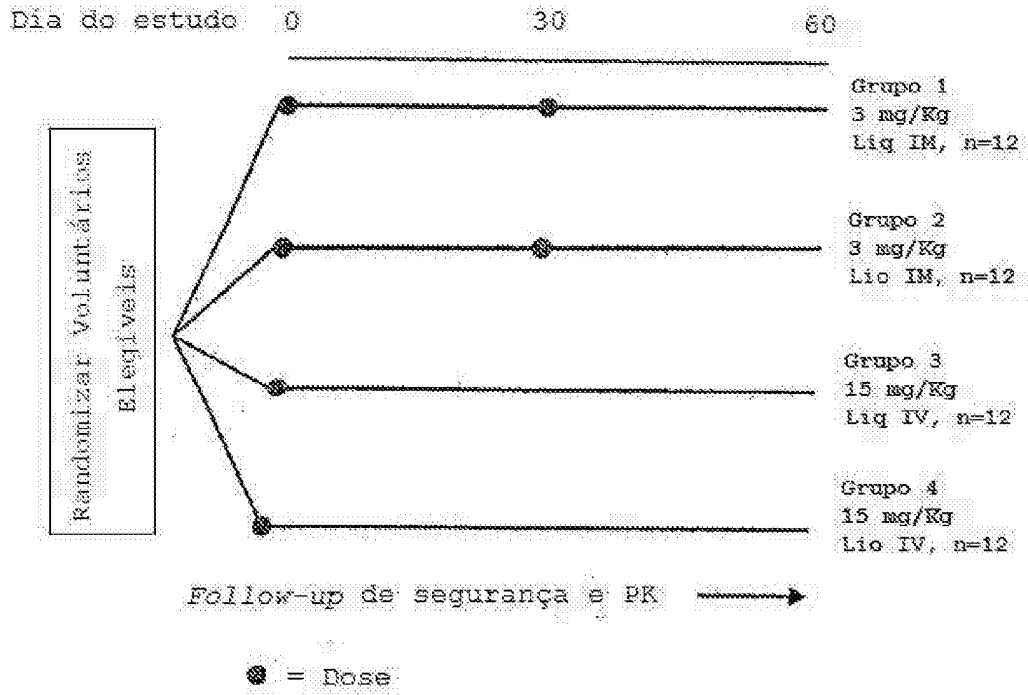


Figura 2