

(11) Número de Publicação: **PT 1531862 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/385 (2007.10) **A61K 39/42** (2007.10)
C07K 16/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

| | |
|--|---|
| (22) Data de pedido: 2003.06.16 | (73) Titular(es): |
| (30) Prioridade(s): 2002.06.14 US 388921 P | MEDIMMUNE, LLC ONE MEDIMMUNE WAY GAITHERSBURG, MD |
| (43) Data de publicação do pedido: 2005.05.25 | 20878 US |
| (45) Data e BPI da concessão: 2010.08.04 215/2010 | (72) Inventor(es): CYNTHIA N. OLIVER US ERICA SHANE US BENJAMIN S. ISSAACS US CHRISTIAN B. ALLAN US STEPHEN CHANG US |
| | (74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VICTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT |

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

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE SYNAGIS® OU UM SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO ANTIGÉNIO QUE SE LIGA IMUNOESPECIFICAMENTE A UM ANTIGÉNIO DO VÍRUS SINICIAL RESPIRATÓRIO (RSV), FORMULAÇÕES QUE EXIBEM ESTABILIDADE, NÍVEIS BAIXOS OU NÃO DETECTÁVEIS DE FRAGMENTAÇÃO DE ANTICORPO, NÍVEIS BAIXOS OU NÃO DETECTÁVEIS DE AGREGAÇÃO, E POUCA OU NENHUMA PERDA DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE SYNAGIS® OU UM SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, MESMO DURANTE OU APÓS LONGOS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO. EM PARTICULAR, A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE SYNAGIS® OU UM SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO, FORMULAÇÕES QUE SÃO SUBSTANCIALMENTE LIVRES DE AGENTE TENSIOACTIVO E/OU SAIS INORGÂNICOS, E/OU OUTROS EXCIPIENTES COMUNS. ALEM DISSO, A INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODO DE PREVENÇÃO, TRATAMENTO OU MELHORIA DOS SINTOMAS ASSOCIADOS COM A INFECÇÃO POR RSV UTILIZANDO FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DA PRESENTE INVENÇÃO.

RESUMO**"FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV"**

A presente invenção proporciona formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação antigénio que se liga imunoespecificamente a um antigénio do vírus sincicial respiratório (RSV), formulações que exibem estabilidade, níveis baixos ou não detectáveis de fragmentação de anticorpo, níveis baixos ou não detectáveis de agregação, e pouca ou nenhuma perda de actividades biológicas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, mesmo durante ou após longos períodos de armazenamento. Em particular, a presente invenção proporciona formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, formulações que são substancialmente livres de agente tensioactivo e/ou sais inorgânicos, e/ou outros excipientes comuns. Além disso, a invenção proporciona método de prevenção, tratamento ou melhoria dos sintomas associados com a infecção por RSV utilizando formulações líquidas da presente invenção.

DESCRIÇÃO**"FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV"****1. INTRODUÇÃO**

A presente invenção refere-se a formulações líquidas de palivizumab ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, formulações que exibem estabilidade, níveis baixos ou não detectáveis de fragmentação de anticorpo, níveis baixos ou não detectáveis de agregação, e pouca ou nenhuma perda actividade biológica (e.g., eficácia terapêutica) palivizumab ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, mesmo durante ou após longos períodos de armazenamento. Em particular, a presente invenção refere-se a formulações líquidas de palivizumab ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, formulações que são substancialmente isentas de agente tensioactivo e/ou sais inorgânicos. A presente invenção também se refere a métodos de prevenção, tratamento ou melhoria dos sintomas associados com uma infecção por vírus sincicial respiratório (RSV) utilizando formulações líquidas de palivizumab ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa

principal de doenças graves do tracto respiratório inferior em bebés e crianças (Feigen et al., eds., 1987, In: *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, WB Saunders, Filadélfia 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 infecção por RSV é evidente em todo o mundo, mas a incidência e gravidade da doença por RSV numa determinada estação varia consoante a região (Hall, C.B., 1993, *Contemp. Pediatr.* 10:92-110). Em regiões temperadas do hemisfério norte, inicia-se normalmente no fim do Outono e termina no final da Primavera (Hall, C.B., 1995, In: Mandell G.L., Bernnett J.E., Dolin R., eds., 1995, *Principles and Practice of Infections Diseases*. 4^a ed., Churchill Livingstone, Nova Iorque nas páginas 1501-1519). Estima-se que a doença por RSV resulta em 90 000 hospitalizações e causa 4 500 mortes anualmente nos Estados Unidos. A primária infecção por RSV ocorre mais frequentemente em crianças desde as 6 semanas aos 2 anos de idade e anormalmente nas primeiras 4 semanas de vida durante epidemias nosocomiais (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396). Estima-se que o RSV cause cerca de 75% de todas as bronquiolites infantis e até 40% de todas as pneumonias pediátricas (Cunningham, C.K. et al., 1991, *Pediatrics* 88:527-532). As crianças com risco aumentado de infecção por RSV incluem os bebés pré-termo (Hall et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:393-396) e crianças com displasia bronquiopulmonar (Groothuis et al., 1988,

Pediatrics 82:199-203), doença congénita do coração (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 fatalidades em bebés com doença do coração ou pulmões que são hospitalizados com infecção por RSV é 3%-4% (Navas et al., 1992, *J. Pediatr.* 121:348-354).

O RSV infecta adultos assim como bebés e crianças. Em adultos saudáveis, o RSV causa predominantemente doença do tracto respiratório superior. Foi recentemente evidente que alguns adultos, especialmente os mais idosos, possuíam infecção por RSVs sintomática mais frequentemente do que tinha sido anteriormente reportado (Evans, A.S., eds., 1989, *Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control*, 3^a ed., Plenum Medical Book, Nova Iorque nas páginas 525-544). Foram também reportadas várias epidemias entre doentes em ambulatório e adultos jovens 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 doença grave em pessoas imunossuprimidas particularmente em doentes de transplante de medula óssea (Hertz et al., 1989, *Medicine* 68:269-281).

As opções de tratamento para a doença por RSV estabelecida são limitadas. A doença por RSV grave do

tracto respiratório inferior requer frequentemente consideráveis cuidados de suporte, incluindo a administração de oxigénio humidificado e auxiliares respiratórios (Fields et al., eds, 1990, Fields Virology, 2^a ed., Vol. 1, Raven Press, Nova Iorque nas páginas 1045-1072). O único fármaco aprovado para o tratamento de infecção é o agente antiviral ribavirina (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 1993, *Pediatrics* 92:501-504). Foi demonstrado ser eficaz no tratamento de pneumonia e bronquiolite por RSV, modificando o decurso de doença grave em crianças imunocompetentes (Smith et al., 1991, *New Engl. J. Med.* 325:24-29). Contudo, a ribavirina possui várias limitações incluindo custo elevado, necessidade de administração prolongada de aerossol e risco potencial em mulheres grávidas assim como em pessoal de cuidados de saúde exposto. A American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases reviu a sua recomendação para a utilização de ribavirina. A recomendação actual é que a decisão da utilização de ribavirina deve ser baseada nas circunstâncias clínicas particulares e experiência do médico (American Academy of Pediatrics. Summaries of Infectious Diseases. In: 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, pp. 483-487).

Enquanto uma vacina pode prevenir a infecção por RSV, não existe ainda vacina licenciada para esta indicação. Um obstáculo principal para o desenvolvimento de uma

vacina é a segurança. Uma vacina inactivada com formalina, embora imunogénica, causou inesperadamente uma incidência mais elevada e mais grave na doença do tracto respiratório inferior devida a RSV em bebés imunizados do que em bebés imunizados com uma vacina trivalente de parainfluenza preparada de modo semelhante (Kim et al., 1969, *Am. J. Epidemiol.* 89:422-434; e Kapikian et al., 1969, *Am. J. Epidemiol.* 89:405-421). Foram abandonadas várias candidatas a vacinas contra RSV e outras estão em desenvolvimento (Murphy et al., 1994, *Virus Res.* 32:13-36), mas mesmo se forem resolvidas as questões da segurança, a eficácia da vacina também tem que ser melhorada. Vários problemas permanecem por resolver. A imunização seria necessária no período imediato neo-natal uma vez que o pico de incidência da doença do tracto respiratório inferior ocorre aos 2-5 meses de idade. É expectável que a imaturidade da resposta imunitária neo-natal juntamente com títulos elevados de anticorpo de RSV adquirido por via materna reduza a imunogenicidade da vacina no período neo-natal (Murphy et al., 1988, *J. Virol.* 62:3907-3910; e Murphy et al., 1991, *Vaccine* 9:185-189). Finalmente, a infecção primária por RSV e a doença não protegem bem contra a subsequente doença de RSV (Henderson et al., 1979, *New Engl. J. Med.* 300:530-534).

Presentemente, a única abordagem aprovada para a profilaxia da doença por RSV é a imunização passiva. A evidência inicial que sugere um papel protector para a IgG foi obtida a partir de observações que envolvem anticorpo

materno 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) reconheceram a possível utilidade do anticorpo de RSV no tratamento ou prevenção de infecção por RSV durante estudos que envolvem a farmacocinética de uma globina imunitária intravenosa (IVIG) em recém-nascidos suspeitos de possuir sepsia neonatal. Eles observaram que um bebé, cujas secreções respiratórias produziram RSV, recuperou rapidamente após infusão de IVIG. A análise subsequente do lote de IVIG revelou um título invulgamente elevado de anticorpo neutralizador de RSV. Este mesmo grupo de investigadores examinou então a capacidade do soro hiperimune ou globulina imune, enriquecida em anticorpo neutralizador de RSV, para proteger ratos do algodão e primatas contra 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 sugerem que o anticorpo neutralizador de RSV administrado profilacticamente inibiu a replicação no tracto respiratório de RSV em ratos do algodão. Quando administrado terapeuticamente, o anticorpo de RSV reduziu a replicação viral pulmonar tanto em ratos do algodão como num modelo de primata não humano. Para além disso, a infusão passiva do soro imune ou globulina imune

não produziu um aumento de patologia pulmonar em ratos do algodão subsequentemente confrontados com RSV.

Um anticorpo humanizado dirigido para um epitopo no sítio antigénico A da proteína F de RSV, SYNAGIS®, que compreende regiões que determinam a complementaridade da cadeia variável (VH) (CDRs) possuindo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:1-3 e CDR leve variável (VL) possuindo as sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:4-6, está aprovada para administração intramuscular a doentes pediátricos para a prevenção de doença grave do tracto respiratório inferior provocada por RSV a doses mensais recomendadas de 15 mg/kg de peso corporal ao longo da época de RSV (de Novembro até Abril no hemisfério norte). SYNAGIS® é um compósito de sequências de anticorpo de humano (95%) e de murino (5%). Ver, Johnson et al., 1997, *J. Infect. Diseases* 176:1215-1224 e Patente U.S. Nº. 5 824 307. A sequência da cadeia pesada humana foi derivada dos domínios constantes de IgG1 humana e as regiões de grelha 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 da cadeia leve humana foi derivada do domínio constante de C6 e as regiões de grelha variáveis do gene VL K104 com J6-4 (Bentley et al., 1980, *Nature* 288:5194-5198). As sequências de murino foram derivadas de um anticorpo monoclonal de murino, Mab 1129 (Beeler et al., 1989, *J. Virology* 63:2941-2950), num processo que envolveu a enxertia das regiões que determinam a complementaridade de murino nas grelhas de anticorpo

humano.

SYNAGIS® possui actividade específica elevada contra RSV *in vitro* (aproximadamente 50-100 vezes a de RespiGam®) e é conhecido por neutralizar uma vasta gama de isolados de RSV. Uma vez que não é derivado de plasma humano, o tratamento profiláctico com SYNAGIS® não comporta um risco potencial de transmissão de patogénios com origem no sangue.

SYNAGIS® foi inicialmente formulado como um líquido para utilização IV, numa concentração de 10 mg/ml SYNAGIS® em solução salina tamponada com fosfato. Uma formulação liofilizada de SYNAGIS®, que permite uma concentração mais elevada (100 mg/ml após reconstituição, em histidina a 50 mM e tampão glicina a 3,2 mM com 6% (p/v) de manitol a pH 6,0) do anticorpo do que esta formulação líquida inicial, foi produzida mais tarde para permitir a utilização intramuscular. A formulação liofilizada de SYNAGIS® é preparada liofilizando 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 pH 6,0. A formulação líquida inicial em PBS e a formulação liofilizada de SYNAGIS® foram testadas em ensaios clínicos de fase I em adultos saudáveis. A formulação liofilizada foi testada em ensaios clínicos de fase I até à fase IV em doentes pediátricos. SYNAGIS®, em doses de 15 mg/kg até 30 mg/kg para adultos demonstrou ser bem tolerada, e 15 mg/kg para crianças demonstrou ser segura e eficaz para a profilaxia de RSV. A

formulação liofilizada foi aprovada em 1998 pela FDA para utilização na prevenção de doença grave do tracto respiratório inferior provocada por RSV em crianças em risco elevado de doença por RSV.

Contudo, a formulação liofilizada possui várias limitações, incluindo um processo prolongado para liofilização e resultando num custo de fabrico elevado. Adicionalmente, a formulação liofilizada tem que ser reconstituída assepticamente e com precisão pelos técnicos de cuidados de saúde antes da administração aos doentes. O próprio passo de reconstituição requer certos processos específicos: (1) é adicionado um diluente estéril (*i.e.*, água ou dextrose a 5% em água para administração intravenosa e água para administração intramuscular) ao frasco que contém SYNAGIS® liofilizado, lentamente e assepticamente, e o frasco deve ser agitado muito cuidadosamente durante 30 segundos para evitar a formação de espuma; (2) o SYNAGIS® reconstituído precisa de repousar à temperatura ambiente durante um mínimo de 20 minutos até a solução clarificar; e (3) a preparação reconstituída deve ser administrada num espaço de (6) horas após a reconstituição. Esse processo de reconstituição é trabalhoso e a limitação de tempo após a reconstituição pode provocar uma grande inconveniência na administração da formulação para os doentes, conduzindo a um gasto significativo, se não for reconstituído adequadamente ou se a dose reconstituída não for utilizada num prazo de seis (6) horas e deve ser eliminada.

Por isso, existe uma necessidade para uma formulação líquida de SYNAGIS® a uma concentração comparável a, ou superior à formulação reconstituída liofilizada de modo a que não haja necessidade para reconstituir a formulação antes da administração. Isto permite que os técnicos dos cuidados de saúde administrem muito mais rapidamente e facilmente SYNAGIS® a um doente. Wang publicou uma revisão exaustiva acerca da estabilização de produtos farmacêuticos de proteína líquida (*Int J Pharm* (1999), 185:129-88).

As preparações de anticorpo líquidas anteriores possuem vidas curtas de prateleira e podem perder actividade biológica dos anticorpos que resulta das instabilidades químicas e físicas durante o armazenamento. A instabilidade química pode ser provocada por desamidação, racemização, hidrólise, oxidação, eliminação beta ou permuta de persulfureto, e a instabilidade física pode ser provocada por desnaturação do anticorpo, agregação, precipitação ou adsorção. Entre estes, a agregação, desamidação e oxidação são conhecidas por serem as causas mais comuns da degradação do anticorpo (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). Por isso, existe uma necessidade para uma formulação líquida estável de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio eficaz para prevenir infecção por RSV.

3. SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada, em parte, no desenvolvimento de formulações líquidas estáveis com concentração elevada de palivizumab (SYNAGIS®) ou um seu fragmento de ligação ao抗原, de acordo com a reivindicação 1. As formulações líquidas da presente invenção facilitam a administração de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 para a prevenção, tratamento, gestão e/ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Em particular, as formulações líquidas da presente invenção permitem que um profissional de cuidados de saúde administre rapidamente uma dose estéril de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 sem ter que reconstituir com precisão e assepticamente o anticorpo ou fragmento de anticorpo antes da administração como necessário para a forma de dosagem liofilizada. Essas formulações líquidas de SYNAGIS® podem ser também fabricadas mais facilmente e com melhor custo-benefício do que a formulação liofilizada uma vez que as formulações líquidas não necessitam de um passo de secagem prolongado, tal como liofilização, secagem a frio, etc. As formulações líquidas são produzidas através de um processo no qual o anticorpo a ser formulado está numa fase aquosa ao longo de todo o processo de purificação e formulação. Preferencialmente, as formulações líquidas são produzidas através de um processo que não inclui um passo de secagem, por exemplo, mas de forma alguma não limitando, um passo de liofilização, secagem sob congelamento, aspersão a seco, ou secagem ao ar.

A presente invenção proporciona formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, substancialmente isenta de agente tensioactivo, sais inorgânicos, açúcares, e/ou outros excipientes comuns, referidas formulações que compreende histidina e uma concentração de cerca de 65 mg/mL ou superior de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. Opcionalmente, a formulação pode ainda compreender glicina. Alternativamente, a formulação da presente invenção pode ainda compreender outros excipientes comuns, tais como sacarídeos, polióis e aminoácidos, incluindo, mas não limitados a, arginina, lisina, e metionina. A presente invenção também proporciona formulações líquidas substancialmente isentas de agente tensioactivo, sais inorgânicos, açúcares, e/ou outros excipientes comuns conhecidos, possuindo a referida formulação um pH que varia desde cerca de 5,0 até cerca de 7,0, preferencialmente cerca de 5,5 até 6,5, mais preferencialmente cerca de 5,8 até cerca de 6,2, e mais preferencialmente cerca de 6,0, e que compreende histidina e uma concentração de cerca de 15 mg/mL ou superior de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

A presente invenção compreende formulações líquidas estáveis de SYNAGIS® que apresentam níveis baixos a indetectáveis de agregação e/ou fragmentação de anticorpo com muito pouca a nenhuma perda de actividade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio durante o fabrico, preparação, transporte e longos

periódos de armazenamento. A presente invenção também comprehende formulações líquidas estáveis de formas modificadas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que aumentaram as semi-vidas *in vivo* em relação a SYNAGIS® não modificado ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, apresentando as referidas formulações níveis baixos a indetectáveis de agregação e/ou fragmentação de anticorpo, e muito pouca a nenhuma perda de actividade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

A presente invenção comprehende formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, possuindo as referidas formulações estabilidade a 38 ° - 42 °C como avaliado por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC). As formulações líquidas da presente invenção apresentam estabilidade, como avaliado por HSPEC, nos intervalos de temperatura de 38 °C-42 °C durante pelo menos 60 dias (em formas de realização específicas, não mais do que 120 dias), de 20 °C-24 °C durante pelo menos 1 ano, e de 2 °C-8 °C durante pelo menos 3 anos. A presente invenção também comprehende formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, possuindo as referidas formulações agregação baixa a indetectável, como medido por HPSEC. Numa forma de realização preferida, as formulações líquidas da presente invenção exibem estabilidade a 38 °-42 °C durante pelo menos 60 dias e apresentam níveis baixos a indetectáveis de agregação ao anticorpo como medido por HPSEC, e posteriormente, apresentam muito baixa a nenhuma perda de activi-

dade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio comparado com os anticorpos de referência como medido pelos ensaios de ligação ao anti-corpo, tais como, e.g., ELISAs.

A presente invenção proporciona métodos para preparar formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio. As formulações líquidas da presente invenção são preparadas mantendo SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio numa solução aquosa em qualquer momento durante a preparação. Por outras palavras, as formulações líquidas são preparadas sem envolver qualquer passo de secagem de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio ou as próprias formulações através de, por exemplo, liofilização, secagem sob vácuo, etc.

A presente invenção proporciona métodos para preparar formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio, compreendendo os referidos métodos a concentração de uma fracção de SYNAGIS® purificado ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio para uma concentração final de 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 semi-permeável com um limiar de retenção de peso molecular apropriado (mw) (e.g., limiar de retenção de 30 kD para SYNAGIS® e seus fragmentos F(ab')₂; e limiar de retenção de 10 kD para fragmentos de

SYNAGIS® tais como fragmentos Fab), e diafiltragem da fracção de anticorpo concentrada no tampão de formulação utilizando a mesma membrana. O tampão de formulação da presente invenção comprehende histidina a uma concentração que varia desde 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 muito preferencialmente cerca de 25 mM. Para obter um pH apropriado para SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, é preferido que a histidina (e a glicina, se for adicionada) seja primeiro dissolvida em água para obter uma solução tampão com pH mais elevado do que o pH desejado e depois o pH é baixado para um nível desejado através da adição de HCl. Deste modo, a formação de sais inorgânicos (e.g., a formação de NaCl quando, e.g., é utilizado cloridrato de histidina como uma fonte de histidina e o pH é aumentado até um nível desejado, através da adição de NaOH) pode ser evitada.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser esterilizadas pela filtração estéril utilizando um filtro de 0,2 µ ou de 0,22 µ. As formulações líquidas esterilizadas da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo para prevenir, tratar ou melhorar um ou mais sintomas associados com a infecção por RSV ou um seu sintoma.

A presente invenção também proporciona kits que comprehendem as formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu

fragmento de ligação ao antigénio para utilização através de, e.g. um profissional de cuidados de saúde. A presente invenção proporciona ainda métodos de prevenção, gestão do tratamento ou melhoria da infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas através da administração das formulações líquidas da presente invenção.

3.1 Terminologia

Como aqui utilizado, todas as formulações líquidas de SYNAGIS® e/ou seus fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um antigénio de RSV acima descrito são referidas colectivamente como "formulações líquidas da invenção", "formulações líquidas de SYNAGIS® da invenção", ou "formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio."

Como aqui utilizado, o termo "modulador do receptor de citoquina" refere-se a um agente que modula a fosforilação de um receptor de citoquina, a activação de uma via de transdução de sinal associada com um receptor de citoquina, e/ou a expressão de uma proteína particular, tal como uma citoquina. Um agente destes modula directamente ou indirectamente a fosforilação de um receptor de citoquina, a activação de uma via de transdução de sinal associada com um receptor de citoquina, e/ou a expressão de uma proteína particular, tal como uma citoquina. Assim, os exemplos dos moduladores do receptor de citoquina incluem, mas não estão limitados a, citoquinas, fragmentos de citoquinas, proteí-

nas de fusão e anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um receptor de citoquina ou um seu fragmento. Além disso, exemplos de moduladores do receptor de citoquina incluem, mas não estão limitados a, péptidos, polipéptidos (e.g., receptores de citoquina solúvel), proteínas de fusão e anticorpos que se ligam imunoespecificamente a uma citoquina ou um seu fragmento.

Como aqui utilizados, os termos "fragmento de SYNAGIS®", "fragmento de ligação ao抗原" e termo afins utilizados no contexto de SYNAGIS® referem-se a um fragmento de SYNAGIS® que se liga imunoespecificamente a um抗原 de RSV. Podem ser criados fragmentos de SYNAGIS® através de qualquer técnica conhecida dos especialistas na técnica. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como 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 da dobra da cadeia pesada. Preferencialmente, o fragmento também se liga a um抗原 de RSV, mais preferencialmente ao mesmo epitopo que SYNAGIS®.

Como aqui utilizado, o termo "quantidade eficaz" refere-se à quantidade de uma terapia (e.g., um agente profiláctico ou terapêutico), que é suficiente para reduzir a gravidade, e/ou duração de uma infecção por RSV, melhoria de um ou mais dos seus sintomas, prevenir o avanço de uma

infecção por RSV, ou provocar a regressão de uma infecção por RSV, ou que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência, início, ou progressão de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas, ou aumentar ou melhorar os efeitos profilácticos e/ou terapêutico(s) de outra terapia (e.g., outro agente terapêutico). Numa forma de realização específica, uma quantidade eficaz de um agente terapêutico ou profiláctico reduz um ou mais dos seguintes passos de um ciclo de vida de RSV: o alojamento da particular de vírus a uma célula, a introdução de informação genética viral numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas de vírus e a libertação de partículas de vírus de uma célula em pelo menos 5%, preferencialmente 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 profiláctico reduz a replicação, multiplicação ou disseminação de um vírus em pelo menos 5%, preferencialmente 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%.

Como aqui utilizado, o termo "epitopo" refere-se a uma porção de um polipéptido ou proteína de RSV possuindo actividade antigénica ou imunogénica num animal, preferencialmente um mamífero, e muito preferencialmente num humano. Um epitopo que possui actividade imunogénica é uma porção de um polipéptido ou proteína de RSV que origina uma resposta de anticorpo num animal. Um epitopo que possui actividade antigénica é uma porção de um polipéptido ou proteína de RSV ao qual um anticorpo se liga imunoespecificamente como determinado através de qualquer método bem conhecido na técnica, por exemplo, através dos imunoensaios aqui descritos. Os epitopos antigénicos não precisam de ser necessariamente imunogénicos. Especificamente, o epitopo de SYNAGIS® é o sítio antigénico A da proteína F de RSV.

Como aqui utilizado, o termo "excipientes" refere-se a substâncias inertes que são normalmente utilizadas como um diluente, veículo, conservantes, ligantes, ou agente estabilizador para fármacos e inclui, mas não está limitado a, proteínas (e.g., albumina do soro, etc.), aminoácidos (e.g., ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos gordos e fosfolípidos (e.g., sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), agentes tensioactivos (e.g., SDS, polisorbato, agente tensioactivo não iónico, etc.), sacarídeos (e.g., sacarose, maltose, trealose, etc.) e polióis (e.g., manitol, sorbitol, etc.). Ver também Remington's Pharmaceutical Sciences (by Joseph P. Remington, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA). Preferencialmente, os excipientes induzem

uma propriedade física benéfica na formulação, tal como aumento da estabilidade da proteína, aumento da solubilidade da proteína e diminuição da viscosidade.

O termo "fragmento", como aqui utilizado, refere-se a um péptido, polipéptido, ou proteína (incluindo um anticorpo) que compreende uma sequência de aminoácidos 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 amino 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. Numa outra forma de realização, um fragmento de uma proteína ou polipéptido retém pelo menos duas, três ou quatro funções da proteína ou polipéptido. Preferencialmente, um fragmento de um anticorpo que se liga imuno-

especificamente a um antigénio de RSV retém a capacidade de se ligar a um antigénio de RSV.

Como aqui utilizado, o termo "proteína de fusão" refere-se a um polipéptido ou proteína que compreende uma sequência de aminoácidos de uma primeira proteína, polipéptido ou fragmento, seu análogo ou derivado, e uma sequência de aminoácidos de uma proteína heteróloga ou polipéptido (*i.e.*, uma segunda proteína, polipéptido ou seu fragmento, análogo ou derivado diferente da primeira proteína ou seu fragmento funcional, análogo ou derivado). Numa forma de realização, uma proteína de fusão compreende um agente profiláctico ou terapêutico fundido com uma proteína heteróloga, polipéptido ou péptido. De acordo com esta forma de realização, a proteína heteróloga, polipeptido ou péptido pode ser ou não um tipo diferente de agente profiláctico ou terapêutico.

Como aqui utilizado, o termo "bebé humano" refere-se a um humano com menos de 24 meses, preferencialmente 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.

Como aqui utilizado, o termo "bebé humano nascido prematuramente" refere-se a um humano nascido ao fim de menos de 40 semanas de tempo de gestação, preferencialmente menos de 35 semanas de idade de gestação, que é inferior a 6 meses de idade, preferencialmente inferior a 3 meses de

idade, mais preferencialmente inferior a 2 meses de idade, e muito preferencialmente inferior a 1 mês de idade.

Como aqui utilizado, o termo "concentração elevada" refere-se a uma concentração de 50 mg/mL ou superior, preferencialmente 95 mg/mL ou superior de um anticorpo ou seu fragmento que se liga imunoespecificamente a um抗igénio de RSV, numa formulação de anticorpo.

Como aqui utilizado, o termo "célula hospedeira" inclui uma célula individual transfetada ou transformada com uma molécula de ácido nucleico e a descendência ou potencial descendência dessa célula. A descendência dessa célula pode não ser idêntica à célula parental transfetada com a molécula de ácido nucleico devido a mutações ou a influências ambientais que podem ocorrer em gerações sucessivas ou integração da molécula de ácido nucleico no genoma da célula hospedeira.

Como aqui utilizado, o termo "liga-se imuno-especificamente ao抗igénio de RSV" e termos análogos referem-se a anticorpos ou seus fragmentos que se ligam especificamente a um抗igénio de RSV deste e não se ligam especificamente a outros polipeptídos. Os anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um抗igénio de RSV podem apresentar reacção cruzada com抗igénios relacionados. Preferencialmente, os anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um抗igénio de RSV não apresentam reacção cruzada com outros抗igénios. Os

anticorpos ou fragmentos que se ligam imunoespecificamente a um抗原 de RSV podem ser identificados, por exemplo, através de imunoensaios, BIACore, calorímetro de titulação isotérmica, ou outras técnicas conhecidas dos especialistas na técnica. Um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao抗原 liga-se especificamente a um抗原 de RSV quando se liga com afinidade superior do que a qualquer抗原 de reacção cruzada como determinado utilizando técnicas experimentais, tais como radioimunoensaios (RIA) e ensaios de imunoabsorção ligados a enzima (ELISAs). Ver, e.g., Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, Nova Iorque nas páginas 332-336 para uma discussão em relação à especificidade do anticorpo

O termo "em combinação" como aqui utilizado refere-se à utilização de mais do que uma terapia (e.g., agentes profilácticos e/ou terapêuticos). A utilização do termo "em combinação" não restringe a ordem na qual as terapias (e.g., agentes profilácticos e/ou terapêuticos) são administrados a um indivíduo com uma infecção por RSV. Uma primeira terapia (e.g., a agente profiláctico ou terapêutico) pode ser administrada antes de (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), concomitantemente com, ou subsequente 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 mais tarde) a administração de uma segunda terapia (e.g., um agente profiláctico ou terapêutico) a um indivíduo com uma infecção por RSV.

Como aqui utilizado, o termo "sal inorgânico" refere-se a quaisquer compostos, não contendo carbono, que resulta da substituição de parte ou da totalidade do hidrogénio ácido ou de um ácido por um metal ou um grupo que actua como um metal e são frequentemente utilizados como um composto de ajuste de tonicidade em composições farmacêuticas e preparações de materiais biológicos. Os sais inorgânicos mais comuns são NaCl, KCl, NaH₂PO₄, etc.

Um anticorpo "isolado" ou "purificado" é substancialmente isento de material celular ou outras proteínas contaminantes da célula ou da fonte de tecido a partir do qual derivou a proteína, ou substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizados quimicamente. A linguagem "substancialmente isento de material celular" inclui preparações de um anticorpo no qual o polipéptido/proteína é separado dos componentes celulares das células a partir da qual é isolado ou produzido de forma recombinante. Assim, um anticorpo que é substancialmente isento de material celular inclui preparações do anticorpo possuindo menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, ou 1%, (em peso seco) de proteína contaminante. Quando o anticorpo é produzido de forma

recombinante, está também preferencialmente substancialmente isento 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 preferencialmente substancialmente isento de precursores químicos ou outros produtos químicos, i.e., é separado de precursores químicos ou outros agentes químicos que estão envolvidos na síntese da proteína. Consequentemente, essas preparações do anticorpo têm menos do que cerca de 30%, 20%, 10%, 5% (em peso seco) dos precursores químicos ou compostos diferentes do anticorpo de interesse. Numa forma de realização preferida da presente invenção, os anticorpos são isolados ou purificados.

Como aqui utilizada, a frase "níveis baixos ou não detectáveis de agregação" refere-se a amostras não contendo mais do que 5%, não mais do que 4%, não mais do que 3%, não mais do que 2%, não mais do que 1%, e muito preferencialmente não mais do que 0,5%, a agregação em proteína em peso, como medido por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC).

Como aqui utilizado, o termo "níveis de fragmentação baixos a indetectáveis" refere-se a amostras contendo quantidades iguais a, ou superiores a cerca de 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, ou 99%, da proteína total, por exemplo, num único pico, como determinado por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC), ou em dois (2) picos (cadeias pesada e leve) através de Electro-

forese em Gel Capilar reduzida (rCGE), representando o SYNAGIS® não degradado ou um seu fragmento não degradado que se liga imunoespecificamente a um antigénio de RSV, e não contendo outros picos únicos possuindo mais do que 5%, mais do que 4%, mais do que 3%, mais do que 2%, mais do que 1%, ou mais do que 0,5% da proteína total cada um. O termo "Electroforese em Gel Capilar Reduzida (CGE)" como aqui utilizado refere-se a electroforese em gel capilar em condições de redução suficientes para reduzir pontes persulfureto em SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

Como aqui utilizados, os termos "gerir", "gerindo" e "gestão" referem-se aos efeitos benéficos que um indivíduo deriva de uma terapia (e.g., SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio), que não resulta numa cura de uma infecção por RSV. Em certas formas de realização, um indivíduo é administrado com uma ou mais terapias (e.g., agentes profilácticos ou terapêuticos) para "gerir" a infecção por RSV ou um seu sintoma de modo a prevenir a progressão ou agravamento da infecção.

Como aqui utilizado, o termo "modificado", no contexto das formas modificadas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio refere-se a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que foi alterado através de qualquer método conhecido na técnica para aumentar a sua semi-vida (ver, e.g., Secção 5.1.1., *infra*). SYNAGIS® e seus fragmentos de ligação ao antigénio, com

semi-vidas *in vivo* melhoradas e métodos para as preparar são revelados na Publicação Internacional Nº. WO 02/060919, submetida em 12 de Dezembro de 2001, intitulada "Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses" e por L. Johnson *et al.* O termo "modificado" no contexto de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 também se refere a SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao抗原 modificado por ligação covalente de qualquer tipo de molécula a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原. Por exemplo, mas não a título de limitação, SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 pode ser modificado, *e.g.*, por glicosilação, acetilação, peguição, fosforilação, amidação, derivação por grupos de protecção/bloqueamento conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc.

Como aqui utilizado, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa ser aprovado por uma agência reguladora do governo Federal ou Estadual ou listado na Farmacopeia dos E.U.A., Farmacopeia Europeia ou outra farmacopeia geralmente reconhecida para a utilização em animais, e mais particularmente em humanos.

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

Como aqui utilizados, os termos "previne", "prevenir", e "prevenção" referem-se à prevenção ou redução

da recorrência, início, desenvolvimento ou progressão de uma infecção por RSV, ou a prevenção ou redução da gravidade e/ou duração de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta.

Como aqui utilizados, os termos "agente profiláctico" e "agentes profilácticos" referem-se a qualquer agente(s) que podem ser utilizados na prevenção de uma infecção de RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Em certas formas de realização, o termo "agente profiláctico" refere-se a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio. De acordo com estas formas de realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser um componente de uma formulação líquida da invenção. Em certas outras formas de realização, o termo "agente profiláctico" não se refere a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio. Ainda noutras formas de realização, o termo "agente profiláctico" não se refere a anticorpos ou seus fragmentos diferentes de SYNAGIS® que se ligam imunoespecificamente a um抗ígenio de RSV. Preferencialmente, um agente profiláctico é um agente que é conhecido como sendo útil para, ou foi ou está a ser presentemente utilizado para prevenir ou impedir o início, desenvolvimento, progressão, e/ou gravidade de uma infecção por RSV ou um sintoma desta.

Como aqui utilizado, o termo "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se à quantidade de uma formulação líquida da invenção que é suficiente para resultar na prevenção do desenvolvimento, recorrência, início ou

progressão de uma infecção por RSV. Numa forma de realização específica, uma quantidade profilacticamente eficaz de um agente profiláctico reduz um ou mais dos seguintes passos de um ciclo de vida de RSV: a introdução da partícula de vírus numa célula, a introdução da informação genética viral numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas de vírus e a libertação de partículas virais de uma célula através de pelo menos 5%, preferencialmente 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 profilacticamente eficaz de um agente profiláctico reduz a replicação, multiplicação ou disseminação de um vírus em pelo menos 5%, preferencialmente 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%.

Como aqui utilizado, o termo "antigénio de RSV" refere-se a uma proteína de RSV, polipéptido ou péptido à qual um anticorpo se liga imunoespecificamente.

Como aqui utilizado, o termo "sacarídeo" refere-

se a uma classe de moléculas que são álcoois poli-hídricos. Os sacarídeos são normalmente referidos como carbo-hidratos e podem conter diferentes quantidades de unidades de açúcar (sacarídeo), e.g., monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos.

O termo "pequena molécula" e termos análogos incluem, mas não estão limitados a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compostos orgânicos ou inorgânicos (*i.e.*, incluindo compostos heterorgânicos e/ou ganometálicos) possuindo um peso molecular inferior a cerca de 10 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos possuindo um peso molecular inferior a cerca de 5 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos possuindo um peso molecular inferior a cerca de 1 000 gramas por mole, compostos orgânicos ou inorgânicos possuindo um peso molecular inferior a cerca de 500 gramas por mole, e seus sais, ésteres, e outras formas farmaceuticamente aceitáveis desses compostos.

Como aqui utilizados, os termos "estabilidade" e "estável" no contexto de uma formulação líquida que comprehende SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio refere-se à resistência de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio na formulação de desdobragem térmica e química, agregação, degradação ou fragmentação nas dadas condições de fabrico, preparação,

transportação e armazenamento. As formulações "estáveis" da invenção retêm actividade biológica igual a, ou superior a 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou 99,5% em dadas condições de fabrico, preparação, transporte e armazenamento. A estabilidade de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser avaliada por graus de agregação, degradação ou fragmentação através de métodos conhecidos dos especialistas na técnica, incluindo, mas não limitada a Electroforese em Gel em Capilar reduzida (rCGE), Electroforese em gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDSPAGE) e HPSEC, em comparação com uma referência, que é, um SYNAGIS® liofilizado disponível comercialmente, reconstituído por 100 mg/mL em histidina a 47 mM/tampão glicina a 3 mM com manitol a 5,6% a pH 6,0. A referência produz regularmente um pico único ($\geq 97\%$ de área) por HPSEC. A estabilidade global de uma formulação líquida que compreende SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga imunoespecificamente a um antígeno de RSV pode ser avaliada por ensaios imunológicos incluindo, por exemplo, ELISA e radioimunoensaio, utilizando o epitopo específico de RSV.

Como aqui utilizado, o termo "referência padrão SYNAGIS®" ou termos análogos referem-se a SYNAGIS® liofilizado comercialmente disponível, como descrito em Physicians' Desk Reference, 56^a 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 activo, o anticorpo, a uma concentração de 100 miligramas por mL de solução.

Os termos "indivíduo" e "doente" são aqui utilizados indistintamente. Como aqui utilizado, os termos "indivíduo" e "indivíduos" referem-se a um animal, preferencialmente um mamífero incluindo um não primata (e.g., uma vaca, porco, cavalo, gato, cão, rato, e murganho) e um primata (e.g., um chimpanzé, uma macaco tal como um macaco cinomólogo, e um humano), e mais preferencialmente um humano.

Como aqui utilizado, o termo "substancialmente isento de agente tensioactivo" refere-se a uma formulação de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio, contendo a referida formulação menos de 0,0005%, menos de 0,0003%, ou inferior a 0,0001% de agentes tensioactivos e/ou inferior a 0,0005%, inferior a 0,0003%, ou inferior a 0,0001% de agente tensioactivo.

Como aqui utilizado, o termo "substancialmente isento de sais inorgânicos" refere-se a uma formulação de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio, contendo a referida formulação menos do que 0,0005%, menos do que 0,0003%, ou menos do que 0,0001% de sais inorgânicos. Como aqui utilizado, o termo "agente tensioactivo" refere-se a substâncias orgânicas possuindo estruturas anfipáticas; nomeadamente, eles são compostos por grupos de tendências de solubilidade opostas, tipicamente uma cadeia de hidratos de carbono solúveis em óleo e um grupo iónico solúvel em água. Os tensioactivos podem ser classificados,

dependendo da carga da unidade activa na superfície, em agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, e não iónicos. Os tensioactivos podem ser frequentemente utilizados como agentes humidificadores, emulsificantes, solubilização, e de dispersão para várias composições farmacêuticas e preparações de materiais biológicos.

Como aqui utilizados, os termos "agente terapêutico" e "agentes terapêuticos" referem-se a quaisquer agente(s) que podem ser utilizados no tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Em certas formas de realização, o termo "agente terapêutico" refere-se a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio. De acordo com estas formas de realização, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser um componente de uma formulação líquida da invenção. Em certas outras formas de realização, o termo "agente terapêutico" não se refere a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio. Ainda noutras formas de realização, o termo "agente terapêutico" não se refere a anticorpos ou seus fragmentos, diferentes de SYNAGIS® que se ligam imunoespecificamente a um抗igénio de RSV. Preferencialmente, um agente terapêutico é um agente que é conhecido por ser útil para, ou foi ou está presentemente a ser utilizado para o tratamento, gestão ou melhoramento da infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas.

Como aqui utilizado, o termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se à quantidade de uma formulação

líquida da invenção que reduz ou melhora a progressão, gravidade, e/ou duração de uma infecção por RSV, e/ou melhora um ou mais sintomas associados com uma infecção por RSV. Em relação ao tratamento de uma infecção por RSV, uma quantidade terapeuticamente eficaz refere-se à quantidade de um agente terapêutico suficiente para reduzir ou inibir a replicação de um vírus, inibir ou reduzir a infecção da célula com o vírus, inibir ou reduzir a produção das partículas virais, inibir ou reduzir a libertação das partículas virais, inibir ou reduzir a disseminação do vírus para outros tecidos ou indivíduos, ou melhorar um ou mais sintomas associados com a infecção. Numa forma de realização específica, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico reduz um ou mais dos seguintes passos do ciclo de vida de um RSV: a introdução da partícula viral numa célula, a introdução de informação genética viral numa célula, a expressão de proteínas virais, a produção de novas partículas virais e a libertação de partículas virais de uma célula em pelo menos 5%, preferencialmente 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 terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico reduz a replicação, multiplicação ou disseminação de um vírus em pelo menos 5%, preferencialmente 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%.

Como aqui utilizados, os termos "terapias" e "terapia" podem referir-se a qualquer protocolo(s), método(s) e/ou agente(s) que podem ser utilizados na prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta. Em certas formas de realização, os termos "terapia" e "terapias" referem-se a terapia biológica, e/ou outras terapias úteis para o tratamento de uma infecção por RSV conhecidas do pessoal médico experiente.

Como aqui utilizados, os termos "tratar", "trata" e "tratamento" referem-se à redução ou melhoramento da progressão, gravidade, e/ou duração de uma infecção por RSV e/ou reduz ou melhora um ou mais sintomas de uma infecção por RSV. Em formas de realização específicas, esses termos referem-se à redução ou inibição da replicação de um vírus sincicial respiratório (RSV), a inibição ou redução na disseminação de um vírus sincicial respiratório (RSV) a outros tecidos ou indivíduos, a inibição ou redução da infecção de uma célula com um vírus sincicial respiratório (RSV), ou o melhoramento de um ou mais sintomas associados com a infecção por vírus sincicial respiratório (RSV).

Como aqui utilizado, um "protocolo" inclui calendários de dosagem e regimes de dosagem. Os protocolos aqui apresentados são métodos de utilização e incluem protocolos profilácticos e terapêuticos.

Como aqui utilizado, o termo "modulador do receptor de célula T" refere-se a um agente que modula a fosforilação de um receptor de célula T, a activação de uma via de transdução de sinal associada com um receptor de célula T e/ou a expressão de uma proteína particular tal como uma citoquina. Um tal agente pode modular directamente ou indirectamente a fosforilação de um receptor de célula T, a activação de uma via de transdução de sinal associada com um receptor de célula T, e/ou a expressão de uma proteína particular, tal como uma citoquina. Exemplos de moduladores de receptor de célula T incluem, mas não estão limitados a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusão e anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um receptor de células T ou um seu fragmento. Além disso, exemplos de moduladores de receptor de células T incluem, mas não estão limitados a, proteínas, péptidos, polipéptidos (e.g., receptores de células T solúveis), proteínas de fusão e anticorpos que se ligam imunoespecificamente a um ligando para um receptor de células T ou um seu fragmento.

Como aqui utilizado, o termo "muito pouca ou nenhuma perda de actividades biológicas" refere-se a actividades de anticorpo, incluindo capacidades de ligação específica de SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao

antigénio como medido por vários ensaios imunológicos, incluindo, mas não limitado a ELISAs e radioimunoensaios. Numa forma de realização, SYNAGIS® ou um fragmento de ligação ao antigénio das formulações líquidas da invenção retém aproximadamente 50%, preferencialmente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 98% da capacidade para se ligar imunoespecificamente a um antigénio de RSV em comparação com um anticorpo de referência ou fragmento de anticorpo como medido por um ensaio imunológico conhecido por um especialista na técnica ou aqui descrito. Por exemplo, um ensaio baseado em ELISA pode ser utilizado para comparar a capacidade de uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio para ligar imunoespecificamente a um antigénio de RSV a um padrão de referência SYNAGIS®. Neste ensaio, as placas são revestidas com um antigénio de RSV e o sinal de ligação de uma concentração estabelecida de um padrão de referência de SYNAGIS® é comparado com o sinal de ligação da mesma concentração de um anticorpo de teste ou fragmento de anticorpo.

4. BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Fig. 1 é um diagrama esquemático que apresenta o delinear para preparar SYNAGIS® purificado.

A Fig. 2 apresenta o fluxograma do estudo clínico para comparar a formulação líquida do SYNAGIS® com a formulação liofilizada de SYNAGIS®.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As formulações líquidas da presente invenção proporcionam uma preparação pronta-a-utilizar de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio para administrar a um indivíduo sem ter que reconstituir a preparação rigorosamente e em condições de assepsia e esperar durante um período de tempo até que a solução clarifique antes da administração da formulação ao indivíduo. Simplifica o processo de administração da formulação a um indivíduo para um técnico de cuidados de saúde profissional. Para além disso, devido à sua elevada estabilidade durante o armazenamento, as formulações da presente invenção podem conter SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio a concentrações no intervalo de cerca de 65 mg/mL até cerca de 300 mg/mL sem provocar um efeito adverso na(s) actividade(s) biológica(s) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio devido à agregação de proteína e/ou fragmentação durante um armazenamento prolongado. Essa estabilidade não apenas assegura a eficácia de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio mas também reduz os possíveis riscos de provocar efeitos adversos num indivíduo. Adicionalmente, o processo de fabrico das formulações líquidas da presente invenção é simplificado e mais eficiente do que o processo de fabrico para a versão liofilizada porque todos os estádios do fabrico das formulações líquidas são realizados numa solução aquosa, não envolvendo processo de secagem, tal como liofilização e secagem sob congelação. Consequentemente, tem também um melhor custo-benefício.

5.1 Formulações líquidas de SYNAGIS®

As formulações líquidas da presente invenção proporcionam formulações de anticorpo que são substancialmente isentas de agente tensioactivo, sais inorgânicos, e/ou outros excipientes e ainda assim apresentar estabilidade elevada durante longos períodos de armazenamento. Numa forma de realização específica, essas formulações de anticorpo são homogéneas. As formulações da presente invenção compreendem histidina a concentrações entre 1 e 100 mM e SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio a concentrações de cerca de 65 mg/mL até cerca de 300 mg/mL. Numa forma de realização, as formulações da invenção não compreendem outros ingredientes excepto para água ou solventes adequados. Noutra forma de realização específica, uma forma modificada de anticorpo SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio possuindo semi-vida melhorada e/ou afinidade é utilizada nas formulações líquidas da invenção.

A concentração de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio que está incluída nas formulações líquidas da invenção, é pelo menos de 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 está incluída nas formulações líquidas da invenção varia desde 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 muito preferencialmente cerca de 25 mM. A histidina pode estar na forma de L-histidina, D-histidina, ou uma mistura destas, mas a L-histidina é a mais preferida. A histidina também pode estar na forma de hidratos. A histidina pode ser utilizada numa forma de sal farmaceuticamente aceitável, tal como cloridrato (e.g., monocloridrato e dicloridrato), bromidrato, sulfato, acetato, etc. A pureza da histidina deve ser pelo menos 98%, preferencialmente pelo menos 99%, e muito preferencialmente pelo menos 99,5%.

O pH da formulação não deve ser igual ao ponto isoeléctrico do anticorpo particular a ser utilizado na formulação (e.g., o ponto isoeléctrico de SYNAGIS® varia desde 8,65 até 9,43) e pode variar desde cerca de 5,0 até cerca de 7, preferencialmente cerca de 5,5 até cerca de 6,5, mais preferencialmente cerca de 5,8 até cerca de 6,2, e muito preferencialmente cerca de 6,0.

Adicionalmente à histidina e SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, as formulações da

presente invenção podem ainda compreender 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 muito preferencialmente 1,6 mM. A quantidade de glicina na formulação não deve provocar um efeito de tampão significativo de modo a que a precipitação do anticorpo no seu ponto isoeléctrico pode ser evitada. A glicina podem ser também utilizada numa forma de um sal farmaceuticamente aceitável, tal como cloridrato, bromidrato, sulfato, acetato, etc. A pureza da glicina deve ser pelo menos 98%, preferencialmente pelo menos 99%, e muito preferencialmente 99,5%. Numa forma de realização específica, a glicina não está incluída nas formulações líquidas da presente invenção.

Opcionalmente, as formulações da presente invenção podem ainda 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 um sacarídeo. Numa forma de realização específica, o sacarídeo é sacarose, que é a uma concentração que varia entre cerca de 1% e cerca de 20%, preferencialmente cerca de 5% e cerca de 15%, mais preferencialmente cerca de 8% e 10%. Noutra forma de realização, o outro excipiente é um poliol. Preferencialmente, contudo, as formulações líquidas da presente invenção não contêm manitol. Numa forma de realização específica, o poliol é polisorbato (e.g., Tween 20), que está a uma concentração que varia entre cerca de 0,001% e cerca de 1%, preferencialmente, cerca de 0,01 até cerca de 0,1.

As formulações líquidas da presente invenção exibem estabilidade nos intervalos de temperatura de 38 °C-42 °C durante pelo menos 60 dias e, em algumas formas de realização, não mais do que 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, como avaliado por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC). Nomeadamente, as formulações líquidas da presente invenção possuem níveis baixos ou não detectáveis de agregação e/ou fragmentação, como aqui definido, após o armazenamento durante os períodos definidos como apresentados acima. Preferencialmente, não mais do que 5%, não mais do que 4%, não mais do que 3%, não mais do que 2%, não mais do que 1 %, e muito preferencialmente não mais do que 0,5%, de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio forma um agregado como medido por HPSEC, após o armazenamento durante os períodos definidos como apresentados acima. Para além disso, as formulações líquidas da presente invenção apresentam quase nenhuma perda na(s) actividade(s) biológicas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio durante o armazenamento prolongado nas condições descritas acima, como avaliado por vários ensaios imuno-lógicos incluindo, por exemplo, ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) e radioimunoensaio para medir a capacidade de ligação ao抗ígenio de RSV de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio, ou, por exemplo, por

um ensaio de C3a/C4a para medir a capacidade de activação do complemento de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. As formulações líquidas da presente invenção retêm, após o armazenamento durante os períodos acima definidos mais do que 80%, mais do que 85%, mais do que 90%, mais do que 95%, mais do que 98%, mais do que 99%, ou mais do que 99,5% da(s) actividade(s) biológicas iniciais antes do armazenamento.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser preparadas como formas de dosagem de unidade. Por exemplo, uma dosagem unitária por frasco 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 um seu fragmento de ligação ao antigénio que varia desde cerca de 15 mg/mL até cerca de 300 mg/mL de concentração de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga imunoespecificamente a um RSV. Se necessário, estas preparações podem ser ajustadas para uma concentração desejada adicionando um diluente estéril a cada frasco.

5.1.1 SYNAGIS®

A invenção refere-se a formulações líquidas que compreendem SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. Em formas de realização preferidas, a invenção proporciona formulações líquidas de SYNAGIS®, um anticorpo monoclonal humanizado que neutraliza uma intervalo largo de isolados de RSV. A sequência de aminoácidos de SYNAGIS® é

revelada, e.g., em Johnson et al., 1997, *J. Infectious Disease* 176:1215-1224, e Patente U.S. N°. 5 824 307, e suas VHCDRs e VLCDRs são apresentados na Tabela 1, *infra*.

Tabela 1. Sequências CDR de SYNAGIS®

| CDR | Sequência | SEQ ID NO |
|-----|--|-----------|
| VH1 | T<u>S</u>GMSVG | 1 |
| VH2 | DIW W <u>D<u>D</u>K</u> KDYNPSLKS | 2 |
| VH3 | SMT<u>TN</u>WYFDV | 3 |
| VL1 | KCQLS VGYMH | 4 |
| VL2 | DT <u>SKL</u> A S | 5 |
| VL3 | FQGS <u>G</u> YP <u>F</u> T | 6 |

Adicionalmente, a presente invenção também comprehende formulações líquidas estáveis de formas modificadas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que possuem semi-vidas melhoradas. Em particular, a presente invenção comprehende uma forma modificada de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que possui uma semi-vida num indivíduo, preferencialmente um humano, superior a 3 dias, superior a 7 dias, superior a 10 dias, preferencialmente superior a 15 dias, superior a 25 dias, superior a 30 dias, superior a 35 dias, superior a 40 dias, superior a 45 dias, superior a 2 meses, superior a 3 meses, superior a 4 meses, ou superior a 5 meses. Através do prolongamento das semi-vidas de SYNAGIS® e dos seus fragmentos de ligação ao antigénio, é possível reduzir a quantidade e/ou frequência da dosagem do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio.

Para prolongar a circulação do soro de um anticorpo *in vivo*, podem ser utilizadas várias técnicas. Por exemplo, moléculas de polímero inertes, tais como polietilenoglicol de peso molecular (PEG), podem ser ligadas a um anticorpo com ou sem um ligando multifuncional quer através de conjugação específica para um sítio de PEG com o terminal N ou C do anticorpo ou através de grupos epsilon-amino presentes nos resíduos de lisina. Pode ser utilizada a derivatização de polímero linear ou ramificada que resulta na perda mínima de actividade biológica. O grau de conjugação pode ser monitorizado de perto através de SDS-PAGE e espectrometria de massa para assegurar a conjugação apropriada de moléculas de PEG aos anticorpos. O PEG não reagido pode ser separado a partir de conjugados anticorpo-PEG por exclusão de tamanho ou por cromatografia de permuta iônica. Os anticorpos derivados de PEG podem ser testados para actividade de ligação, assim como para a eficácia *in vivo* utilizando métodos conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, através dos imunoensaios aqui descritos.

Também pode ser criado um anticorpo possuindo uma semi-vida *in vivo* aumentada, através da introdução de uma ou mais modificações de aminoácidos (*i.e.*, substituições, inserções ou deleções) num domínio constante de IgG, ou seu fragmento de ligação a FcRn (preferencialmente um fragmento do Fc ou do domínio da dobradura de Fc). Ver, *e.g.*, Publicação Internacional N°. WO 98/23289; Publicação Internacional N°.

WO 97/34631; e Patente U.S. Nº. 6 277 375. SYNAGIS® e seus fragmentos de ligação ao抗原 com semi-vidas *in vivo* melhoradas e métodos para os preparar são revelados no Pedido Internacional WO 02/060919, submetido em 12 de Dezembro de 2001, intitulado "Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses" e por L. Johnson *et al.*

Para além disso, pode ser conjugado um anticorpo com albumina de modo a produzir o anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao抗原 mais estável *in vivo* ou possuem uma semi-vida *in vivo* mais longa. As técnicas são bem conhecidas na técnica, ver *e.g.*, Publicações Internacionais Nºs. WO 93/15199, WO 93/15200, e WO 01/77137; e Patente Europeia Nº. EP 413 622.

A invenção compreende ainda formulações líquidas de SYNAGIS® ou seus fragmentos de ligação ao抗原 que foram modificadas, por exemplo, por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização através de grupos de protecção/bloqueamento, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc., e retém actividade de ligação ao抗原 de RSV.

5.1.2 Conjugados de Anticorpo

A presente invenção compreende a utilização de formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 (incluindo formas modificadas que possuem semi-vidas *in vivo* aumentadas) que se conjugaram

com uma ou mais unidades, incluindo mas não limitadas a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusão, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequenas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgânicas, e moléculas orgânicas.

A presente invenção comprehende a utilização de formulações líquidas de SYNAGIS® fundidas de forma recombinante ou conjugadas quimicamente (incluindo ambas as conjugações covalentes e não covalentes) com uma proteína heteróloga ou polipéptido (ou fragmento de ligação ao antigénio, preferencialmente 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 criar proteínas de fusão. A fusão não tem que ser necessariamente directa, mas pode ocorrer através de sequências ligando. Por exemplo, pode ser utilizado um anticorpo para direcccionar um polipéptido heterólogo a um tipo celular particular, quer *in vitro* ou *in vivo*, através da fusão ou conjugação do anticorpo com outro anticorpo específico para receptores de superfície celular particular. Pode também ser utilizado um anticorpo fundido ou conjugado com um polipéptido heterólogo em imunoensaios *in vitro* e métodos de purificação utilizando métodos conhecidos na técnica. Ver e.g., 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.

A presente invenção inclui ainda composições que compreendem uma proteína heteróloga, péptido ou polipéptido fundido ou conjugado com um fragmento de ligação ao抗igénio 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 na técnica métodos para fundir ou conjugar um polipéptido com porção de anticorpo. Ver, e.g., Patente U.S. N°s. 5 336 603, 5 622 929, 5 359 046, 5 349 053, 5 447 851, e 5 112 946; Patente Europeia N°s. EP 307 434 e EP 367 166; Publicação Internacional N°s. 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 criadas proteínas de fusão adicionais através de técnicas de mistura de genes, mistura de motivos, mistura de exões, e/ou mistura de códões (colectivamente referidos como "mistura de DNA"). A mistura de DNA pode ser empregue para alterar as actividades de SYNAGIS® ou seus fragmentos (e.g., um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio com afinidades superiores e taxas de dissociação mais baixas). Ver, de um modo geral, Patente U.S. N°s. 5 605 793; 5 811 238; 5 830 721; 5 834 252; e 5 837 458, e Patten et al., 1997, *Curr. Opinion 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. SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, ou o ácido nucleico que codifica SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, pode ser alterado estando sujeito a mutagénese aleatória através de PCR à prova de erros, inserção de nucleótidos aleatória ou outros métodos antes da recombinação. 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.

Para além disso, SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio pode ser fundido com uma sequência de marcador, tal como um péptido para facilitar a purificação. Em formas de realização preferidas, a sequência de marcador de aminoácidos é um péptido de hexa-histidina, tal como o tag proporcionado num vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, por exemplo, a hexa-histidina proporciona purificação conveniente da proteína de fusão. Outros marcadores peptídicos úteis para a purificação incluem, mas não estão limitados a, o marcador de hemaglutinina "HA", que corresponde a um epitopo derivado da proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., 1984, *Cell* 37:767) e o marcador de "bandeira".

A presente invenção também compreende as

formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igenio conjugado com um agente de diagnóstico ou detectável ou qualquer outra molécula para a qual é desejável que a semi-vida no soro seja aumentada. Um tal anticorpo pode ser útil para monitorizar ou prognosticar o desenvolvimento ou progressão de uma infecção por RSV como parte de um processo de teste clínico, tal como determinar a eficácia de uma terapia particular. Esse diagnóstico e detecção pode ser realizado acoplando SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igenio com uma substância detectável incluindo, mas não limitada a, várias enzimas, tais como mas não limitadas a, peroxidase de rábano, 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, umbelifera, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como mas não limitado a, luminol; materiais bioluminescentes, tais como, mas não limitado a, luciferase, luciferina, e aequorina; materiais radioactivos, tais como, mas não limitado a iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), tritio (^{3}H), índio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), e tecnécio (^{99}Tc), tálio (^{201}Ti), 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 , e ^{117}Tin ; metais que emitem positrões utilizando várias

tomografias de emissão de positrões, iões metálicos paramagnéticos noradioactivos, e moléculas que são marcadas radioactivamente ou conjugadas com radioisótopos específicos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada quer directamente a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio ou indirectamente, através de um intermediário (tais como, por exemplo, um ligante conhecido na técnica) utilizando técnicas conhecidas na técnica. Ver, e.g., Patente U.S. Nº. 4 741 900 para iões metálicos que podem ser conjugados com anticorpos para utilização como um diagnóstico de acordo com a presente invenção.

A presente invenção comprehende ainda utilizações de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígenio conjugado com uma unidade terapêutica. Um anticorpo ou fragmento de ligação ao抗ígenio pode ser conjugada com uma unidade terapêutica tal como uma citotoxina, e.g., um agente citostático ou citocida, um agente terapêutico ou um ião metálico radioactivo, e.g., emissores alfa. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que é prejudicial para as células. Exemplos incluem paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, di-hidro-xiantracinadiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos. As unidades terapêuticas incluem, mas não estão limitadas a, antimetabolitos (e.g., meto-

trexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (e.g., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BCNU) e lomustina (CCNU)), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cisdiclorodiamina platina (II) (DDP cisplatina)); antraciclinas (e.g., daunorrubicina (anteriormente denominada daunomicina) e doxorrubicina); antibióticos (e.g., dactinomicina (anteriormente denominado 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 e vinblastina); hormonas (e.g., glucocorticóides, progestatinas, androgénios, e estrogénios); inibidores de enzimas de reparação de DNA (e.g., etopósido ou topotecano); inibidores de quinase (e.g., composto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian et al., *Clin Cancer Res.* 8(7):2167 76 (2002)), e os compostos revelados nas Pat. 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 farnesil transferase (e.g., R115777, BMS 214662, e os revelados em, por exemplo, Patente 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 de topoisomerase (e.g.,
camptotecina, irinotecano, SN 38, topotecano, 9 amino-
camptotecina, 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); ligantes
do sulco menor do DNA, tais como o corante Hoescht 33342 e
o corante Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberbe-
rina; coralina; beta lapacona; BC 4 1; e seus sais
farmaceuticamente aceitáveis, solvatos, clatratos, e pró-
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 unidades terapêuticas também podem ser
oligonucleótidos anti-sentido (e.g., os revelados na Paten-
tes 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 citoqui-
nas); anticorpos (e.g., rituximab (Rituxan®), calicheamycin
(Mylotarg®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), e tositumomab
(Bexxar®)); e inibidores da desaminase de adenosina (e.g.,
fosfato de fludarabina e 2 Clorodesoxiadenosina).

Além disso, um anticorpo ou um seu fragmento de ligação ao抗原 pode ser conjugado com uma unidade terapêutica ou unidade de fármaco que modifica uma dada resposta biológica. A unidade terapêutica ou unidades de fármaco não devem ser encaradas como limitadas a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a unidade do fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo que possua uma actividade biológica desejada. Essas proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina tal como a abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina da cólera, ou toxina da difteria; uma proteína tal como o factor da necrose tumoral, interferão α, interferão β, factor do crescimento nervoso, factor de crescimento derivado das plaquetas, activador de plasminogénio de tecido, um agente apoptótico, e.g., TNF-α TNF-β, AIM I (ver, Publicação Internacional N°. WO97/33899), AIM II (ver, Publicação Internacional N°. WO97/34911), Ligando Fas (Takahashi et al., 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574), e VEGF (ver, Publicação Internacional No. WO 99/23105); ou, um modificador de resposta biológica tal como, por exemplo, uma linfoquina (e.g., interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-4 ("IL-4"), interleuquina-6 ("IL-6"), interleuquina-9 (IL-9), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-12 (IL-12), interferão-α, β, γ, factor de estimulação de colónias de macrófagos de granulócitos ("GM-CSF"), e factor de estimulação de colónias de granulócitos ("G-CSF")), ou um factor de crescimento (e.g., hormona de crescimento ("GH")).

Para além disso, um anticorpo pode ser conjugado com unidades terapêuticas tais como um ião metálico radioactivo, e.g., emissores alfa, tais como quelantes ^{213}Bi ou macrocíclicos úteis para conjugar iões radio-metálicos, incluindo mas não limitados a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , para polipeptídos. Em certas formas de realização, o quelante macrocíclico é ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que pode ser ligado ao anticorpo através de uma molécula ligante. Essas moléculas ligantes são normalmente conhecidas na 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 bem conhecidas técnicas para conjugar unidades terapêuticas a anticorpos, ver, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 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.), pp. 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.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.

Alternativamente, SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 pode ser conjugado com um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado com o anticorpo como descrito por Segal na Patente U.S. Nº. 4 676 980.

SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 pode também ser ligado a suportes sólidos, que são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do抗原 alvo. Esses suportes sólidos incluem, mas não estão limitados a, vidro, celulose, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloreto de polivinilo ou polipropileno.

A unidade terapêutica ou fármaco conjugado a SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 deve ser escolhida para alcançar o(s) efeito(s) profilácticos ou terapêuticos desejados para uma infecção por RSV num indivíduo, um clínico ou outro profissional médico deve considerar o seguinte quando decide sobre que unidade terapêutica ou fármaco se conjuga com SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原: a gravidade da infecção, e a situação do indivíduo.

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

5.2 Método de Preparação de Formulações de Anti-corpo

A presente invenção proporciona métodos para preparar formulações líquidas de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno. A Figura 1 é um diagrama esquemático que apresenta as linhas gerais para preparar SYNAGIS® purificado. Os métodos para preparar formulações líquidas da presente invenção compreendem: purificar o anticorpo a partir do meio condicionado (quer lotes isolados ou lotes reunidos de meio) e concentrando uma fracção contendo o SYNAGIS® purificado para uma concentração de anticorpo final desde 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 150 mg/mL, cerca de 200 mg/mL, cerca de 250 mg/mL, ou cerca de 300 mg/mL utilizando uma membrana semipermeável com um limiar de retenção de peso molecular apropriado (MW) (e.g., limiar de retenção de 30 kD para moléculas de anticorpo totais e fragmentos F(ab')₂; e limiar de retenção de 10 kD para fragmentos de anticorpo, tais como fragmentos Fab) e diafiltrando a fracção de anticorpo concentrado no tampão de formulação buffer utilizando a mesma membrana. O tampão de formulação da presente invenção compreende histidina a uma concentração desde 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 muito preferencialmente cerca de 25 mM. As formulações podem ainda compreender

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 muito preferencialmente de 1,6 mM. A quantidade de glicina na formulação não deve provocar um tamponamento significativo de modo a evitar a precipitação do anticorpo no seu ponto isoeléctrico. O pH da formulação pode variar desde cerca de 5,0 até cerca de 7,0, preferencialmente cerca de 5,5 até cerca de 6,5, mais preferencialmente cerca de 5,8 até cerca de 6,2, e muito preferencialmente cerca de 6,0. Para obter um pH apropriado para um anticorpo particular, é preferível que a histidina (e a glicina, se adicionada) é primeiro dissolvida em água para obter uma solução tampão com pH mais elevado que o pH desejado e depois o pH é baixado até ao nível desejado através da adição de HCl. Deste modo, a formação de sais inorgânicos (e.g., formação de NaCl quando, por exemplo, é utilizado cloridrato de histidina como histidina e o pH é subido para um nível desejado adicionando NaOH) pode ser evitada.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser preparadas como formas de dosagem unitária através da preparação de um frasco contendo uma fracção a formulação líquida para uma utilização única. Por exemplo, uma dosagem unitária por frasco 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 um seu fragmento de ligação ao antigénio variando desde cerca de 65 mg/mL até cerca de 300 mg/mL de concentração de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio que se liga

imunoespecificamente a um RSV. Se necessário, estas preparações podem ser ajustadas a uma concentração desejada através da adição de um diluente estéril a cada frasco.

As formulações líquidas da presente invenção podem ser esterilizadas através de vários métodos de esterilização, incluindo filtração estéril, radiação, etc. Numa forma de realização muito preferida, a formulação de anticorpo diafiltrada é esterilizada por filtração com um filtro pré-esterilizado de 0,2 ou 0,22 micron. As formulações líquidas esterilizadas da presente invenção podem ser administradas a um indivíduo para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas.

Embora a invenção seja dirigida para formulações líquidas não liofilizadas, deve ser salientado para o objectivo de equivalentes que as formulações da invenção podem ser liofilizadas se desejado. Assim, a invenção comprehende formas liofilizadas das formulações da invenção embora essas formulações liofilizadas não sejam necessárias e por isso não preferidas.

5.3 Métodos de Preparação de SYNAGIS®

SYNAGIS® e um seu fragmento de ligação ao antigénio contido nas formulações líquidas da presente invenção podem ser preparados através de qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, em

particular, por síntese química ou, preferencialmente, através de técnicas de expressão recombinante.

A sequência de nucleótidos que codifica os domínios variáveis da cadeia pesada e leve de SYNAGIS® pode ser obtido a partir da Patente U.S. Nº. 5 824 307 de Johnson et al. Em certas formas de realização, um ácido nucleico que codifica SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígeno pode ser sintetizado quimicamente ou montado a partir dos oligonucleótidos como é bem conhecido na técnica, e depois amplificado por PCR, clonagem ou outro método conhecido na técnica.

A expressão recombinante de um anticorpo (tal como SYNAGIS®) requer construção de um vector de expressão contendo uma sequência de nucleótidos que codifica o anticorpo. Uma vez que uma sequência de nucleótidos que codifica uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou um seu fragmento de ligação ao抗ígeno tenha sido obtida, o vector para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido pela tecnologia de DNA recombinante utilizando técnicas bem conhecidas na técnica, como discutido nas secções anteriores. Podem ser utilizados métodos que são bem conhecidos dos especialistas na técnica para construir vectores de expressão contendo sequências que codificam o anticorpo e sinais de controlo de transcrição e 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 a região variável da cadeia pesada, região variável da cadeia leve, ambas as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, um fragmento de ligação ao epitopo da região variável da cadeia pesada e/ou da cadeia leve, ou uma ou mais regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo pode ser clonada num tal vector para expressão. Esse vector de expressão preparado pode ser então introduzido em células hospedeiras apropriadas para a expressão do anticorpo. Consequentemente, a revelação inclui células hospedeiras contendo um polinucleótido que codifica SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原.

A célula hospedeira pode ser co-transflectada com dois vectores de expressão da invenção, o primeiro vector que codifica um polipéptido derivada da cadeia pesada e o segundo vector que codifica um polipéptido derivado da cadeia leve. Os dois vectores podem conter marcadores de selecção idênticos que permitem igual expressão de polipéptidos de cadeia pesada e leve ou diferentes marcadores de selecção para assegurar a manutenção de ambos os plasmídeos. Alternativamente, pode ser utilizado um único vector que codifica, e é capaz de expressar, ambos os polipéptidos de cadeia pesada e leve. Nessas situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada sem tóxicos (Proudfoot, *Nature*, 322:52, 1986; e Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2 197, 1980). As sequências codificantes para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genómico.

Durante longo termo, a produção de elevado rendimento de anticorpos recombinantes, a expressão estável é preferida. Por exemplo, as linhas celulares que expressam de forma estável a molécula de anticorpo podem ser modificadas. Em vez de utilizar vectores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controlo de expressão apropriada (e.g., promotor, intensificador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador de selecção. Após a introdução do DNA estranho, as células podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido, e depois são transferidos para um meio de selecção. O marcador de selecção no plasmídeo recombinante confere resistência para a selecção e permite que as células integrem de forma estável o plasmídeo nos seus cromossomas e cresça para formar foci que por sua vez pode ser clonado e expandido nas linhas celulares. Este método pode ser utilizado vantajosamente para modificar linhas celulares que expressam a molécula de anticorpo. Essas linhas celulares modificadas podem ser particularmente úteis no rastreio e avaliação de composições que interagem directamente ou indirectamente com a molécula de anticorpo.

Podem ser utilizados vários sistemas de selecção, incluindo, mas não limitado a, os genes da cinase de timidina do vírus de herpes simplex (Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977), hipoxantinaguanina fosforribosiltransferase

(Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:202, 1992), e fosforribosiltransferase de adenina (Lowy et al., *Cell*, 22:8-17, 1980) podem ser empregues em células tk⁻, hgprt⁻ ou aprt⁻, respectivamente. Também, a resistência antimetabolito pode ser utilizada como a base de selecção para os seguintes genes: *dhfr*, que confere resistência ao 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*, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981); *neo*, que confere resistência a amino-glicósido G-418 (Wu e Wu, *Biotherapy*, 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*, que confere resistência a higromicina (Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984). Métodos normalmente conhecidos na técnica da tecnologia do DNA recombinante podem ser aplicados de rotina para seleccionar o clone recombinante desejado, e esses 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.

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

Assim que uma molécula de anticorpo da invenção tenha sido produzida por expressão recombinante, pode ser purificada através de qualquer método conhecido na técnica para a purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (e.g., permuta iónica, afinidade, particularmente por afinidade para o抗ígeno específico após purificação por cromatografia em coluna de Proteína A, e de selecção de tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou através de quaisquer outras técnicas convencionais para a purificação de proteínas. Para além disso, o SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗ígeno pode ser fundido com as sequências heterólogas de proteína, polipeptído ou péptido aqui descritas ou de outro modo conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

O fragmento de ligação ao抗ígeno de SYNAGIS®

que se liga imunoespecificamente a RSV pode ser criado através de técnicas conhecidas. Por exemplo, os fragmentos Fab e F(ab')₂ podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas tais como 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 da dobra da cadeia pesada.

5.4 Métodos de Monitorização da Estabilidade E Agregação de Formulações de Anticorpo

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a estabilidade das formulações de proteína, incluindo formulações de anticorpo, com base na estrutura física e química das proteínas, assim como as suas actividades biológicas. Por exemplo, para estudar a desnaturação das proteínas, estão disponíveis métodos tais como absorção de transferência de carga, análise térmica, espectroscopia de fluorescência, dicroismo circular, NMR, e HPSEC. Ver, por exemplo, Wang et al., 1988, *J. of Parenteral Science & Technology* 42(supp):S4-S26. O rCGE, e HPSEC são os métodos mais comuns e mais simples para avaliar a formação de agregados de proteína, degradação da proteína e fragmentação de proteína. Consequentemente, a estabilidade das formulações líquidas da presente invenção podem ser avaliadas por estes métodos.

Por exemplo, a estabilidade das formulações

líquidas da presente invenção pode ser avaliada por HPSEC ou rCGE, em que a área de percentagem dos picos representa SYNAGIS® não degradado ou fragmentos de ligação ao抗igénio de SYNAGIS® não degradados. Em particular, aproximadamente 250 mg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio (aproximadamente 25 mL de uma formulação líquida que compreende 10 mg/mL de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio) é injectado numa coluna TOSOH TSK G3000SWXL (7,8 mm x 30 cm) adaptada com uma coluna TSK SW x1 guard (6,0 mm x 4,0 cm), o SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio é eluído isocraticamente com 0,1 M de fosfato dissódico contendo sulfato de sódio a 0,1 M e azida de sódio a 0,05%, a uma taxa de fluxo de 0,8 até 1,0 mL/min. A proteína eluída é detectada utilizando absorbância UV a 280 nm. O padrão de referência de SYNAGIS® é corrido num ensaio como um controlo, e os resultados são relatados como a percentagem da área do pico do monómero do produto em comparação com todos os picos excluindo o pico do volume incluído observado aproximadamente aos 12 a 14 minutos. Os picos eluídos antes do pico do monómero são registados como percentagem de agregado.

As formulações líquidas da presente invenção apresentam níveis baixos ou não detectáveis de agregação como medido por HPSEC ou rCGE, isto é, não mais do que 5%, não mais do que 4%, não mais do que 3%, não mais do que 2%, não mais do que 1%, e muito preferencialmente não mais do que 0,5% de agregado em peso de proteína, e níveis baixos a

indetectáveis de fragmentação, isto é, 80% ou superior, 85% ou superior, 90% ou superior, 95% ou superior, 98% ou superior, ou 99% ou superior, ou 99,5% ou superior da área do pico total no(s) pico(s) que representam anticorpos intactos ou seus fragmentos. No caso de SDS-PAGE, a densidade ou a radioactividade de cada banda corada ou marcada com radioisótopos pode ser medida e a % de densidade ou % de radioactividade da banda que representa SYNAGIS® não degradado ou seus fragmentos de ligação ao抗igénio pode ser obtida.

A estabilidade das formulações líquidas da presente invenção pode ser também avaliada por quaisquer ensaios que medem a actividade biológica de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio na formulação. As actividades biológicas de um anticorpo incluem, mas não estão limitadas a, actividade de ligação ao抗igénio, actividade de activação de complemento, actividade de ligação ao receptor de Fc, e assim por diante. A actividade de ligação ao抗igénio de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio pode ser medida através de qualquer método conhecido dos especialistas na técnica, incluindo mas não limitados a ELISA, radioimunoensaio, transferência de Western, e semelhantes. A actividade de activação de complemento pode ser medida por um ensaio de C3a/C4a no sistema em que SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗igénio é reagido na presença dos componentes de complemento com células que expressam um抗igénio de RSV. Também ver Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual,

(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988). Um ensaio baseado em ELISA, e.g., pode ser utilizado para comparar a capacidade de uma formulação líquida de SYNAGIS® com base no fragmento de ligação ao antigénio para comparar a capacidade de uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio para ligar imunoespecificamente a um antigénio de RSV ao padrão de referência de SYNAGIS®. Neste ensaio, as placas são revestidas com antigénio de RSV (em particular, o sítio antigénico A da proteína F de RSV) e o sinal de ligação de uma concentração estabelecida de um padrão de referência de SYNAGIS® é comparado com o sinal de ligação da mesma concentração da formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

A pureza das formulações de anticorpo líquidas da invenção pode ser medida através de qualquer método bem conhecido dos especialistas na técnica, tais como, e.g., HPSEC. A esterilidade das formulações de anticorpo líquidas pode ser avaliada como se segue: meio estéril de soja-caseína digerida e meio de tioglicolato fluido são inoculados com uma formulação de anticorpo líquido de teste através de filtração da formulação de anticorpo líquida através de um filtro estéril possuindo uma porosidade nominal de 0,45 mm. Quando se utiliza o método de Sterisure™ ou Steritest™, cada dispositivo de filtro é cheio, em condições de assepsia, com aproximadamente 100 mL de meio estéril de digestão de soja-caseína ou meio de tioglicolato fluido. Quando se utiliza o método conven-

cional, o filtro utilizado é transferido, em condições de assepsia, para 100 mL de meio estéril de digestão de soja-caseína ou meio de tioglicolato fluido. Os meios são incubados a temperaturas apropriadas e observados três vezes durante um período de 14 dias para evidência de crescimento bacteriano ou fúngico.

5.5 Utilidade Profiláctica E Terapêutica Das Formulações de Anticorpo

A presente invenção é também dirigida a terapias à base de anticorpo que envolvem administrar a um indivíduo, preferencialmente um mamífero, muito preferencialmente um humano, as formulações de anticorpo líquidas da presente invenção para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. As formulações profilácticas e terapêuticas da invenção compreendem SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígenio a concentrações desde cerca de 65 mg/mL até cerca de 300 mg/mL numa solução contendo histidina.

As formulações líquidas da invenção podem compreender SYNAGIS® modificado ou seus fragmentos de ligação ao antígenio que possuem semi-vidas *in vivo* melhoradas, em comparação com anticorpos conhecidos que se ligam imunoespecificamente a um antígeno de RSV (*e.g.*, SYNAGIS® não modificado).

Numa forma de realização, as formulações líquidas

da presente invenção são administradas a um mamífero, preferencialmente um humano, para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Noutra forma de realização, as formulações líquidas da invenção são administradas a um humano com fibrose quística, displasia broncopulmonar, doença cardíaca congénita, imunodeficiência congénita ou adquirida, ou a um humano que tenha sido submetido a transplante de medula óssea para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Noutra forma de realização, as formulações líquidas da invenção são administradas a um bebé humano, preferencialmente um bebé humano nascido prematuramente ou um bebé humano em risco de hospitalização devido a uma infecção por RSV para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Noutra forma de realização, as formulações líquidas da invenção são administradas a uma pessoa mais velha para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Ainda noutra forma de realização, as formulações líquidas da invenção são administradas a um indivíduo numa instituição ou lares (e.g., um lar para crianças ou orfanato).

As formulações líquidas da presente invenção podem ser utilizadas localmente ou sistemicamente no corpo de um indivíduo profilacticamente ou terapeuticamente. As formulações da presente invenção podem também ser utilizadas vantajosamente em combinação com outras terapias úteis na prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de

uma infecção por RSV (e.g., um agente profiláctico ou um agente terapêutico diferente de SYNAGIS®). Exemplos não limitantes de agentes profilácticos ou terapêuticos que podem ser utilizados em combinação com as formulações líquidas da presente invenção, ver Secção 5.6, *infra*.

Quando são utilizadas uma ou mais terapias diferentes, elas podem ser administradas separadamente, em qualquer forma apropriada e por qualquer via adequada. Uma formulação líquida da invenção pode ser administrada a um mamífero, preferencialmente um humano, concomitantemente com uma ou mais outras terapias (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. O termo "concomitantemente" não está limitado à administração de terapias exactamente ao mesmo tempo, mas pelo contrário é entendido que uma formulação líquida da invenção e outra terapia são administrados a um mamífero numa sequência e num intervalo de tempo de modo a que SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno contido na formulação líquida possa actuar juntamente com a outra terapia para proporcionar um benefício maior do que se forem administrados de outra forma. Por exemplo, uma formulação líquida da invenção e um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV podem ser administrados ao mesmo tempo ou sequencialmente em qualquer ordem a diferentes pontos de tempo; todavia, se não for

administrado ao mesmo tempo, eles devem ser administrados suficientemente próximos no tempo de modo a proporcionar o efeito terapêutico ou profiláctico desejado.

Em várias formas de realização, a formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias diferentes (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou a seu sintoma são administrados com menos de 1 hora de distância, a cerca de 1 hora de distância, a cerca de 1 hora até cerca de 2 horas de distância, a cerca de 2 horas até cerca de 3 horas de distância, a cerca de 3 horas até cerca de 4 horas de distância, a cerca de 4 horas até cerca de 5 horas de distância, a cerca de 5 horas até cerca de 6 horas de distância, a cerca de 6 horas até cerca de 7 horas de distância, a cerca de 7 horas até cerca de 8 horas de distância, a cerca de 8 horas até cerca de 9 horas de distância, a cerca de 9 horas até cerca de 10 horas de distância, a cerca de 10 horas até cerca de 11 horas de distância, a cerca de 11 horas até cerca de 12 horas de distância, não mais do que 24 horas de distância ou não mais do que 48 horas de distância. Em formas de realização preferidas, uma formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias diferentes (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção com RSV ou um seu sintoma são administrados na mesma visita ao doente. Noutras formas de realização, a formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias diferentes (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou

terapêuticos diferentes) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma são administrados a cerca de 2 até 4 dias de distância, a cerca de 4 a 6 dias de distância, a cerca de 1 semana de distância, a cerca de 1 a 2 semanas de distância, ou mais do que 2 semanas de distância. Em formas de realização preferidas, uma formulação líquida da invenção e um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma são administrados num intervalo de tempo em que ambos os agentes estão ainda activos. Um especialista na técnica será capaz de determinar esse tempo determinando a semi-vida dos agentes administrados.

Em certas formas de realização, a formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias diferentes (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma são administrados clinicamente a um indivíduo. A terapia de ciclagem envolve a administração de uma primeira terapia durante um período de tempo, seguida pela administração de uma segunda terapia e/ou terceira terapia durante um período de tempo e repetindo esta administração sequencial. A terapia de ciclagem pode reduzir o desenvolvimento de resistência a uma ou mais das terapias, evite ou reduz os efeitos colaterais de uma das terapias, e/ou melhora a eficácia do tratamento.

Em certas formas de realização, uma formulação líquida da invenção e uma ou mais terapias diferentes (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes) úteis para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma são administrados num ciclo inferior a cerca de 3 semanas, cerca de uma vez a cada duas semanas, cerca de uma vez a cada 10 dias ou cerca de uma vez por semana. Um ciclo pode compreender a administração de uma terapia (e.g., um agente terapêutico ou profiláctico) por infusão durante cerca de 90 minutos em cada ciclo, cerca de 1 hora cada ciclo, cerca de 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo pode compreender pelo menos 1 semana de repouso, pelo menos 2 semanas de repouso, pelo menos 3 semanas de repouso. O número de ciclos administrados é desde cerca de 1 até cerca de 12 ciclos, mais tipicamente desde cerca de 2 até cerca de 10 ciclos, e mais tipicamente desde cerca de 2 até cerca de 8 ciclos.

Geralmente, a administração de produtos de uma origem de espécie ou reactividade de espécie (no caso de anticorpos) isto é, a mesma espécie que a do doente é preferida. Assim, numa forma de realização preferida, são administrados anticorpos humanos ou humanizado, fragmentos derivados, ou análogos a um doente humano para terapia ou profilaxia.

5.6 Agentes Úteis em Combinação com Formulações de SYNAGIS®

A presente invenção proporciona métodos para

prevenir, gerir, tratar, ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas que compreende administrar a um indivíduo que dela necessite de uma formulação líquida da invenção isoladamente ou em combinação com uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos) diferentes de SYNAGIS®. A presente invenção proporciona métodos para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta, que compreende administrar a um indivíduo que dela necessite uma formulação líquida da invenção isolada ou em combinação com uma ou mais terapias (e.g., um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos) diferentes de SYNAGIS®. A presente invenção também proporciona composições que compreendem uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antígeno e um ou mais agentes profilácticos ou terapêuticos diferentes de SYNAGIS® e métodos de prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta utilizando as referidas composições. Agentes terapêuticos ou profilácticos incluem, mas não estão limitados a, moléculas pequenas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (e.g., nucleótidos de DNA e RNA incluindo, mas não limitados a, sequências de nucleótidos anti-sentido, hélices triplas, RNA de interferência (RNAi), e sequências de nucleótidos que codifica proteínas biologicamente activas, polipeptídos ou péptidos) anticorpos, moléculas orgânicas sintéticas ou naturais, agentes miméticos, e moléculas orgânicas sintéticas ou naturais.

Qualquer terapia que é conhecida por ser útil, ou que pode ser utilizada ou é está presentemente a ser utilizada para a prevenção, gestão, tratamento, ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta pode ser utilizada em combinação com uma formulação líquida de acordo com a invenção aqui descrita. Ver, e.g., Gilman et al., Goodman e Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw-Hill, Nova Iorque, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. et al. (eds.), 17^a Ed., Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20^a Ed., Bennett e Plum (eds.), W.B. Saunders, Filadélfia, 1996, para informação em relação a terapias (e.g., agentes profilácticos ou terapêuticos) que foram ou estão presentemente a ser utilizados para a prevenção, tratamento, gestão, ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Exemplos desses agentes incluem, mas não estão limitados a, agentes imunomoduladores, agentes anti-inflamatórios (e.g., adrenocorticóides, corticosteróides (e.g., beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolina, prednisona, hidrocortisona), glucocorticóides, esteróides, fármacos anti-inflamatórios não esteróides (e.g., aspirina, ibuprofen, diclofenac, e inibidores de COX-2), aliviadores de dor, antagonistas de leucotreíno (e.g., montelukast, metilxantinas, zafirlukast, e zileuton), agonistas beta₂ (e.g., albuterol, biterol, fenoterol, isoetaria, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, formo-

terol de terbutalina, salmeterol, e salbutamol terbutalina), agentes anticolinérgicos (e.g., brometo de ipratropio e brometo de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, anti-histaminas, agentes anti-malaria (e.g., hidroxi-cloroquina)), e agentes anti-virais.

Em formas de realização específicas, é utilizada uma formulação líquida da invenção em combinação com um anticorpo monoclonal ou quimérico, ou com uma linfoquina ou factor 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 serve, por exemplo, para aumentar o número ou actividade de células efectoras que interagem com o anticorpo. A formulação líquida da presente invenção pode também ser utilizada vantajosamente em combinação com outros anticorpos monoclonais ou quiméricos, ou com linfoquinas ou factores 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 da presente invenção também podem ser utilizadas vantajosamente em combinação com um ou mais fármacos utilizados para tratar infecção por RSV tal como, por exemplo agentes anti-virais. As formulações líquidas da presente invenção podem ser utilizadas em combinação com um ou mais dos seguintes fármacos: NIH-351 (Gemini Technologies), vacina de RSV recombinante (MedImmune Vaccines, Inc. Pedidos U.S. N°s. 60/358,934 submetidos em 21 de Fevereiro de 2002, 10/373,567 submetido em 21 de Fevereiro de 2003, 10/371,099

submetido em 21 de Fevereiro de 2003, 10/371,122 submetido em 21 de Fevereiro de 2003, 10/371,264 submetido em 21 de Fevereiro de 2003, 60/466,181 submetido em 25 de Abril de 2003 e 60/465,811 submetido em 25 de Abril de 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 de RSV (Avant Immunotherapeutics), e F-50077 (Pierre Fabre).

5.6.1 Agentes Imunomoduladores

Qualquer agente imunomodulador bem conhecido de um especialista na técnica pode ser utilizado de acordo com os métodos da invenção para prevenir, tratar, gestão ou melhorar a infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Agentes imunomoduladores podem afectar um ou mais ou todos os aspectos da resposta imunitária num indivíduo. Aspectos da resposta imunitária incluem, mas não estão limitados a, resposta inflamatória, a cascata de complemento, diferenciação de leucócitos e linfócitos, proliferação, e/ou função efectora, contagem de monócitos e/ou basófilos, e a comunicação celular entre as células do sistema imunitário. Em certas formas de realização da invenção, um agente imunomodulador modula um aspecto da resposta imunitária. Noutras formas de realização, um agente imunomodulador modula mais do que um aspecto da resposta imunitária. Numa forma de realização preferida da invenção, a administração de um agente imunomodulador a um

indivíduo inibe ou reduz um ou mais aspectos das capacidades de resposta imunitária do indivíduo. Numa forma de realização alternativa da invenção, o agente imunomodulador aumenta um ou mais aspectos da resposta imunitária de um indivíduo. Em certas formas de realização, um agente imunomodulador não é um agente anti-inflamatório. Numa forma de realização específica, um agente imunomodulador é um agente quimioterapêutico diferente.

Exemplos de agentes imunomoduladores incluem, mas não estão limitados a, agentes proteicos tais como citoquinas, péptidos miméticos, e anticorpos (e.g., humanos, humanizados, quiméricos, monoclonais, policlonais, fragmentos Fvs, ScFvs, Fab ou F(ab)₂ ou fragmentos de ligação ao epitopo), moléculas de ácido nucleico (e.g., moléculas de ácido nucleico anti-sentido e hélices triplas), moléculas pequenas, compostos orgânicos, e compostos inorgânicos. Em particular, agentes imunomoduladores incluem, mas não estão limitados a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatoprina, antibióticos (e.g., FK506 (tacrolimus)), metilprednisolona (MP), corticoesteróides, esteróides, micofenolato mofetil, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxispergualina, brequinar, malononitriloamindas (e.g., leflunamida), moduladores de receptor de células T, e moduladores do receptor de citoquina.

Exemplos de moduladores de receptor de células T incluem, mas não estão 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 imunoconjunto ligado a ricina anti-CD5), 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., Publicação Internacional N°s. WO 02/098370 e WO02/069904), anticorpos anti-CD11a (e.g., Xanlim (Genentech)), e anticorpos anti-B7 (e.g., IDEC- 114) (IDEC))), CTLA4-imunoglobulina, e LFA-3TIP (Biogen, Publicação Internacional N°. WO 93/08656 e Patente U.S. N°. 6 162 432).

Exemplos de moduladores do receptor de citoquina incluem, mas não estão limitados a, receptores de citoquina solúvel (e.g., o domínio extracelular de um receptor de TNF- α ou um seu fragmento de ligação ao抗原, o domínio extracelular de um receptor de IL-1 β ou um seu fragmento de ligação ao抗原, e o domínio extracelular de um receptor de IL-6 ou um seu fragmento de ligação ao抗原), citoquinas ou seus fragmentos (e.g., interleuquina 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-receptor de citoquina (e.g., anticorpos anti-receptor de IFN, anticorpos anti-receptor de IL-2 (e.g., Zenapax

(Protein Design Labs)), anticorpos anti-receptor de IL-3, anticorpos anti-receptor de IL-4, anticorpos anti-receptor de IL-6, anticorpos anti-receptor de IL-9, anticorpos anti-receptor de IL-10, anticorpos anti-receptor de IL-12, anticorpos anti-receptor de IL-13, anticorpos anti-receptor de IL-15, e anticorpos anti-receptor de IL-23), anticorpos anti-citoquina (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).

Numa forma de realização específica, um modulador de receptor de citoquina é IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. Noutra forma de realização, um modulador de receptor de citoquina é um anticorpo anti-IL-1 β , anticorpo anti-IL-6, anticorpo anti-IL-9, anticorpo anti-receptor IL-12, ou anticorpo anti-TNF- α . Noutra forma de realização, um modulador de receptor de citoquina é o domínio extracelular de um receptor de TNF- α ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

Pode ser seleccionado um agente imunomodulador para interferir com as interacções entre os subconjuntos de T helper (TH1 ou TH2) e células B para inibir a formação do anticorpo neutralizador. Os anticorpos que interferem com ou bloqueiam as interacções necessárias para a activação de células B por células TH (T helper), e desse modo bloquear

a produção de anticorpos neutralizadores, são úteis como agentes imunomoduladores nos métodos da invenção. Por exemplo, a activação das células B pelas células T requer que ocorram certas interacções (Durie et al., *Immunol. Today*, 15(9):406-410 (1994)), tal como a ligação de ligando CD40 na célula T helper ao qual o抗igénio de CD40 nas células B, e a ligação dos ligandos CD28 e/ou CTLA4 na célula T ao抗igénio B7 na célula B. Sem ambas as interacções, a célula B não pode ser activada para induzir a produção do anticorpo neutralizador.

A interacção do ligando CD40 (CD40L)-CD40 é um ponto desejável para bloquear a resposta imunitária devido à sua actividade lata em ambos a activação de células T helper e a função assim como a ausência de redundância na sua via de sinalização. Assim, numa forma de realização específica da invenção, a interacção 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 CD40 na célula T helper com o抗igénio CD40 na célula B. Pode ser seleccionado um anticorpo para o ligando CD40 (anti-CD40L) (disponível em Bristol-Myers Squibb Co; ver, e.g., Pedido de Patente Europeia 555 880, publicado em 18 de Agosto de 1993) ou uma molécula de CD40 solúvel e utilizado como um agente imunomodulador de acordo com os métodos da invenção.

Um agente imunomodulador pode ser seleccionado para inibir a interacção entre células TH1 e linfócitos T citotóxicos ("CTLs") para reduzir a ocorrência de morte mediada por CTL. Pode ser seleccionado um agente imunomodulador para alterar (*e.g.*, inibir ou suprimir) a proliferação, diferenciação, actividade e/ou função das células T CD4+ e/ou CD8+. Por exemplo, os anticorpos específicos para as células T podem ser utilizados como agentes imunomoduladores para esgotar, ou alterar a proliferação, diferenciação, actividade e/ou função de células T CD4+ e/ou CD8+.

Numa forma de realização, um agente imunomodulador que reduz ou inibe uma ou mais actividades biológicas (*e.g.*, a diferenciação, proliferação, e/ou funções efectoras) de subconjuntos TH0, TH1, e/ou TH2 de células T helper CD4+ é administrado a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos da invenção. Um exemplo desse agente imunomodulador é IL-4. IL-4 aumenta a actividade específica para o antigénio de células TH2 à custa da função da célula TH1 (ver, *e.g.*, Yokota *et al*, 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 83:5894-5898; e Patente U.S. N°. 5 017 691). Outros exemplos de agentes imunomoduladores que afectam a actividade biológica (*e.g.*, proliferação, diferenciação, e/ou funções efectoras) de células T-helper (em particular, células TH1 e/ou TH2) incluem, mas não estão limitados a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23, e interferão (IFN)- γ .

Noutra forma de realização, um agente imunomodulador administrado a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos da invenção é uma citoquina que previne a apresentação do抗原. Numa forma de realização específica, um agente imunomodulador utilizado nos métodos da invenção é IL-10. O IL-10 também reduz ou inibe a acção dos macrófagos que envolve a eliminação bacteriana.

De acordo com a invenção, um ou mais agentes imunomoduladores são administrados a um indivíduo com uma infecção por RSV antes de, subsequente a, ou concomitantemente com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原. Preferencialmente, um ou mais agentes imunomoduladores são administrados em combinação com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 a um indivíduo com uma infecção por RSV para reduzir ou inibir um ou mais aspectos da resposta imunitária como considerado necessário por um especialista na técnica. Qualquer técnica bem conhecida dos especialistas na técnica pode ser utilizada para medir um ou mais aspectos da resposta imunitária num indivíduo particular, e desse modo determinar quando é que é necessário administrar um agente imunomodulador ao referido indivíduo. Numa forma de realização preferida, uma contagem média absoluta 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. Noutra forma de realização preferida, um indivíduo com uma infecção por RSV não é administrado com um agente imunomodulador se a sua contagem de linfócitos absoluta é de 500 células/mm³ ou inferior, 550 células/mm³ ou inferior, 600 células/mm³ ou inferior, 650 células/mm³ ou inferior, 700 células/mm³ ou inferior, 750 células/mm³ ou inferior, ou 800 células/mm³ ou inferior.

Numa forma de realização específica, um ou mais agentes imunomoduladores são administrados em combinação com uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原 a um indivíduo com uma infecção por RSV de modo a reduzir transientemente ou inibir um ou mais aspectos da resposta imunitária. Uma tal inibição transiente ou redução de um ou mais aspectos do sistema imunitário pode durar horas, dias, semanas, ou meses. Preferencialmente, a inibição transiente ou redução em um ou mais aspectos da resposta imunitária dura durante desde 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), até 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 aspectos da resposta imunitária aumenta o(s) efeito(s) profilácticos e/ou terapêuticos de uma formulação líquida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao抗原.

Numa forma de realização preferida, proteínas, polipéptidos ou péptidos (incluindo anticorpos) que são utilizados como agentes imunomoduladores são derivados da mesma espécie que o recipiente das proteínas, polipéptidos ou péptidos de modo a reduzir a probabilidade de uma resposta imunitária contra essas proteínas, polipéptidos ou péptidos. Noutra forma de realização preferida, quando o indivíduo é um humano, as proteínas, polipéptidos, ou péptidos que são utilizados os agentes imunomoduladores são humanos ou humanizados.

Moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas, polipéptidos, ou péptidos com actividade imunomoduladora ou proteínas, polipéptidos, ou péptidos com actividade imunomoduladora podem ser administrados a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos da invenção. Para além disso, moléculas de ácido nucleico que codificam derivados, análogos, ou fragmentos de proteínas, polipéptidos, ou péptidos com actividade imunomoduladora, ou derivados, análogos, ou fragmentos de proteínas, polipéptidos, ou péptidos com actividade imunomoduladora podem ser administrados a um indivíduo com uma infecção por RSV de acordo com os métodos da invenção. Preferencialmente, esses derivados, análogos, e fragmentos retêm a actividade imunomoduladora da proteína de comprimento total, proteína de tipo selvagem, polipéptido, ou péptido.

Preferencialmente, agentes que estão comercial-

mente disponíveis e conhecidos por funcionarem como agentes imunomoduladores são utilizados nos métodos da invenção. A actividade imunomoduladora de um agente pode ser determinada *in vitro* e/ou *in vivo* através de qualquer técnica bem conhecida de um especialista na técnica, incluindo, *e.g.*, por ensaios de CTL, ensaios de proliferação, e imunoensaios (*e.g.* ELISAs) para a expressão de proteínas particulares, tais como moléculas co-estimuladoras e citoquinas.

5.6.2 Agentes Anti-inflamatórios

Qualquer agente anti-inflamatório, incluindo agentes úteis em terapias para distúrbios inflamatórios, bem conhecidos de um especialista na técnica podem ser utilizados de acordo com métodos da invenção para prevenir, tratar, gerir, ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta. Exemplos não limitantes de agentes anti-inflamatórios incluem fármacos não esteróides anti-inflamatórios (NSAIDs), fármacos esteróides anti-inflamatórios, anticolinérgicos (*e.g.*, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina, e brometo de ipratropio (ATROVENTTM), beta2-agonistas (*e.g.*, abuterol (VENTOLINTM e PROVENTILTM), bitolterol (TORNALATETM), levalbuterol (XOPONEXTM), metaproterenol (ALUPENTTM), pirbuterol (MAXAIRTM), terbutalaina (BRETHAIRETM e BRETHINETM), albuterol (PROVENTILTM, REPETABSTM, e VOLMAXTM), formoterol (FORADIL AEROLIZERTM), e salmeterol (SEREVENTTMand SEREVENTDISKUSTM)), e metilxantinas (*e.g.*, teofilina (UNIPHYLTM, THEO-DURTM, SLO-BIDTM, e TEHO-42TM)). Exemplos de NSAIDs incluem, mas não estão limitados a,

aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenac (VOLTAREN™), etodolac (LODINE™), fenoprofen (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketorolac (TORADOL™), oxaprozina (DAYPRO™), nabumentona (RELAFEN™), sulindac (CLINORIL™), tolmentina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), cetoprofeno (ACTRON™) e nabumetona (RELAFENT™). Esses NSAIDs funcionam através da inibição de uma enzima ciclooxigenase (e.g., COX-1 e/ou COX-2). Exemplos de fármacos esteróides anti-inflamatórios incluem, mas não estão limitados a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteróides (e.g., metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONE™ e DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ e PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina, e inibidores de eicosanóides (e.g., prostaglandinas, tromboxanos, e leucotrienos (ver Tabela 2, *infra*, para exemplos não limitantes de leucotrieno e dosagens típicas desses agentes)).

5.6.3 Agentes Anti-Virais

Qualquer agente anti-viral bem conhecido de um especialista na técnica (em particular, um útil para o tratamento, prevenção, gestão, ou melhoramento de uma infecção por RSV) pode ser utilizada de acordo com os métodos da invenção para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta. Exemplos não limitantes de agentes anti-virais incluem proteínas, polipeptídos, péptidos, proteínas de fusão anti-corpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgânicas,

moléculas inorgânicas, e moléculas pequenas que inibem e/ou reduzem a ligação de um vírus ao seu receptor, a internalização de um vírus numa célula, a replicação de um vírus, ou libertação do vírus de uma célula. Em particular, agentes anti-virais incluem, mas não estão limitados a, análogos de nucleósido (e.g., zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, e ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferões alfa e outros interferões, e AZT.

Numa forma de realização específica, o agente anti-viral é um agente de anticorpo diferente de SYNAGIS® que é imunoespecífico para um抗igénio viral. Como aqui utilizado, o termo "antigénio viral" inclui, mas não está limitado a, qualquer péptido, polipéptido e proteína de RSV (e.g., glicoproteína F de RSV e glicoproteína G de RSV) que é capaz de induzir uma resposta imunitária.

Em formas de realização preferidas, a infecção viral é RSV e o antigénio anti-viral é um anticorpo diferente de SYNAGIS ® que se liga imunoespecificamente a um antigénio de RSV. Em certas formas de realização, o anticorpo anti-antigénio de RSV liga-se imunoespecificamente a um antigénio de RSV do Grupo A de RSV. Noutras formas de realização, o anticorpo anti-antigénio de RSV liga-se imunoespecificamente a um antigénio de RSV do Grupo B de RSV. Noutras formas de realização, o anticorpo anti-antigénio de RSV liga-se imunoespecificamente a um

antigénio de RSV de um Grupo e faz reacção cruzada com o antigénio análogo do outro Grupo. Em formas de realização particulares, o anticorpo anti-antigénio de RSV liga-se imunoespecificamente a uma nucleoproteína de RSV, fosfoproteína de RSV, proteína matriz de RSV, proteína hidrofóbica pequena de RSV, polimerase de RNA dependente de RNA de RSV, proteína F de RSV, e/ou proteína G de RSV. Adicionalmente a formas de realização específicas, o anticorpo anti-antigénio de RSV liga-se a variantes alélicas de uma nucleoproteína de RSV, uma proteína de nucleocápsida de RSV, uma fosfoproteína de RSV, uma proteína matriz de RSV, uma glicoproteína ligada a RSV, uma glicoproteína de fusão de RSV, uma proteína de nucleocápside de RSV, uma proteína de matriz de RSV, uma proteína hidrofóbica pequena de RSV, uma polimerase de RNA dependente de RNA de RSV, uma proteína F de RSV, uma proteína L de RSV, uma proteína P de RSV, e/ou uma proteína G de RSV.

Terapias anti-virais e suas dosagens, vias de administração e utilização recomendada são conhecidas na técnica e foram descritas nessa literatura como Physician's Desk Reference (57^a ed., 2003). Informação adicional às infecções respiratórias virais está disponível em Cecil Textbook of Medicine (18^a ed., 1988).

5.7 Métodos de Administração de Formulações de SYNAGIS®

A invenção proporciona métodos de tratamento,

profilaxia, e melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta, através da administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de formulações líquidas da invenção. O indivíduo é preferencialmente um mamífero tal como um não primata (e.g., vacas, porcos, cavalos, gatos, cães, ratos etc.) e um primata (e.g., macaco tal como um macaco cinomólogo e um humano). Numa forma de realização preferida, o indivíduo é um humano. Noutra forma de realização preferida, o indivíduo é um bebé humano ou um bebé humano que nasceu prematuro.

São conhecidos vários sistemas de distribuição e podem ser utilizados para administrar uma formulação líquida da presente invenção. Métodos de administrar formulações líquidas de SYNAGIS® da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, administração parentérica (e.g., intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea), administração epidural, administração tópica, administração pulmonar, e administração pela mucosa (e.g., pelas vias intranasal e oral). Numa forma de realização específica, formulações líquidas da presente invenção são administradas intramuscularmente, intravenosamente, ou subcutaneamente e, preferencialmente, intramuscularmente. As formulações podem ser administradas por uma via conveniente, por exemplo por infusão ou injecção de bólus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (e.g., mucosa oral, rectal e mucosa intestinal, etc.) e pode ser administrada juntamente com outros agentes biologicamente activos. A administração pode ser

sistémica ou local. Adicionalmente, a administração pulmonar pode ser empregue, e.g., através da utilização de um inalador ou nebulizador.

A invenção também proporciona que a formulação líquida da presente invenção seja embalada num recipiente hermeticamente selado, tal como uma ampola ou saqueta indicando a quantidade do SYNAGIS® ou seus fragmentos de ligação ao antígenio. Preferencialmente, as formulações líquidas da presente invenção estão num recipiente hermeticamente selado indicando a quantidade e concentração do anticorpo ou fragmento de anticorpo. Preferencialmente, a formulação líquida da presente invenção é fornecida num recipiente hermeticamente selado de pelo menos 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, muito 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, muito preferencialmente, 1,2 mL.

A quantidade das formulações líquidas da presente invenção que serão eficazes na prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta podem ser determinadas por técnicas clínicas convencionais. Por exemplo, a dosagem da composição que será eficaz no tratamento, prevenção ou melhoramento de sintomas associados com uma infecção por RSV pode ser determinada através da administração da formulação a um rato do algodão, medindo o título de RSV

após exposição do rato do algodão com 10^5 pfu de RSV e comparar o título de RSV com o que se obtém para um rato de algodão não administrado com a formulação. Consequentemente, uma dosagem que resulta numa diminuição de 2 log ou uma redução de 99% num título de RSV no rato do algodão exposto a 10^5 pfu de RSV relativo ao rato do algodão exposto a 10^5 pfu de RSV mas não administrado com a formulação é a dosagem da formulação que pode ser administrada a um humano para prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta. A dosagem da formulação que será eficaz na prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta pode ser determinada pela administração da formulação a um modelo animal (e.g., um rato do algodão ou macaco) e medindo o título no soro de SYNAGIS® ou seus fragmentos de ligação ao antígeno. Consequentemente, uma dosagem da formulação que resulta num título do soro de pelo menos 1 mg/mL, preferencialmente 2 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL, pelo menos 35 mg/mL, pelo menos 40 mg/mL, pelo menos 50 mg/mL, pelo menos 75 mg/mL, pelo menos 100 mg/mL, pelo menos 125 mg/mL, pelo menos 150 mg/mL, pelo menos 200 mg/mL, pelo menos 250 mg/mL, pelo menos 300 mg/mL, pelo menos 350 mg/mL, pelo menos 400 mg/mL, ou pelo menos 450 mg/mL pode ser administrado a um humano para prevenção, tratamento, gestão ou melhoramento de uma infecção por RSV ou um ou mais sintomas desta. Adicionalmente, os ensaios *in vitro* podem ser empregues opcionalmente para ajudar a identificar intervalos de dosagem óptimos.

A dosagem precisa para ser empregue na formulação também irá depender da via de administração, e da gravidade da infecção por RSV, e deve ser decidida de acordo com a opinião do médico assistente e as circunstâncias de cada doente. As doses eficazes podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta derivadas de um sistema de teste *in vitro* ou modelo animal (e.g., o rato do algodão ou macaco Cinomólogo).

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 até 30 mg/kg do peso corporal do doente. Preferencialmente, a dosagem administrada a um doente está 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 possuem uma semi-vida mais longa num corpo humano do que os anticorpos de outras espécies devido à resposta imunitária aos polipéptidos estranhos. Assim, dosagens inferiores de anticorpos humanos e administração menos frequente é frequentemente possível. Além disso, a dosagem, volume e frequência de administração de formulações líquidas da presente invenção podem ser reduzidas aumentando a concentração de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio nas formulações, aumentando a afinidade e/ou avidez de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, e/ou aumentando a semi-vida de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação ao antigénio.

Doses exemplificativas de uma molécula pequena incluem quantidades de miligrama ou micrograma da pequena molécula por quilograma de indivíduo ou peso da 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).

Numa forma de realização específica, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, uma formulação líquida estável da presente invenção para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para diminuir o título de RSVs. De acordo com esta forma de realização, uma quantidade eficaz das formulações líquidas da presente invenção reduz o título de RSVs no pulmão conforme medido, por exemplo, pela concentração de RSV em amostras de expectoração ou uma lavagem do pulmão de um mamífero. Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, uma formulação líquida da presente invenção para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir uma resposta imunitária no mamífero.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, uma primeira dose de

uma formulação líquida da presente invenção 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 seu fragmento de ligação a抗igénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir um título no 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 a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente. Numa forma de realização específica, a formulação líquida da presente invenção compreende SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio e é administrado a um indivíduo, uma primeira dose de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg para induzir um título no soro de cerca de 40 µg/mL ou superior 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título no soro do referido SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio é menos do que 50 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, uma primeira dose de formulações líquidas da presente invenção 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 seu fragmento de ligação a抗igénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir um título no 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 antes da administração de dose subsequente. Preferencialmente, o título no soro do referido SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio é menos do que 30 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose de uma formulação líquida da presente invenção 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 uma forma modificada de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas que possui um tempo de semi-vida aumentado *in vivo*, numa quantidade eficaz para induzir um título no 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 antes da administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título no soro do referido SYNAGIS® ou de um seu fragmento de ligação a antigénio é menos do que 30 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose de uma formulação líquida da presente invenção 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 seu fragmento de ligação a antigénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas que possui uma semi-vida aumentada *in vivo*, numa quantidade eficaz para induzir um título no 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 antes da administração de uma dose subsequente. Preferencialmente, o título no soro do referido SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio é menos do que 30 µg/mL 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose da formulação líquida 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 seu fragmento de ligação a抗igénio que possui uma semi-vida aumentada *in vivo* para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas, numa quantidade eficaz para induzir um título no 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 antes da administração de uma dose subsequente.

Numa forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose de uma formulação líquida da presente invenção para distribuição pulmonar 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 seu fragmento de ligação a抗igénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir um título de pelo menos 20 ng por mg de proteína de pulmão (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 dos pulmões do referido mamífero 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35, ou 40 dias) após a administração da primeira dose e antes da administração de um dose subsequente. Preferencialmente, o título no soro do referido SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio é menos do que 100 ng/mL de proteína 30 dias após a administração da primeira dose e antes da administração de uma dose subsequente.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose de uma formulação líquida da presente invenção 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 seu fragmento de ligação a antigénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas, numa quantidade eficaz para induzir um título no 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. Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano uma primeira dose de uma formulação líquida da presente invenção compreendendo aproximadamente 15 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria

de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir um título no soro de 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 g/mL 20 dias (preferencialmente 25, 30, 35 ou 40 dias) após a administração da primeira dose. O termo "aproximadamente 15 mg/kg" como aqui utilizado refere-se a um intervalo entre 14 mg/kg e 16 mg/kg.

Em outra forma de realização, é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, uma dose de uma formulação líquida da presente invenção compreendendo SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio para a prevenção de uma infecção por RSV ou um seu sintoma numa quantidade eficaz para induzir um título no soro profilacticamente eficaz de menos do que 10 µg/mL, menos do que 8 µg/mL, menos do que 5 µg/mL, menos do que 3 µg/mL, menos do que 1 µg/mL, ou menos do que 0,5 µg/mL 30 dias após a administração da dose, em que o referido título no soro profilacticamente eficaz é o título no soro que reduz a incidência da infecção por RSV no humano ou o título no soro num rato do algodão que resulta num título de RSV 5 dias após exposição a 10^5 pfu de RSV que é 99% menos do que o título de RSV no rato do algodão 5 dias após exposição com 105 pfu de RSV num rato do algodão a que não foi administrada a dose antes da exposição. Preferencialmente, a dose de terapêuticos ou da composição 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 seu fragmento de ligação a antigénio.

Ainda noutra forma de realização, a um mamífero, preferencialmente um humano, é administrada uma dose de uma formulação líquida da presente invenção compreendendo SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio para o tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas numa quantidade eficaz para induzir um título no soro terapeuticamente eficaz de menos do que 10 µg/mL, menos do que 8 µg/mL, menos do que 5 µg/mL, menos do que 3 µg/mL, menos do que 1 µg/mL, ou menos do que 0,5 µg/mL 30 dias após a administração da dose, em que o referido título no soro terapeuticamente eficaz é o título no soro que reduz a gravidade ou comprimento da infecção por RSV ou é o título no soro num rato do algodão que resulta num título de RSV no rato 5 dias após exposição a 10^5 pfu de RSV que é 99% menos do que o título de RSV 5 dias após exposição a 10^5 pfu de RSV num rato do algodão a que não foi administrada a dose antes da exposição. 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 5 mg/kg ou menos de um anticorpo ou um seu fragmento de ligação a antigénio.

Numa forma de realização específica, as formulações da presente invenção são administradas uma vez por mês

mesmo antes de ou durante a temporada de RSV. Em outra forma de realização, as formulações são administradas em cada dois meses mesmo antes de ou durante a temporada de RSV. Ainda noutra forma de realização, as formulações estáveis da presente invenção são administradas mesmo antes de ou durante a temporada de RSV. O termo "temporada de RSV" refere-se à temporada em que a infecção por RSV tem mais probabilidade de ocorrer. Tipicamente, a temporada de RSV no hemisfério norte começa em Novembro e dura até Abril.

Numa forma de realização, uma formulação líquida compreendendo aproximadamente 5 mg/kg ou menos (preferencialmente 1,5 mg/kg ou menos) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio é administrado cinco vezes, 3 vezes, ou 1 a 2 vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano. Em outra forma de realização, aproximadamente 1,5 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio, nas formulações líquidas da presente invenção é administrado mensalmente cinco vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. Em outra forma de realização, 3 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio na formulação líquida da invenção é administrado mensalmente três vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. Ainda noutra forma de realização, 5 mg/kg de um SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio numa

formulação líquida da invenção é administrado mensalmente uma a duas vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente.

Numa forma de realização específica, 15 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio na formulação líquida da presente invenção é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente cinco vezes durante uma temporada de RSV, em que o referido SYNAGIS® ou fragmento de anticorpo tem um tempo de semi-vida *in vivo* aumentado. Em outra forma de realização, aproximadamente 5 mg/kg ou menos (preferencialmente 1,5 mg/kg ou menos) de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio na formulação líquida da presente invenção é administrado cinco vezes, 3 vezes, ou 1 a 2 vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano. Em outra forma de realização, 3 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio, que tem uma semi-vida aumentada *in vivo*, na formulação líquida da presente invenção é administrado mensalmente três vezes durante uma temporada de RSV a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente. Em outra forma de realização, 5 mg/kg de SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗igénio, que tem uma semi-vida aumentada *in vivo* na formulação líquida da presente invenção é administrado a um mamífero, preferencialmente um humano, intramuscularmente duas vezes durante uma temporada de RSV.

5.8 Ensaios Biológico**5.8.1 Imunospecificidade dos Anticorpos da Invenção**

Os anticorpos da presente invenção ou seus fragmentos podem ser caracterizados numa variedade de maneiras bem conhecidas do especialista na técnica. Em particular, os anticorpos da invenção ou seus fragmentos de ligação ao抗原 numa formulação líquida da presente invenção podem ser ensaiados quanto à sua capacidade para ligar imunoespecificamente a um epitopo de um vírus sincicial respiratório. Tal ensaio pode ser efectuado em solução (e.g., Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), em contas (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 (Patente 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 fagos (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). O SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗原 numa formulação líquida da presente invenção pode ser ensaiada quanto à sua especificidade e afinidade.

O SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a抗原 da presente invenção pode ser ensaiado quanto a ligação imunoespecífica a um抗原 de RSV e reacti-

vidade cruzada com outros抗原s por qualquer método conhecido na técnica. Os imunoensaios que podem ser utilizados para analisar a ligação imunoespecífica e reactividade cruzada incluem, mas não estão limitados a, sistemas de ensaios competitivos e não competitivos utilizando técnicas tais como transferências de western, radioimunoensaios, ELISA (ensaio imunoabsorvente com enzima ligada), imunoensaios em "sanduíche", ensaios de imunoprecipitação, reacções de precipitação, reacções de precipitação por difusão em gel, ensaios de imunodifusão, ensaios de aglutinação, ensaios de fixação de complemento, ensaios imuno-radiométricos, imunoensaios fluorescentes, imunoensaios com proteína A, para nomear apenas alguns. Alguns ensaios são de rotina e bem conhecidos na técnica (ver, e.g., Ausubel et al., eds., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley&Sons, Inc., Nova Iorque).

5.8.2 Ensaios *In vitro* e *in vivo*

A formulação líquida ou uma combinação de terapia da presente invenção pode ser testada *in vitro* e/ou *in vivo* em vários ensaios ou sistemas de modelo animal adequados para a sua actividade.

Uma formulação líquida da presente invenção para tratar, ferir, prevenir, ou melhorar uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas pode ser testada quanto à sua capacidade de inibir a replicação viral ou reduzir a carga viral em ensaios *in vitro*. Por exemplo, a replicação

viral pode ser ensaiada através de um ensaio por placa tal como descrito, e.g., por Johnson et al., 1997, *Journal of Infectious Diseases* 176:1215-1224. Uma formulação líquida da invenção administrada de acordo com os métodos da invenção pode ser também ensaiada quanto à sua capacidade para inibir ou regular negativamente a expressão de polipéptidos virais. As técnicas conhecidas dos especialistas da técnica, incluindo, mas não se limitando a, análise de transferência de western, análise de transferência de northern, e RT-PCR podem ser utilizadas para medir a expressão de polipéptidos virais e/ou títulos virais.

Uma formulação líquida da invenção pode ser testada em sistemas de modelo animal adequados antes da utilização em humanos. Estes sistemas de modelo animal incluem, mas não estão limitados a, ratos, murganhos, frangos, vacas, macacos, porcos, cães, coelhos, etc. qualquer sistema animal bem conhecido na técnica pode ser utilizado. Alguns aspectos do procedimento podem variar; os referidos aspectos incluem, mas não estão limitados a, regime temporal de administração de terapias (e.g., agentes profilácticos e/ou terapêuticos) se estas terapias são administradas separadamente ou como uma mistura, e a frequência de administração das terapias.

Os modelos animais podem ser utilizados para avaliar a eficácia dos métodos da invenção para tratar, gerir, prevenir, ou melhorar a infecção por RSV ou um ou

mais dos seus sintomas. Os modelos animais para infecção por RSV incluem, mas não estão limitados aos, 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, aos ratos de algodão é administrada uma formulação líquida compreendendo SYNAGIS® de acordo com os métodos da invenção, são expostos com 10^5 pfu de RSV, e quatro ou mais dias mais tarde, os ratos são sacrificados e é determinado o título de RSV e SYNAGIS® no soro. De acordo com o exposto, uma dosagem que resulta numa diminuição de 2 log ou uma redução de 99% no título de RSV no rato do algodão exposto a 10^5 pfu de RSV em relação ao rato do algodão exposto a 10^5 pfu de RSV mas a que não foi administrada a formulação, é a dosagem de uma formulação que pode ser administrada a um humano para o tratamento, prevenção ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Além disso, nesta forma de realização, os tecidos (e.g., os tecidos de pulmão) dos ratos sacrificados podem ser examinados para alterações histológicas.

A administração de uma formulação líquida da invenção de acordo com os métodos da presente invenção pode ser testada quanto à sua capacidade de diminuir o tempo de duração 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 da invenção 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 de reduzir o período de hospitalização de um humano que sofre de infecção por RSV em pelo menos 60%, preferencialmente pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 95%, ou pelo menos 99%. As técnicas conhecidas dos especialistas na técnica podem ser utilizadas para analisar a função de uma formulação líquida da invenção *in vivo*.

Além disso, qualquer ensaio *in vitro* ou *in vivo* conhecido pelos especialistas da técnica pode ser utilizado para avaliar a utilidade profiláctica e/ou terapêutica de uma formulação líquida da invenção aqui revelada para uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas.

5.8.3 Ensaios de Toxicidade

A toxicidade e/ou eficácia dos protocolos profilácticos e/ou terapêuticos da presente invenção podem ser determinados pelos procedimentos farmacêuticos convencionais em culturas de células ou animais experimentais, e.g., para determinação de LD₅₀ (a dose letal para 50% da população) e a ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A proporção de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice

terapêutico e isso pode ser expresso como a proporção LD₅₀/ED₅₀. São preferidas as terapias que exibem grandes índices terapêuticos. Embora as terapias exibam efeitos tóxicos colaterais possam ser utilizadas, deve ser tido cuidado para conceber um sistema de distribuição que direccione estes agentes para o sítio de tecido afectado de modo a minimizar os potenciais danos em células não infectadas e, deste modo, reduzir os efeitos colaterais.

Os dados obtidos a partir dos ensaios em células em cultura e estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma vasta dosagem dos agentes profilácticos e/ou terapêuticos para utilização em humanos. A dosagem destes agentes está preferencialmente num intervalo de concentrações circulantes que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar neste intervalo dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada. Para qualquer terapia utilizada no método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimado inicialmente a partir de ensaios em células em cultura. Pode ser formulada uma dose em modelos animais para conseguir uma concentração circulante no plasma no intervalo que inclui a IC₅₀ (*i. e.*, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição dos sintomas de metade em relação ao máximo) como determinado em cultura de células. Esta informação pode ser utilizada para determinar com mais precisão doses úteis em humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de elevado desempenho.

5.9 Kits

A invenção proporciona uma embalagem ou kit farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com uma formulação líquida da invenção para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas. Numa forma de realização específica, as formulações líquidas da invenção compreendem SYNAGIS® ou um seu fragmento de ligação a antigénio recombinantemente fundido ou quimicamente conjugado com outra unidade, incluindo mas não se limitando a, uma proteína heteróloga, um polipéptido heterólogo, a péptido heterólogo, uma molécula grande, uma molécula pequena, uma sequência marcadora, um agente de diagnóstico ou detetável, uma unidade terapêutica, uma unidade de fármaco, um ião metálico radioactivo, um segundo anticorpo, e um suporte sólido.

A presente invenção proporciona kits que podem ser utilizados nos métodos acima. Numa forma de realização, um kit compreende uma formulação líquida da invenção, em um ou mais recipientes. Em outra forma de realização, um kit compreende uma formulação líquida da invenção, em um ou mais recipientes, e um ou mais outros agentes profilácticos ou terapêuticos úteis para a prevenção, gestão ou tratamento de uma infecção por RSV ou um ou mais dos seus sintomas, em um ou mais outros recipientes. Preferencialmente, o kit compreende ainda instruções para prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma infecção por RSV (e.g., utilizando as formulações líquidas da invenção

isoladamente ou em combinação com outro agente profiláctico ou terapêutico), assim como os efeitos colaterais e informação de dosagem para o método de administração. Opcionalmente associados com este(s) recipiente(s) pode estar uma nota na forma prescrita por uma agência governamental que regula a preparação, utilização ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, nota essa que reflecte a aprovação pela agência da preparação, utilização ou venda para administração em humanos.

6. EXEMPLOS

6.1 Exemplo 1 (Estudo de Estabilidade)

Uma formulação de anticorpo da presente invenção compreendendo, num veículo aquoso, 25 mM de histidina, 1,6 mM de glicina, e SYNAGIS® a pH 6 foi preparada de acordo com o protocolo seguinte: Para 1 kg de solução de tampão: Em 800 g de água, foram dissolvidos 3,875 g de histidina (base livre) e 0,12 g de glicina. O pH foi ajustado com 6 N de HCl a $6,0 \pm 0,2$. Foi adicionada água para trazer a massa total até 1,0 kg (qb). Para a diafiltração: após os passos de cromatografia no processo de purificação o NAGIS® foi concentrado para um alvo de 150 g/L. O produto concentrado é diafiltrado na formulação tampão. O produto formulado foi diluído para uma concentração de preparação alvo de 103 ± 3 g/L. Para um estudo de estabilidade, foram preparadas duas formulações: uma continha 105 mg/mL de SYNAGIS® e a outra continha 160 mg/mL de SYNAGIS®. A estabilidade de cada formulação

foi medida utilizando HPSEC em termos de graus de formação de agregado e fragmentação durante o armazenamento a 2-8 °C até aos 15 meses e a 38-42°C 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 utilizada a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. Uma amostra contendo 250 mg de proteína num volume apropriado é injectada na coluna e os picos de proteína são detectados por UV a 280 nm e/ou fluorescência (280 nm de excitação e 340 nm de emissão).

Os dados mostram que não existe aumento detectável na agregação quando cada formulação de SYNAGIS® foi armazenada a 2-8°C durante 15 meses como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Percentagem de Agregados durante Armazenamento a 2-8 °C.

| Mês | % de 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 |
| ±0,1% erro. | | |

Quando as formulações foram armazenadas a 38-42 °C durante 60 dias, cerca de 1,5% de aumento em

agregado foi observado com uma formulação contendo 10^5 mg/mL de SYNAGIS® e 2,0% de aumento foi observado com uma 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 a segurança e estudo de tolerabilidade num estudo de Fase I, grupo paralelo, duplamente cego, aleatório em dois locais. Os fármacos em estudo são uma formulação líquida de SYNAGIS® (Liq) e uma formulação de SYNAGIS® liofilizada (Lyo) normalmente licenciada. Um total de 48 voluntários será aleatoriamente seleccionado para um a quatro grupos de tratamento:

| | | |
|----------|------|--|
| GRUPO 1: | N=12 | 3 mg/kg de SYNAGIS® (Liq) nos Dias de Estudo 0 e 30 (IM) |
| GRUPO 2: | N=12 | 3 mg/kg de SYNAGIS® (Lyo) nos Dias de Estudo 0 e 30 (IM) |
| GRUPO 3: | N=12 | 15 mg/kg de SYNAGIS®(Liq) nos Dia de Estudo 0 (IV) |
| GRUPO 4: | N=12 | 15 mg/kg de SYNAGIS®(Lyo) nos Dia de Estudo 0 (IV) |

Os sinais vitais serão obtidos antes e 30 minutos após cada dose do fármaco em estudo. Os eventos adversos serão monitorizados ao longo de 30 dias após a última dose do fármaco em estudo e os eventos adversos graves serão monitorizados até ao Dia de Estudo 60.

No Dia de Estudo 0, todos os voluntários terão colheita de sangue para a concentração de SYNAGIS® no soro antes da dosagem, no final da infusão (apenas grupos de

dose IV), e a 0,25, 0,5, 1, 4, 8, e 12 horas após injecção IM ou no final da infusão. Subsequentemente, as amostras de sangue para determinação do nível de SYNAGIS®s serão recolhidas diariamente apesar do Dia de Estudo 5 e dos Dias de Estudo 7, 14, 21, 30, 37 (apenas grupos IM), e 60. as amostras de soro para anticorpos anti-SYNAGIS® serão colhidas nos Dias de Estudo 0, 7, 14, 21, 30, 37 (apenas grupos IM), e 60. As amostras para química do soro e CBC com diferencial e plaquetas, e amostras de urina para urinálise serão colhidas no Dia de Estudo 0 assim como 7 dias após cada dose de SYNAGIS® (Dia de Estudo 7 para os grupos IV e Dia de Estudos 7 e 37 para os grupos IM). Os testes de β HCG na urina serão efectuadas no dia de dosagem antes de cada dose de SYNAGIS® (Dia de Estudo 0 para os grupos IV e Dia de Estudos 0 e 30 para os grupos IM). É apresentado um diagrama de fluxo do estudo na Fig. 2.

6.2.1 Procedimentos do Estudo

A. Selecção de Voluntários

Os voluntários neste estudo serão adultos masculinos ou femininos. O voluntário será aconselhado por um investigador (médico) que lhe apresentará as questões e preocupações do voluntário e assegurará o consentimento informado escrito para participação no estudo. O consentimento informado escrito será obtido antes da condução dos procedimentos do estudo ou administração de fármaco em estudo.

a. Critérios de Inclusão

Os voluntários devem preencher *todos* os critérios seguintes:

1. Masculino ou feminino.
2. Idade de 18 aos 49 anos na altura da primeira dose do fármaco em estudo.
3. Peso ≤ 150 kg.
4. Consentimento informado escrito obtido do voluntário.
5. Em mulheres sexualmente activas, a menos que cirurgicamente estéreis, deve ser utilizado um método eficaz de evitar a gravidez (incluindo contraceptivos orais ou implantados, IUD, preservativo feminino, diafragma com espermicida, protecção cervical, abstinência, utilização de um preservativo pelo parceiro sexual ou parceiro sexual estéril) durante 14 dias antes da primeira dose do fármaco em estudo, deve concordar em continuar a utilizar estas precauções durante 30 dias após a dose final de fármaco em estudo, e devem ter um teste de gravidez de soro negativo em 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 acompanhamento de 60 dias conforme requerido pelo protocolo.

b. Critérios de Exclusão

Os voluntários não devem 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 fármaco nos 7 dias antes do Dia de Estudo 0 (excepto para contraceptivos)
4. Doação de sangue com excesso de 400 mL no início dos 6 meses de estudo
5. Recepção de imunoglobulina ou produtos do sangue nos 60 dias antes da entrada no estudo
6. Recepção de qualquer terapia de fármaco em investigação ou vacina convencional 120 dias antes da primeira dose do fármaco em estudo neste protocolo ao longo de 60 dias após a dose final do fármaco em estudo
7. História de imunodeficiência
8. História de doença ou reacções alérgicas com probabilidade de serem exacerbadas por qualquer componente do fármaco em estudo
9. História médica anterior ou evidência de uma doença intercorrente que possa comprometer a segurança do voluntário no estudo
10. Evidência de infecção com hepatite A, B, ou C vírus ou HIV-1
11. No rastreio (deve ser dentro de 21 dias antes da entrada no estudo) qualquer dos seguintes: CBC: Hgb < 12,0 gm/dL; WBC < 4 000/mm³; contagem de plaquetas < 120 000/mm³ (ou valores laboratoriais normais); AST, ALT, BUN, creatinina > limite superior ao normal; outros valores laboratoriais anormais no painel de rastreio que, na

opinião do investigador principal são julgados como sendo clinicamente significativos; outros valores laboratoriais anormais no painel de rastreio que, na opinião do investigador principal são julgados como análises potencialmente confusas dos resultados do estudo

12. Mãe enfermeira

13. História de abuso de álcool ou fármaco nos últimos 2 anos

14. Evidência de qualquer doença sistémica no exame físico

B. Selecção aleatória**a. Procedimentos de Selecção Aleatória de Voluntários e Alocação do Tratamento**

Na visita de rastreio, os voluntários serão avaliados pelo investigador principal para assegurar a elegibilidade para entrada no estudo. Será mantido um "master log" para todos os voluntários rastreados. Os voluntários que assinaram um consentimento informado e preencheram os critérios de elegibilidade terão entrada no estudo. Quando um voluntário chega ao sítio do estudo para selecção aleatória (Dia de Estudo 0), o investigador confirmará que o voluntário preenche todos os critérios de inclusão e de exclusão. O investigador assinará então um número de identificação de doente (PID). Os números de identificação do doente serão atribuídos sequencialmente em 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 é assinado o PID. A lista de selecção aleatória proporcionada ao farmacêutico do estudo em cada local de estudo irá conter as atribuições para cada um dos quatro grupos de tratamento de voluntários nesse local. O investigador notificará a MedImmune por transmissão em facsimile (fax) para 301-527-4217 de que um voluntário foi aleatoriamente seleccionado. Os voluntários a quem foi atribuído um PID e não receberam qualquer fármaco em estudo, que receberam uma infusão incompleta do fármaco em estudo, que não receberam injecções IM do fármaco em estudo, ou que não completaram pelo menos 50% das visitas do estudo podem ser substituídos à descrição pelo responsável. Os voluntários que retiraram devido a um evento adverso ou cujo estado não pode ser avaliado não será substituído. Os voluntários que retiraram o consentimento por outras razões para além de um evento adverso podem ser substituídos. Aos voluntários de substituição será atribuído um novo PID. Os voluntários que sejam substituídos continuarão a ser seguidos para segurança de acordo com o protocolo.

b. Cegueira

Este é um estudo duplamente cego. A cegueira será mantida para atribuição de voluntários a formulação liofilizada ou líquida nos grupos IM ou IV. De modo a manter a cegueira durante a administração das duas formulações de SYNAGIS®, o estudo farmacêutico em cada sítio preparará o fármaco em estudo num sítio fisicamente

diferente do da estação de tratamento e escudado da observação do investigador principal ou qualquer pessoal do estudo directamente envolvido na condução do estudo. Para a IM injecção, o farmacêutico preparará seringas de 5 mL de aparência idêntica contendo o volume calculado de SYNAGIS® líquido ou liofilizado reconstituído. Para a infusão IV, o farmacêutico preparará sacos de infusão com aparência idêntica de 200 mL contendo o volume calculado de cada SYNAGIS® líquido ou liofilizado reconstituído. As marcas não identificarão se a seringa/saco contém SYNAGIS® líquido ou liofilizado reconstituído. Um monitor independente que irá apenas rever o registo farmacêutico, o estatístico e o gestor de fornecimentos clínicos em MedImmune e o farmacêutico do estudo no local do estudo são os únicos indivíduos que terão acesso à lista de selecção aleatória que identifica a alocação do tratamento ao voluntário no estudo. Estes indivíduos não devem revelar a informação da selecção aleatória a ninguém. No caso em que o tratamento do estudo para um voluntário se torna conhecido do investigador, a MedImmune deve ser notificada imediatamente pelo investigador. Todos os casos de não cegueira serão documentados no relatório do estudo.

C. Fármaco em Estudo**a. Fornecimento e Contabilidade do Fármaco em Estudo**

O responsável proporcionará ao investigador quantidades adequadas de SYNAGIS® líquido, SYNAGIS®

liofilizado, e diluente (água estéril para injecção). O fármaco em estudo deve ser armazenado a 2 °C a 8 °C (36 °F a 46 °F) e não deve ser congelado.

O SYNAGIS® líquido será proporcionado em 3 mL de frascos contendo 100 mg de produto estéril líquido num volume de 1 mL (25 molécula de histidina, 1,6 mM de glicina, a pH 6,0).

O SYNAGIS® liofilizado será proporcionado em frascos de 5 mL contendo 100 mg de produto estéril liofilizado que quando formulado (antes da liofilização) contém 25 mM de histidina, 1,6 mM de glicina, e 3% (p/v) de manitol a pH 6,0.

O estudo farmacêutico é necessário para manter com precisão a contabilidade dos registos do fármaco. Após a finalização do estudo, todos os registos da contabilidade do fármaco em estudo serão devolvidos ao responsável. Todo o fármaco em estudo não utilizado será devolvido ao responsável.

b. Regimes de Tratamento

São empregues no estudo os seguintes regimes:

| | | |
|----------|------|--|
| GRUPO 1: | N=12 | 3 mg/kg de SYNAGIS® (Liq) aos Dias de Estudo 0 e 30 (IM) |
| GRUPO 2: | N=12 | 3 mg/kg de SYNAGIS® (Lyo) aos Dias de Estudo 0 e 30 (IM) |
| GRUPO 3: | N=12 | 15 mg/kg de SYNAGIS®(Liq) ao Dia de Estudo 0 (IV) |
| GRUPO 4: | N=12 | 15 mg/kg de SYNAGIS®(Lyo) ao Dia de Estudo 0 (IV) |

c. Pedido e Preparação do Fármaco em Estudo

A dose do fármaco em estudo para administração tem de ser preparada pelo farmacêutico do estudo. O formulário de prescrição do fármaco em estudo indicando o PID e o peso corporal do voluntário será enviado ao farmacêutico pelo investigador (ou indicado). O farmacêutico do estudo utilizará então esta informação para preparar o fármaco em estudo.

Para preparar o SYNAGIS® líquido ou liofilizado para administração, o farmacêutico deve remover a porção da tira da tampa do frasco e limpar a rolha de borracha com etanol a 70% ou equivalente. O frasco deve ser ventilado. As doses para cada voluntário serão calculadas como descrito a seguir com base no peso do voluntário (até ao 0,1 quilograma mais próximo) no dia em que o SYNAGIS® é administrado. A dose deve estar arredondada ao 0,1 mL. Todas as preparações de fármaco em estudo devem ser administradas em 6 horas após a abertura do frasco de SYNAGIS®. Se não for administrado em 6 horas deve ser utilizado um novo frasco ou frascos.

Preparação de SYNAGIS® Líquido

(1) Para injecções IM: O volume necessário de SYNAGIS® líquido (100 mg/mL) será obtido por mistura dos conteúdos de tantos frascos quantos os necessários com uma seringa de 5 mL.

Dose (mL)=[Peso do Voluntário (kg) x Nível de Dose (3 mg/kg)] + Concentração do Fármaco (100 mg/mL)

Exemplo: Um voluntário que pesa 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 por mistura dos conteúdos de tantos frascos quantos os necessários com uma seringa de 20 mL (ou maior).

Dose (mL)=[Peso do Voluntário (kg) x Nível de Dose (15 mg/kg)] + Concentração do Fármaco (100 mg/mL)

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

Exemplo: Um voluntário que pesa 71.4 kg recebe 10.7 mL de SYNAGIS®

$$[(71,4 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg}) + 100 \text{ mh/mL} = 10,71 \text{ mL}]$$

(arredondado para 10,7 ml)

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

Preparação de SYNAGIS® liofilizado

(1) Para injecções IM: Um (1) mL de diluente deve ser adicionado lentamente ao frasco de SYNAGIS® liofilizado para uma concentração final de 100 mg/mL SYNAGIS®. O frasco deve ser então suavemente rodado durante 30 segundos para evitar formação de espuma. O SYNAGIS® reconstituído deve repousar à temperatura ambiente durante um mínimo de 20 minutos até que o SYNAGIS® clarifique. O volume necessário de SYNAGIS® liofilizado reconstituído (100 mg/mL) será obtido por mistura dos conteúdos de tantos frascos quantos os necessários com uma seringa de 5 mL.

$$\text{Dose (mL)} = [\text{Peso do Voluntário (kg)} \times \text{Nível de Dose (3 mg/kg)}] + \text{Concentração do Fármaco (100 mg/mL)}$$

Exemplo: Um voluntário que pesa 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: Devem ser adicionados lentamente cinco (5) mL de diluente ao frasco de SYNAGIS® liofilizado para uma concentração final de 20 mg/mL SINAGIS®. O frasco deve ser então suavemente rodado durante 30 segundos para evitar a espuma. O SYNAGIS® reconstituído deve repousar à temperatura ambiente durante um mínimo de

20 minutos até que o SYNAGIS® clarifique. O volume necessário de SYNAGIS® liofilizado reconstituído (20 mg/mL) será obtido por mistura dos conteúdos de tantos frascos quanto os necessários com uma seringa de 20 mL (ou maior) e injecção deste volume num frasco de infusão de 200 mL.

$$\text{Dose (mL)} = [\text{Peso do Voluntário (kg)} \times \text{nível de Dose (15 mg/kg)}] + \text{Concentração do Fármaco (20 mg/mL)}$$

Exemplo: Um voluntário com um peso de 71,4 kg recebe 53,6 mL de SYNAGIS®

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

d. Administração do Fármaco em Estudo

O fármaco em estudo para os grupos de tratamento IM e IV será dispensado pela farmácia em seringas idênticas de 5 mL e sacos idênticos de 200 mL de infusão, respectivamente.

Injecção IM

O fármaco em estudo será administrado através de injecção IM no músculo deltóide (após confirmação de que a agulha não foi inserida num vaso sanguíneo) utilizando uma técnica asséptica convencional. Os voluntários ficarão sob observação no local do estudo durante pelo menos 30 minutos após a injecção.

IV Infusão

Antes da administração do fármaco, será colocado um cateter IV numa veia acessível utilizando técnicas de inserção convencionais. A entrada do cateter IV será mantida por uma infusão contínua IV de 5% de Dextrose para Injecção USP a uma taxa de 10 a 25 mL/h. A infusão de dextrose será interrompida, e o SYNAGIS® será infundido através de um filtro de reduzida ligação a proteínas de 0,22 mm a uma taxa de aproximadamente 1-2 mL/minuto. Após ter sido administrado o SYNAGIS®, a tubagem IV deve ser bombeada e mantida aberta com 5% de Dextrose para Injecção USP a 10 a 25 mL/h até que o cateter IV seja removido.

e. Medicações Concomitantes

Todas as medicações concomitantes utilizadas pelo voluntário desde o Dia de Estudo 0 até ao Dia de Estudo 60 serão registadas no formulário do relatório do caso. Os voluntários não podem receber o seguinte:

1. Medicação Imunosupressora (corticosteróides inalados e tópicos são permitidos).
2. Agentes em investigação desde 120 dias antes da entrada no estudo até ao Dia de Estudo 60.

O responsável deve ser notificado se qualquer

voluntário receber medicações concomitantes proibidas. Os voluntários podem receber medicações para tratar eventos adversos se for considerado necessário pelo investigador ou pelo médico do voluntário.

D. Esquema de Avaliações de Voluntários

Todos os voluntários a quem é atribuído um PID e que recebe qualquer fármaco em estudo será seguido de acordo com o protocolo independente do número de doses do fármaco em estudo recebidas, a menos que o consentimento para o acompanhamento seja retirado. O responsável deve ser notificado de todos os desvios do protocolo das visitas ou avaliações e estas avaliações, se aplicáveis, devem ser replaneadas ou efectuadas no tempo mais próximo possível do esquema original.

Os voluntários serão instruídos para chamar o pessoal do estudo para reportar quaisquer anormalidades durante os intervalos entre as visitas do estudo e deslocar-se até ao local do estudo se for necessária avaliação médica e se a urgência da situação o permitir. Para emergências e outras visitas não incluídas no esquema a uma unidade médica que não seja a do estudo, os registos médicos serão obtidos pelo investigador. É apresentado um esquema de rastreio e de procedimentos de visita do estudo na Tabela 4, seguido por uma descrição detalhada de cada visita.

Tabela 4 Esquema de Avaliação dos Voluntários

| | Scn | Dia de Estudo | | | | | | | | | | | |
|--|-----|---------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----------------|----------------|----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 7 | 14 | 21 | 30 | 37 | 60 |
| Consentimento Informado Escrito | x | | | | | | | | | | | | |
| Verificar os Critérios de Elgibilidade | x | x | | | | | | | | | | | |
| História Médica | x | | | | | | | | | | | | |
| Exame Físico | x | | | | | | | | | | | | |
| Altura e peso corporal | x | x | | | | | | | | | x ^d | | |
| Urinálise | x | x | | | | | | x | | | | x ^d | |
| Hepatite A, B, C | x | | | | | | | | | | | | |
| βHCG ^b no soro | x | | | | | | | | | | | | |
| βHCG ^b na Urina | | x | | | | | | | | | x ^d | | |
| Química do soro ^c | x | x | | | | | | x | | | | x ^d | |
| CBC, Diferencial, Plaquetas | x | x | | | | | | x | | | | x ^d | |
| Nível de SYNAGIS® no Soro | | xa | 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 | | |
| Seleccão aleatória/Atribuição de PID | | x | | | | | | | | | | | |
| Injecção 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. Rastreio

Nota: Todas as verificações do rastreio laboratorial devem ser efectuadas dentro de 21 dias antes da entrada no estudo (Dia de Estudo 0). As avaliações do rastreio podem ser efectuadas ao longo de mais do que uma visita.

1. Consentimento informado escrito
2. Verificar os critérios de elegibilidade
3. Pesquisa da história médica
4. Exame físico de rastreio
5. Altura e peso corporal
6. Urinálise
7. Colheita de sangue para rastreio
 - Soro para anticorpo para a hepatite A, antigénio de superfície da hepatite B, anticorpo para a hepatite C
 - Soro β HCG (apenas voluntários femininos)
 - Painel químico (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas

Dia de Estudo 0: Dose 1**visita 1**

1. Verificar o critério de elegibilidade
2. Altura e peso corporal

3. Urinálise
4. Urine β HCG (apenas voluntários femininos)
5. Colheita de sangue para linha de base
 - Painel químico (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®
6. selecção aleatória e atribuição de PID
7. Sinais vitais antes da administração do fármaco em estudo (temperatura, pressão sanguínea, pulsação, taxa respiratória)

Nota: Todos os acima devem ser finalizados antes da administração do fármaco em estudo.

1. Administração do fármaco em estudo
2. Monitorizar sinais vitais 30 minutos após injecção ou final da infusão
3. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves
4. Colheita de sangue pós-dose
 - Soro para nível de SYNAGIS®s imediatamente após ter terminado a infusão (apenas grupos com dose IV) e a 0,25, 0,5, 1, 4, 8, e 12 horas após injecção/final da infusão

**Dia de Estudo 1: Amostragem Farmacocinética da
Dose 1**

visita 2

1. Colheita de sangue pós-dose para o nível de SYNAGIS® no soro às 24 horas.
2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

**Dia de Estudo 2: Amostragem Farmacocinética da
Dose 1**

visita 3

1. Colheita de sangue pós-dose para o nível de SYNAGIS® no soro às 48 horas.
2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

**Dia de Estudo 3: Amostragem Farmacocinética da
Dose 1**

visita 4

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® no soro às 72 horas
2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

**Dia de Estudo 4: Amostragem Farmacocinética da
Dose 1**

visita 5

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® no soro às 96 horas
2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

**Dia de Estudo 5: Amostragem Farmacocinética da
Dose 1**

visita 6

1. Colheita de sangue pós-dose para nível de SYNAGIS® no soro às 120 h.
2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Dia de Estudo 7:

visita 7

1. Urinálise
2. Colheita de sangue
 - Painel químico (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC com diferencial e contagem de plaquetas

- Soro para nível de SYNAGIS®
- Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®

3. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Dia de Estudo 14±1:

visita 8

1. Colheita de sangue
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®

2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Dia de Estudo 21±1:

visita 9

1. Colheita de sangue
 - Soro para nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®

2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Dia de Estudo 30±1:

visita 10

Todos os voluntários

1. Colheita de sangue

- Soro para nível de SYNAGIS®
- Soro para anticorpo anti-SYNAGIS®

2. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Voluntários nos grupos IM apenas

3. Peso corporal

4. β HCG na Urina

5. Sinais vitais antes da administração de fármaco em estudo

6. Administração do fármaco em estudo

7. Monitorizar sinais vitais 30 minutos após injecção

Dia de Estudo 37±1:

visita 11

Voluntários nos grupos IM apenas

1. Urinálise

2. Colheita de sangue

- Painel químico (AST, ALT, BUN, creatinina)
- CBC com diferencial e contagem de plaquetas
- Soro para o nível de SYNAGIS®
- Soro para o anticorpo anti-SYNAGIS®

3. Monitorizar eventos adversos e eventos adversos graves

Dia de estudo 60±2:**visita 12**

1. Colheita de sangue
 - Soro para o nível de nível de SYNAGIS®
 - Soro para anticorpo anti-SYNAGIS
2. Monitorizar eventos adversos graves

E. Métodos de Avaliação de Voluntários**a. Avaliações Laboratoriais de Rotina**

Os testes laboratoriais de rotina durante o rastreio e durante o estudo serão efectuadas no laboratório clínico local do sítio de cada estudo. Os testes de gravidez com urina durante o estudo serão efectuados no local do estudo utilizando um teste licenciado. Os resultados

laboratoriais anormais deverão ser repetidos tão rapidamente quanto possível (preferencialmente em 24-48 horas).

b. Avaliações Farmacocinéticas e Imunológicas

A concentração de soro SYNAGIS® e anticorpos anti-SYNAGIS® será medida por MedImmune, Inc. por ELISA.

F. Finalização do Estudo e Perda de Acompanhamento

Os voluntários serão considerados como tendo completado o estudo se tiverem sido seguidos até ao Dia de Estudo 60. Deve ser especificado no formulário de relatório se o voluntário completou, ou não, os procedimentos de acompanhamento do estudo até ao Dia 60 do Estudo. Os voluntários serão considerados perdidos para o acompanhamento se não for estabelecido contacto na altura em que o estudo termina uma vez que não existe informação suficiente para determinar o estado do voluntário no Dia 60 do Estudo. O investigador deve documentar as tentativas para restabelecer o contacto com voluntários em falta ao longo do período do estudo. Se o contacto com o voluntário em falta é restabelecido, o acompanhamento deve ser abreviado de acordo com o protocolo. As avaliações farmacocinéticas e imunológicas serão efectuadas com base na concentração de soro SYNAGIS® e anticorpos anti-SYNAGIS® medidos por ELISA.

Equivalentes

Os especialistas na técnica reconhecerão, ou serão capazes de certificar não utilizando mais do que experiências de rotina, muitos equivalentes para as formas de realização específicas da invenção aqui descritas. Pretende-se que estes equivalentes sejam incluídos nas reivindicações que se seguem.

A citação ou discussão de uma destas referências não deve ser interpretada como a admissão de ser anterior à técnica da presente invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MedImmune, Inc.

<120> FORMULAÇÕES LÍQUIDAS ESTABILIZADAS DE ANTICORPO ANTI-RSV
<130> 10271-026-228

<140>

<141>

<150> 60/388,921
<151> 2002-06-14

<160> 6

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
1 S<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 S 10 18

<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

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação aquosa estável de palivizumab compreendendo, num veículo aquoso:

(a) pelo menos 65 mg/mL de palivizumab, ou um seu fragmento de ligação a抗igénio;

(b) 10 mM a 50 mM de histidina; e

(c) menos do que 3 mM de glicina, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igénio de palivizumab da formulação é estável a 38°C - 42°C durante pelo menos 60 dias como determinado por cromatografia de exclusão de tamanho de elevado desempenho (HPSEC).

2. Formulação da reivindicação 1, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igénio de palivizumab está a uma concentração de pelo menos 70 mg/mL, pelo menos 75 mg/mL, pelo menos 80 mg/mL, pelo menos 85 mg/mL ou pelo menos 90 mg/mL.

3. Formulação da reivindicação 1, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igénio de palivizumab, está a uma concentração de pelo menos 80 mg/mL.

4. Formulação da reivindicação 2, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igenio de palivizumab, está a uma concentração de pelo menos 80 mg/mL.

5. Formulação de acordo com qualquer das reivindicações anteriores substancialmente isenta de agente tensioactivos e sais inorgânicos.

6. Formulação de qualquer reivindicação anterior, em que a referida formulação é substancialmente isenta de outros excipientes.

7. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-4, em que a referida formulação comprehende ainda um outro excipiente para além de um agente tensioactivo.

8. Formulação da reivindicação 1, em que a glicina está a uma concentração inferior a 2 mM.

9. Formulação de qualquer reivindicação anterior, em que a formulação não comprehende manitol.

10. Formulação de qualquer reivindicação anterior, em que a histidina está a uma concentração de cerca de 25 mM e a glicina está a uma concentração de 1,6 mM.

11. Formulação da reivindicação 7, em que o excipiente é um sacarídeo.

12. Formulação da reivindicação 11, em que o sacarídeo é sacarose.

13. Formulação da reivindicação 7, em que o excipiente é um poliol para além do manitol.

14. Formulação da reivindicação 13, em que o poliol é polissorbato.

15. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a referida formulação possui um pH entre cerca de 5,5 a cerca de 7,0.

16. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a referida formulação possui um pH entre cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

17. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-14, em que a formulação possui um pH de cerca de 6,0.

18. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab está a uma concentração de pelo menos 100 mg/mL.

19. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-16, em que o referido palivizumab ou fragmento de

ligação ao antigénio de palivizumab está a uma concentração de pelo menos 125 mg/mL ou pelo menos 150 mg/mL.

20. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab é estável a cerca da temperatura ambiente durante pelo menos 1 ano como determinado por HPSEC.

21. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab é estável a 4 °C durante pelo menos 3 anos como determinado por HPSEC.

22. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que menos do que 2% do referido palivizumab ou fragmento de ligação ao antigénio de palivizumab forma um agregado conforme medido por HPSEC.

23. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o veículo aquoso é água destilada.

24. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação é estéril.

25. Formulação de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a formulação é homogénea.

26. Formulação de qualquer uma das reivindica-

ções anteriores, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igénio de palivizumab é conjugado com uma unidade terapêutica.

27. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-25, em que o referido palivizumab ou fragmento de ligação ao抗igénio de palivizumab é conjugado com um agente detectável.

28. Forma farmacêutica de unidade de dosagem compreendendo a formulação de qualquer reivindicação anterior, cuja forma de dosagem é adequada para administração a um humano e está num recipiente adequado.

29. Forma farmacêutica de unidade de dosagem da reivindicação 28, em que a formulação é adequada para administração parentérica a um humano.

30. Forma farmacêutica de unidade de dosagem da reivindicação 28, em que a formulação é adequada para administração subcutânea, intravenosa, intramuscular, ou intranasal.

31. Forma farmacêutica de unidade de dosagem da reivindicação 28, em que a formulação é adequada para administração de aerossol a um humano e está num recipiente adequado.

32. Recipiente selado compreendendo a formulação de qualquer uma das reivindicações 1-27.

33. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-26 para utilização na prevenção de uma infecção por vírus sincicial respiratório (RSV) ou um seu sintoma num indivíduo.

34. Formulação de qualquer uma das reivindicações 1-26 para utilização no tratamento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma num indivíduo.

35. Formulação da reivindicação 27 para utilização no diagnóstico de uma infecção por RSV.

36. Formulação da reivindicação 27 para utilização no diagnóstico de uma infecção por RSV num indivíduo.

37. Formulação da reivindicação 33, 34, ou 36, em que o indivíduo é um humano.

38. Utilização da formulação de qualquer uma das reivindicações 1-26 na preparação de um medicamento para utilização na prevenção de uma infecção por RSV ou de um seu sintoma num indivíduo.

39. Utilização da formulação de qualquer uma das reivindicações 1-26 na preparação de um medicamento para utilização no tratamento de uma infecção por RSV ou de um seu sintoma num indivíduo.

40. Utilização da formulação da reivindicação 27 na preparação de um medicamento para utilização no diagnóstico de uma infecção por RSV.

41. Utilização da formulação da reivindicação 27 na preparação de um medicamento para utilização no diagnóstico de uma infecção por RSV num indivíduo.

42. Utilização da formulação da reivindicação 38, 39 ou 41, em que o indivíduo é um humano.

43. Formulação da reivindicação 33 ou 34, em que o indivíduo é um bebé humano, um bebé humano nascido prematuramente, um humano idoso, um humano com fibrose quística, displasia broncopulmonar, doença congénita do coração, imunodeficiência congénita ou imunodeficiência adquirida, ou um humano que sofreu um transplante de medula óssea.

44. Utilização de uma formulação da reivindicação 38 ou 39, em que o indivíduo é um bebé humano, um bebé humano nascido prematuramente, um humano idoso, um humano com fibrose quística, displasia broncopulmonar, doença congénita do coração, imunodeficiência congénita ou imunodeficiência adquirida, ou um humano que sofreu um transplante de medula óssea.

45. Formulação da reivindicação 33 para utilização na prevenção de uma infecção por RSV ou um seu sintoma antes ou durante a temporada de RSV.

46. Formulação da reivindicação 34 para utilização no tratamento de uma infecção por RSV ou um seu sintoma antes ou durante a temporada de RSV.

Lisboa, 28 de Outubro de 2010

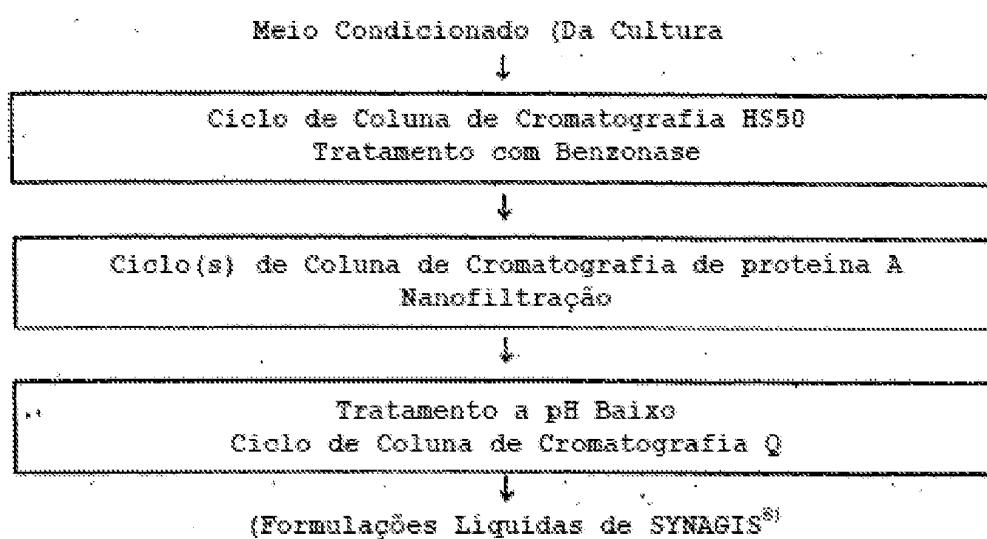


Fig. 1

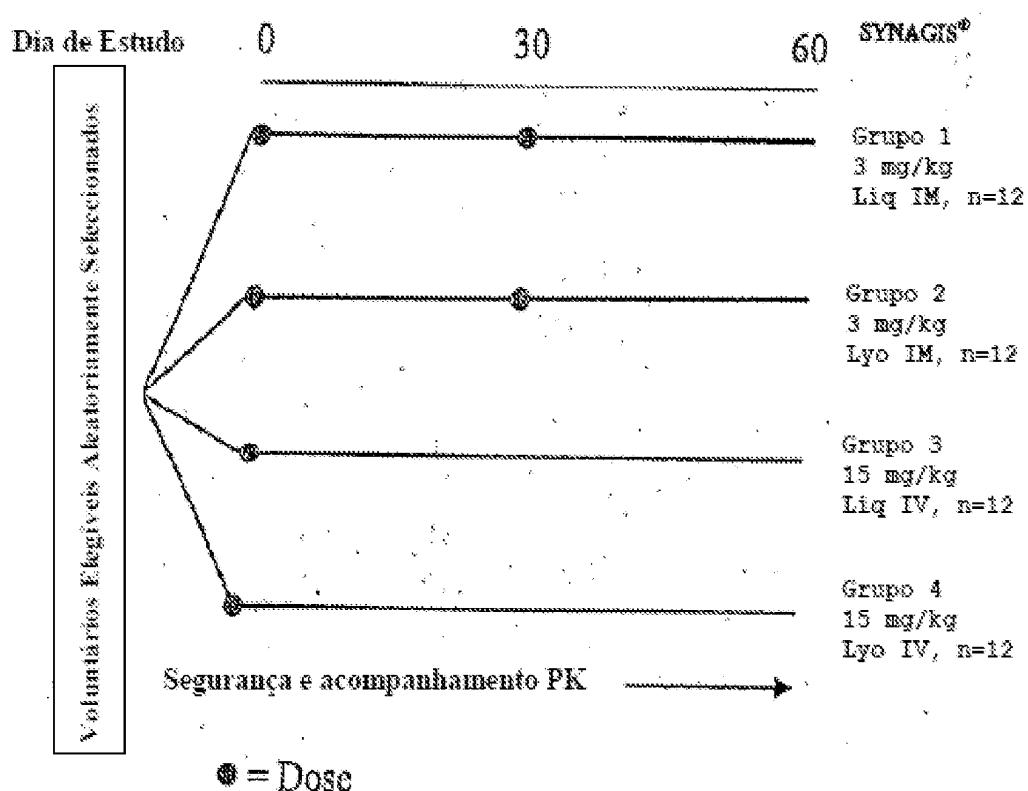


Fig. 2