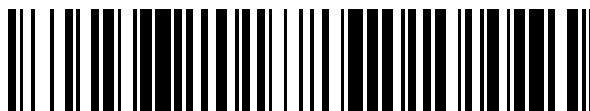


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 039**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2003** **E 10002191 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015** **EP 2206516**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos anti-RSV líquidas estabilizadas**

30 Prioridad:

14.06.2002 US 388921 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.06.2015

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**OLIVER, CYNTHIA N.;
SHANE, ERICA;
ISSAACS, BENJAMIN S.;
ALLAN, CHRISTIAN B. y
CHANG, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 039 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de anticuerpos anti-RSV líquidas estabilizadas

5 1. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere a procesos para preparar formulaciones líquidas de palivizumab® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, formulaciones que presentan estabilidad, niveles de bajos a indetectables de fragmentación de anticuerpos, niveles de bajos a indetectables de agregación, y de muy poca a ninguna pérdida de actividad biológica (por ejemplo, eficacia terapéutica) de palivizumab® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, incluso durante o después de largos periodos de almacenamiento. En particular, la presente invención se refiere a procesos para preparar formulaciones líquidas de palivizumab® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, formulaciones que están sustancialmente libres de tensioactivo y/o sales inorgánicas. También se desvelan métodos para prevenir, tratar o mejorar síntomas asociados a una infección por el virus respiratorio sincitial (RSV) utilizando formulaciones líquidas de palivizumab® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El virus respiratorio sincitial (RSV) es una causa frecuente de la grave enfermedad de las vías respiratorias inferiores en lactantes y niños (Feigen et al., eds., 1987, en: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, WB Saunders, Philadelphia en las páginas 1653-1675; New Vaccine Development, Establishing Priorities, Vol. 1, 1985, National Academy Press, Washington DC en las páginas 397-409; y Ruuskanen et al., 1993, Curr. Probl. Pediatr. 23:50-79). La naturaleza epidémica anual de la infección por el RSV es evidente en el mundo, pero la incidencia y gravedad de la enfermedad del RSV en una estación dada varían por región (Hall, C.B., 1993, Contemp. Pediatr. 10:92-110). En regiones templadas del hemisferio norte, normalmente empieza a finales del otoño y termina a finales de la primavera (Hall, C.B., 1995, en: Mandell G.L., Bernnett J.E., Dolin R., eds., 1995, Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed., Churchill Livingstone, New York en las páginas 1501-1519). Se estima que la enfermedad del RSV produce 90.000 hospitalizaciones y produce 4.500 muertes anualmente en los Estados Unidos. La infección por el RSV primaria se produce casi siempre en niños de 6 semanas a 2 años de edad y es poco común en las 4 primeras semanas de vida durante la epidemia nosocomial (Hall et al., 1979, New Engl. J. Med. 300:393-396). Se estima que el RSV produce nada menos que el 75 % de todas las bronquiolitis infantiles y hasta el 40 % de todas las neumonías pediátricas (Cunningham, C.K. et al., 1991, Pediatrics 88:527-532). Los niños con alto riesgo de infección por el RSV incluyen prematuros (Hall et al., 1979, New Engl. J. Med. 300:393-396) y niños con displasia broncopulmonar (Groothuis et al., 1988, Pediatrics 82:199-203), enfermedad cardíaca congénita (MacDonald et al., New Engl. J. Med. 307:397-400), inmunodeficiencia congénita o adquirida (Ogra et al., 1988, Pediatr. Infect. Dis. J. 7:246-249; y Pohl et al., 1992, J. Infect. Dis. 165:166-169) y fibrosis quística (Abman et al., 1988, J. Pediatr. 113:826-830). La tasa de letalidad en lactantes con enfermedad cardíaca o pulmonar que se hospitalizan con infección por el RSV es del 3 %-4 % (Navas et al., 1992, J. Pediatr. 121:348-354).

El RSV infecta a adultos, además de a lactantes y niños. En adultos sanos, el RSV produce predominantemente enfermedad de las vías respiratorias superiores. Recientemente se ha hecho evidente que algunos adultos, especialmente los ancianos, tienen infecciones sintomáticas por el RSV más frecuentemente de lo que se había informado previamente (Evans, A.S., eds., 1989, Viral Infections of Humans. Epidemiology and Control, 3rd ed., Plenum Medical Book, New York en las páginas 525-544). También se ha informado de varias epidemias entre pacientes en residencias de ancianos y adultos jóvenes internados (Falsey, A.R., 1991, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12:602-608; y Garvie et al., 1980, Br. Med. J. 281:1253-1254). Finalmente, el RSV puede producir grave enfermedad en personas inmunodeprimidas, particularmente pacientes con trasplante de médula ósea (Hertz et al., 1989, Medicina 68:269-281).

Las opciones de tratamiento para la enfermedad por el RSV establecida están limitadas. La enfermedad por el RSV grave de las vías respiratorias inferiores frecuentemente requiere cuidado de apoyo considerable, que incluye administración de oxígeno humidificado y asistencia respiratoria (Fields et al., eds, 1990, Fields Virology, 2nd ed., Vol. 1, Raven Press, New York en las páginas 1045-1072). El único fármaco autorizado para el tratamiento de infección es el agente antiviral ribavirina (American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, 1993, Pediatrics 92:501-504). Se ha mostrado que es eficaz en el tratamiento de neumonía y bronquiolitis por el RSV, modificando el curso de la enfermedad por el RSV grave en niños inmunocompetentes (Smith et al., 1991, New Engl. J. Med. 325:24-29). Sin embargo, la ribavirina tiene varias limitaciones que incluyen alto coste, necesidad de administración prolongada de aerosoles y posible riesgo para mujeres embarazadas, además de para el personal sanitario expuesto. The American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases revisó su recomendación para el uso de ribavirina. La presente recomendación es que la decisión de usar ribavirina debe basarse en las circunstancias clínicas particulares y la experiencia del médico (American Academy of Pediatrics. Summaries of Infectious Diseases, en: Pickering L.K., ed., 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed., Elk Grove Village, IL, American Academy of Pediatrics, 2000, pp. 483-487).

Aunque una vacuna podría prevenir la infección por el RSV, todavía no se ha autorizado ninguna para esta indicación. Un obstáculo importante para el desarrollo de vacunas es la seguridad. Una vacuna inactivada con

formalina, aunque es inmunogénica, causó inesperadamente una mayor incidencia y más grave de enfermedad de las vías respiratorias inferiores debido a RSV en lactantes inmunizados que en lactantes inmunizados con una vacuna paragripal trivalente similarmente preparada (Kim et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:422-434; y Kapikian et al., 1969, Am. J. Epidemiol. 89:405-421). Se han abandonado varios candidatos a vacunas para el RSV y otros están en desarrollo (Murphy et al., 1994, Virus Res. 32:13-36), pero aunque se resuelven las cuestiones de seguridad, también debe mejorarse la eficacia de las vacunas. Quedan por resolver varios problemas. Se requeriría inmunización en el periodo neonatal inmediato, ya que la incidencia máxima de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores se produce a los 2-5 meses de edad. Cabe esperar que la inmadurez de la respuesta inmunitaria neonatal, junto con altos títulos de anticuerpo para RSV maternamente adquiridos, reduzca la inmunogenicidad de la vacuna en el periodo neonatal (Murphy et al., 1988, J. Virol. 62:3907-3910; y Murphy et al., 1991, Vaccine 9:185-189). Finalmente, la infección y enfermedad primaria por el RSV no protegen bien contra la posterior enfermedad por el RSV (Henderson et al., 1979, New Engl. J. Med. 300:530-534).

Actualmente, el único enfoque aprobado para la profilaxis de la enfermedad por el RSV es la inmunización pasiva. La prueba inicial que sugiere una función protectora para la IgG se obtuvo de observaciones que implican anticuerpos maternos en hurones (Prince, G.A., Ph.D. diss., University of California, Los Ángeles, 1975) y seres humanos (Lambrecht et al., 1976, J. Infect. Dis. 134:211-217; y 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 en las páginas 285-294) reconocieron la posible utilidad de anticuerpo para RSV en el tratamiento o prevención de la infección por el RSV durante estudios que involucran la farmacocinética de una inmunoglobulina intravenosa (IVIG) en recién nacidos que se sospecha que tienen septicemia neonatal. Observaron que un lactante, cuyas secreciones respiratorias dieron RSV, se recuperó rápidamente después de la infusión de IVIG. El análisis posterior del grupo de IVIG reveló un título anormalmente alto de anticuerpo neutralizante para RSV. Este mismo grupo de investigadores examinó entonces la capacidad del suero hiperinmune o inmunoglobulina, enriquecida en anticuerpo neutralizante para RSV, para proteger ratas del algodón y primates contra la infección por el 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; y Prince et al., 1985, J. Virol. 55:517-520). Los resultados de estos estudios sugirieron que el anticuerpo neutralizante para RSV administrado profilácticamente inhibió la replicación de las vías respiratorias del RSV en ratas del algodón. Cuando se administra terapéuticamente, el anticuerpo para RSV redujo la replicación viral pulmonar tanto en ratas del algodón como en un modelo de primate no humano. Además, la infusión pasiva de suero inmune o inmunoglobulina no produjo potenciamiento de la patología pulmonar en ratas del algodón posteriormente expuestas al RSV.

Se ha autorizado un anticuerpo humanizado dirigido a un epítipo en el sitio antigénico A de la proteína F de RSV, SYNAGIS®, que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) pesadas variables (VH) que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1-3 y CDR ligeras variables (VL) que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 4-6, para administración intramuscular a pacientes pediátricos para la prevención de enfermedad grave de las vías respiratorias inferiores producida por RSV a dosis mensuales recomendadas de 15 mg/kg de peso corporal durante toda la estación del RSV (noviembre a abril en el hemisferio norte). SYNAGIS® es un material compuesto de secuencias de anticuerpos humanos (95 %) y murinos (5 %). Véanse Johnson et al., 1997, J. Infect. Diseases 176:1215-1224 y la patente de EE.UU. n° 5.824.307. La secuencia de la cadena pesada humana se derivó de los dominios constantes de IgG₁ humana y las región estructurales variables de los genes VH de Cor (Press et al., 1970, Biochem. J. 117:641-660) y Cess (Takashi et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:194-198). La secuencia de la cadena ligera humana se derivó del dominio constante de C6 y las regiones estructurales variables del gen VL K104 con J6-4 (Bentley et al., 1980, Nature 288:5194-5198). Las secuencias murinas se derivaron de un anticuerpo monoclonal murino, Mab 1129 (Beeler et al., 1989, J. Virology 63:2941-2950), en un proceso que implicó el injerto de las regiones determinantes de la complementariedad murinas en las regiones estructurales del anticuerpo humano.

SYNAGIS® tiene alta actividad específica contra RSV *in vitro* (aproximadamente 50-100 veces la de RespiGam®) y se sabe que neutraliza una amplia gama de cepas aisladas del RSV. Como no se derivada de plasma humano, el tratamiento profiláctico con SYNAGIS® no conlleva el posible riesgo de transmisión de patógenos transmitidos por la sangre.

SYNAGIS® se formuló inicialmente como un líquido para uso IV, a una concentración de 10 mg/ml de SYNAGIS® en solución salina tamponada con fosfato. Se produjo después una formulación liofilizada de SYNAGIS®, que permite una mayor concentración (100 mg/ml después de la reconstitución, en histidina 50 mM y tampón glicina 3,2 mM con 6 % (peso/volumen) de manitol a pH 6,0) del anticuerpo que esta formulación líquida inicial, para permitir uso intramuscular. La formulación liofilizada de SYNAGIS® se prepara liofilizando SYNAGIS® a 54 mg/ml en una disolución acuosa que contiene histidina 25 mM, glicina 1,6 mM y 3 % (peso/volumen) de manitol a pH 6,0. La formulación líquida inicial en PBS y la formulación liofilizada de SYNAGIS® se han probado en estudios clínicos de fase I en adultos sanos. La formulación liofilizada se probó en estudios de fase I a fase IV en pacientes pediátricos. Se encuentra que SYNAGIS®, a dosis de 15 mg/kg a 30 mg/kg, es bien tolerado para adultos y se encuentra que 15 mg/kg para niños es seguro y eficaz para la profilaxis del RSV. La formulación liofilizada fue autorizada en 1998 por la FDA para su uso en la prevención de la enfermedad grave de las vías respiratorias inferiores producida por RSV en niños en alto riesgo de enfermedad por el RSV.

Sin embargo, la formulación liofilizada tiene varias limitaciones, que incluyen un prolongado proceso para la liofilización y alto coste resultante para la fabricación. Además, la formulación liofilizada tiene que reconstituirse asépticamente y con precisión por profesionales sanitarios antes de administrarse a pacientes. La propia etapa de reconstitución requiere ciertos procedimientos específicos: (1) se añade un diluyente estéril (es decir, agua o 5 % de dextrosa en agua para administración intravenosa y agua para administración intramuscular) al vial que contiene SYNAGIS[®] liofilizado, lentamente y asépticamente, y el vial debe rodarse muy suavemente durante 30 segundos para evitar la espumación; (2) el SYNAGIS[®] reconstituido necesita reposar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos hasta que la disolución se clarifique; y (3) la preparación reconstituida debe administrarse en el plazo de seis (6) horas después de la reconstitución. Tal procedimiento de reconstitución es engorroso y la limitación del tiempo después de la reconstitución puede producir un gran inconveniente en administrar la formulación a pacientes, conduciendo a desechos significativos, si no se reconstituye apropiadamente o si la dosis reconstituida no se usa en el plazo de seis (6) horas y debe desecharse.

Así, existe la necesidad de una formulación líquida de SYNAGIS[®] a una concentración comparable a o superior a la formulación liofilizada reconstituida de manera que no haya necesidad de reconstituir la formulación antes de la administración. Esto permite a los profesionales sanitarios una administración mucho más rápida y más fácil de SYNAGIS[®] a un paciente.

Las preparaciones de anticuerpo líquidas previas tienen cortas estabilidades en almacén y pueden perder la actividad biológica de los anticuerpos resultantes de inestabilidades químicas y físicas durante el almacenamiento. La inestabilidad química puede producirse por desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambio de disulfuros, y la inestabilidad física puede producirse por desnaturalización del anticuerpo, agregación, precipitación o adsorción. Entre aquellas, la agregación, desamidación y oxidación son conocidas por ser las causas más comunes de degradación del anticuerpo (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). Así, existe la necesidad de una formulación líquida estable de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo eficaz para prevenir la infección por el RSV.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de un proceso para la preparación de formulaciones líquidas de alta concentración de palivizumab (SYNAGIS[®]) o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1. Las formulaciones presentan, en ausencia de tensioactivo, sales inorgánicas y/u otros excipientes, estabilidad, niveles de bajos a indetectables de fragmentación y/o agregación de anticuerpos, y de muy poca a ninguna pérdida de la(s) actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo durante la fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones líquidas preparadas por el proceso de la presente invención facilitan la administración de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control y/o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. En particular, las formulaciones líquidas preparadas por el proceso de la presente invención permiten a un profesional sanitario administrar rápidamente una dosificación estéril de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo sin tener que reconstituir con exactitud y asépticamente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo antes de la administración según se requiera para la forma liofilizada de dosificación. Tales formulaciones líquidas de SYNAGIS[®] también pueden fabricarse más fácilmente y más rentablemente que la formulación liofilizada, ya que las formulaciones líquidas no requieren una etapa de secado prolongada, tal como liofilización, secado por congelación, etc. Las formulaciones líquidas se preparan por un proceso en el que el anticuerpo que se formula está en una fase acuosa durante todo el proceso de purificación y de formulación. Preferentemente, las formulaciones líquidas se preparan por un proceso que no incluye una etapa de secado, por ejemplo, pero no a modo de limitación, una etapa de liofilización, secado por congelación, secado por pulverización o secado al aire.

Las formulaciones líquidas de SYNAGIS[®], o un fragmento de unión al antígeno del mismo, sustancialmente libres de tensioactivo, sales inorgánicas, azúcares, y/u otros excipientes comunes, pueden comprender histidina y una concentración de aproximadamente 15 mg/ml o mayor de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Opcionalmente, la formulación puede comprender además glicina. Alternativamente, la formulación puede comprender además otros excipientes comunes, tales como sacáridos, polioles y aminoácidos, que incluyen, pero no se limitan a, arginina, lisina y metionina. La presente invención también proporciona formulaciones líquidas sustancialmente libres de tensioactivo, sales inorgánicas, azúcares y/u otros excipientes comúnmente conocidos, teniendo dicha formulación un pH que oscila de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, preferentemente aproximadamente 5,5 a 6,5, más preferentemente aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, y lo más preferentemente aproximadamente 6,0, y que comprenden histidina y una concentración de aproximadamente 15 mg/ml o mayor de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Las formulaciones líquidas estables de SYNAGIS[®] pueden presentar niveles de bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación del anticuerpo con de muy poca a ninguna pérdida de actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo durante la fabricación, preparación, transporte y largos periodos de almacenamiento. Las formulaciones líquidas estables de formas modificadas de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo pueden tener elevadas semividas *in vivo* con respecto a SYNAGIS[®] sin modificar o un

fragmento de unión al antígeno del mismo, presentando dichas formulaciones niveles de bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación del anticuerpo, y de muy poca a ninguna pérdida de actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Las formulaciones líquidas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo pueden tener estabilidad a 38 °C-42 °C como se evalúa por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). Las formulaciones líquidas pueden presentar estabilidad, como se evalúa por HSPEC, a los intervalos de temperatura de 38 °C-42 °C durante al menos 60 días (en realizaciones específicas no más de 120 días), de 20 °C-24 °C durante al menos 1 año y de 2 °C-8 °C durante al menos 3 años. Las formulaciones líquidas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo pueden tener agregación de baja a indetectable como se mide por HPSEC. En una realización preferida, las formulaciones líquidas de la presente invención presentan estabilidad a 38 °C-42 °C durante al menos 60 días y presentan niveles de bajos a indetectables de agregación del anticuerpo como se mide por HPSEC, y además, presentan de muy poca a ninguna pérdida de actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en comparación con los anticuerpos de referencia como se mide por ensayos de unión al anticuerpo tales como, por ejemplo, ELISA.

La presente invención proporciona métodos para preparar formulaciones líquidas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1. Las formulaciones líquidas de la presente invención se preparan manteniendo SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en una disolución acuosa en cualquier momento durante la preparación. En otras palabras, las formulaciones líquidas se preparan sin implicar ninguna etapa de secado de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo o las propias formulaciones por, por ejemplo, liofilización, secado a vacío, etc.

Los métodos para preparar formulaciones líquidas de SYNAGIS®, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, pueden comprender concentrar una fracción de SYNAGIS® purificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo a una concentración final de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml, usando una membrana semipermeable con un corte de peso molecular (MW) apropiado (por ejemplo, 30 kD de corte para SYNAGIS® y fragmentos F(ab')₂ del mismo; y 10 kD de corte para fragmentos de SYNAGIS® tales como fragmentos Fab), y diafiltrar la fracción de anticuerpo concentrado en el tampón de formulación usando la misma membrana. El tampón de formulación puede comprender histidina a una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 23 mM a aproximadamente 27 mM, y es lo más preferentemente aproximadamente 25 mM. Para obtener un pH apropiado para SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo es preferible que la histidina (y la glicina, si se añade) se disuelva primero en agua para obtener una disolución de tampón con pH superior al pH deseado y luego el pH se disminuye al nivel deseado mediante la adición de HCl. De esta forma puede evitarse la formación de sales inorgánicas (por ejemplo, formación de NaCl cuando se usa, por ejemplo, clorhidrato de histidina como fuente de histidina y el pH se eleva al nivel deseado mediante la adición de NaOH).

Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por esterilización por filtración usando un filtro de 0,2 µ o 0,22 µ. Las formulaciones líquidas esterilizadas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a una infección por el RSV o un síntoma de la misma.

Los kits pueden comprender las formulaciones líquidas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso por, por ejemplo, un profesional sanitario. Métodos para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma pueden comprender administrar las formulaciones líquidas de la presente invención.

3.1 Terminología

Como se usa en el presente documento, todas las formulaciones líquidas de SYNAGIS® y/o fragmentos del mismo que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno del RSV descrito anteriormente se denominan conjuntamente "formulaciones líquidas de la invención", "formulaciones líquidas de la invención SYNAGIS®", o "formulaciones líquidas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo".

Como se usa en el presente documento, el término "modulador de receptores de citocinas" se refiere a un agente que modula la fosforilación de un receptor de citocinas, la activación de una ruta de transducción de señales asociada a un receptor de citocinas y/o la expresión de una proteína particular tal como una citocina. Un agente tal puede modular directa o indirectamente la fosforilación de un receptor de citocinas, la activación de una ruta de transducción de señales asociada a un receptor de citocinas y/o la expresión de una proteína particular tal como una citocina. Así, ejemplos de moduladores de receptores de citocinas incluyen, pero no se limitan a, citocinas, fragmentos de citocinas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un receptor de citocinas o un fragmento del mismo. Además, ejemplos de moduladores de receptores de citocinas incluyen, pero no

se limitan a, péptidos, polipéptidos (por ejemplo, receptores de citocinas solubles), proteínas de fusión y anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a una citocina o un fragmento de la misma.

Como se usa en el presente documento, los términos “fragmento de SYNAGIS[®]”, “fragmento de unión al antígeno” y términos similares usados en el contexto de SYNAGIS[®] se refieren a un fragmento de SYNAGIS[®] que se une inmunoespecíficamente a un antígeno del RSV. Los fragmentos de SYNAGIS[®] pueden generarse por cualquier técnica conocida para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa, y la región variable, la región CH1 y la región bisagra de la cadena pesada. Preferentemente, el fragmento también se une a un antígeno del RSV, más preferentemente al mismo epítipo que SYNAGIS[®].

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de una terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico), que es suficiente para reducir la gravedad y/o duración de una infección por el RSV, mejorar uno o más síntomas de la misma, prevenir el avance de una infección por el RSV, o producir la regresión de una infección por el RSV, o que es suficiente para producir la prevención del desarrollo, reaparición, aparición o progresión de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma, o potenciar o mejorar el (los) efecto(s) profiláctico(s) y/o terapéutico(s) de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico). En una realización específica, una cantidad eficaz de un agente terapéutico o profiláctico reduce una o más de las siguientes etapas de un ciclo de vida del RSV: el enlace de la partícula de virus a una célula, la introducción de información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales, la producción de nuevas partículas de virus y la liberación de partículas de virus de una célula al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %. En otra realización específica, una cantidad eficaz de un agente terapéutico o profiláctico reduce la replicación, multiplicación o propagación de un virus al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %.

Como se usa en el presente documento, el término “epítipo” se refiere a una porción de un polipéptido o proteína del RSV que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente en un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido o proteína del RSV que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido o proteína del RSV con la que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente como se ha determinado por cualquier método muy conocido en la técnica, por ejemplo, por los inmunoensayos descritos en el presente documento. Los epítipos antigénicos no necesitan ser necesariamente inmunogénicos. Específicamente, el epítipo de SYNAGIS[®] es el sitio antigénico A de la proteína F del RSV.

Como se usa en el presente documento, el término “excipientes” se refiere a sustancias inertes que se usan comúnmente como diluyente, vehículo, conservantes, aglutinantes o agente estabilizante para fármacos e incluye, pero no se limita a, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero, etc.), aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, etc.), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo, sulfonatos de alquilo, caprilato, etc.), tensioactivos (por ejemplo, SDS, polisorbato, tensioactivo no iónico, etc.), sacáridos (por ejemplo, sacarosa, maltosa, trehalosa, etc.) y polioles (por ejemplo, manitol, sorbitol, etc.). Véase también Remington's Pharmaceutical Sciences (por Joseph P. Remington, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA). Preferentemente, los excipientes confieren una propiedad física beneficiosa a la formulación, tal como elevada estabilidad de las proteínas, elevada solubilidad de las proteínas y viscosidad reducida.

El término “fragmento”, como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido, polipéptido o proteína (incluyendo un anticuerpo) que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido o proteína. En una realización específica, un fragmento de una proteína o polipéptido retiene al menos una función de la proteína o polipéptido. En otra realización, un fragmento de una proteína o polipéptido retiene al menos dos, tres o cuatro funciones de la proteína o polipéptido. Preferentemente, un fragmento de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno del RSV retiene la capacidad para unirse a un antígeno del RSV.

- Como se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de una primera proteína, polipéptido o fragmento, análogo o derivado de la misma, y una secuencia de aminoácidos de una proteína heteróloga o polipéptido (es decir, una segunda proteína, polipéptido o fragmento, análogo o derivado de la misma diferente de la primera proteína o fragmento funcional, análogo o derivado de la misma). En una realización, una proteína de fusión comprende un agente profiláctico o terapéutico fusionado con una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. Según esta realización, la proteína heteróloga, polipéptido o péptido puede o puede no ser un tipo diferente de agente profiláctico o terapéutico.
- Como se usa en el presente documento, el término "lactante humano" se refiere a un humano de menos de 24 meses, preferentemente menos de 16 meses, menos de 12 meses, menos de 6 meses, menos de 3 meses, menos de 2 meses o menos de 1 mes de edad.
- Como se usa en el presente documento, el término "lactante humano nacido prematuramente" se refiere a un ser humano nacido a menos de 40 semanas de edad gestacional, preferentemente menos de 35 semanas de edad gestacional, que es menos de 6 meses de edad, preferentemente menos de 3 meses de edad, más preferentemente menos de 2 meses de edad, y lo más preferentemente menos de 1 mes de edad.
- Como se usa en el presente documento, el término "alta concentración" se refiere a una concentración de 50 mg/ml o mayor, preferentemente 95 mg/ml o mayor de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno del RSV, en una formulación de anticuerpo.
- Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" incluye una célula sujeto transfectada o transformada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o posible progenie de una célula tal. La progenie de una célula tal puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias medioambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.
- Como se usa en el presente documento, el término "se une inmuno-específicamente a un antígeno del RSV" y términos análogos se refieren a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a un antígeno del RSV de los mismos y no se unen específicamente a otros polipéptidos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmuno-específicamente al antígeno del RSV pueden ser reactivos de forma cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, los anticuerpos o fragmentos que se unen inmuno-específicamente al antígeno del RSV no reaccionan de forma cruzada con otros antígenos. Los anticuerpos o fragmentos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno del RSV pueden identificarse, por ejemplo, por inmunoensayos, BIAcore, calorimetría isotérmica de valoración, u otras técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno del RSV cuando se une con mayor afinidad que a cualquier antígeno reactivo de forma cruzada como se ha determinado usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA). Véase, por ejemplo, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York en las páginas 332-336 para una discusión referente a la especificidad de anticuerpos.
- El término "en combinación", como se usa en el presente documento, se refiere al uso de más de una terapia (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos). El uso del término "en combinación" no limita el orden en el que las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) se administran a un sujeto con una infección por el RSV. Una primera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) puede administrarse antes de (por ejemplo, 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 o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 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 o 12 semanas después) la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico) a un sujeto con una infección por el RSV.
- Como se usa en el presente documento, el término "sal inorgánica" se refiere a cualquier compuesto que no contenga carbono, que resulta de la sustitución de parte o todo el hidrógeno del ácido o un ácido con un metal o un grupo que actúa como un metal y se usan frecuentemente como compuesto de ajuste de la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH₂PO₄, etc.
- Un anticuerpo "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido de la que la proteína se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el polipéptido/proteína se separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o produce recombinantemente. Así, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones del anticuerpo que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % o 1 %, (en peso seco) de proteína contaminante. Si el anticuerpo se produce recombinantemente, también

está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % del volumen de la preparación de proteína. Si el anticuerpo se produce por síntesis química, está preferentemente sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos, es decir, se separa de precursores químicos u otros agentes químicos que participan en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización preferida de la presente invención, los anticuerpos se aíslan o purifican.

Como se usa en el presente documento, la expresión “niveles de bajos a indetectables de agregación” se refiere a muestras que contienen no más del 5 %, no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 %, no más del 1 % y lo más preferentemente no más del 0,5 %, de agregación en peso de proteína como se mide por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC).

Como se usa en el presente documento, el término “niveles de bajos a indetectables de fragmentación” se refiere a muestras que contienen igual o más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o el 99 %, de la proteína total, por ejemplo, en un pico individual como se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC), o en dos (2) picos (cadenas pesadas y ligeras) por electroforesis capilar en gel reducida (rCGE), representado el SYNAGIS® no degradado o un fragmento no degradado del mismo que se une inmuno-específicamente a un antígeno del RSV, y que no contiene otros picos individuales que tengan más del 5 %, más del 4 %, más del 3 %, más del 2 %, más del 1 %, o más del 0,5 % de proteína total cada uno. El término “electroforesis capilar en gel reducida (CGE)”, como se usa en el presente documento, se refiere a electroforesis capilar en gel bajo condiciones reductoras suficientes para reducir enlaces disulfuro en SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Como se usa en el presente documento, los términos “controlan”, “controlar” y “control” se refieren a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia (por ejemplo, SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo), que no producen una cura de una infección por el RSV. En ciertas realizaciones, a un sujeto se administran una o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) para “controlar” una infección por el RSV o un síntoma de la misma de manera que se prevenga la progresión o empeoramiento de la infección.

Como se usa en el presente documento, el término “modificado”, en el contexto de formas modificadas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que ha sido alterado por cualquier método conocido en la técnica para aumentar su semivida (véase, por ejemplo, la Sección 5.1.1., abajo). SYNAGIS® y fragmentos de unión al antígeno del mismo con semividas *in vivo* mejoradas y métodos para prepararlos se desvelan en la publicación internacional nº WO 02/060919, presentada el 12 de diciembre de 2001, titulada “Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses” y por L. Johnson et al. El término “modificado” en el contexto de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo también se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno modificado por unión covalente de cualquier tipo de molécula a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede modificarse, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, PEGilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc.

Como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que está autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense, farmacopea europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

Como se usa en el presente documento, el término “poliol” se refiere a un azúcar que contiene muchos grupos -OH en comparación con un sacárido normal.

Como se usa en el presente documento, los términos “previenen”, “prevenir” y “prevención” se refieren a la prevención o reducción de la reaparición, aparición, desarrollo o progresión de una infección por el RSV, o la prevención o reducción de la gravedad y/o duración de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma.

Como se usa en el presente documento, los términos “agente profiláctico” y “agentes profilácticos” se refieren a cualquier agente que pueda usarse en la prevención de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. En ciertas realizaciones, el término “agente profiláctico” se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Según estas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un componente de una formulación líquida de la invención. En ciertas otras realizaciones, el término “agente profiláctico” no se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En todavía otras realizaciones, el término “agente profiláctico” no se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos distintos de SYNAGIS® que se unen inmuno-específicamente a un antígeno del RSV. Preferentemente, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil para, o se ha usado o está siendo actualmente usado para prevenir o impedir la aparición, desarrollo, progresión y/o gravedad de una infección por el RSV o un síntoma de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una formulación líquida de la invención que es suficiente para producir la prevención del desarrollo, reaparición, aparición o progresión de una infección por el RSV. En una realización específica, una cantidad profilácticamente eficaz de un agente profiláctico reduce una o más de las siguientes etapas de un ciclo de vida del RSV: el enlace de la partícula de virus a una célula, la introducción de información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales, la producción de nuevas partículas de virus y la liberación de partículas de virus de una célula al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %. En otra realización específica, una cantidad profilácticamente eficaz de un agente profiláctico reduce la replicación, multiplicación o propagación de un virus al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %.

Como se usa en el presente documento, el término “antígeno del RSV” se refiere a una proteína del RSV, polipéptido o péptido con el que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente.

Como se usa en el presente documento, el término “sacárido” se refiere a una clase de moléculas que son alcoholes polihidroxilados. Los sacáridos se denominan comúnmente hidratos de carbono y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacárido), por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

El término “molécula pequeña” y términos análogos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (es decir, que incluye compuestos hetero-orgánicos y/o organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

Como se usa en el presente documento, los términos “estabilidad” y “estable” en el contexto de una formulación líquida que comprende SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo se refieren a la resistencia de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación a despliegue térmico y químico, agregación, degradación o fragmentación bajo condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. Las formulaciones “estables” de la invención retienen actividad biológica igual o más del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,5 % bajo condiciones de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento dadas. La estabilidad de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede evaluarse por grados de agregación, degradación o fragmentación por métodos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, electroforesis capilar en gel reducida (rCGE), electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con una referencia, es decir, SYNAGIS® liofilizado comercialmente disponible reconstituido a 100 mg/ml en tampón histidina 47 mM/glicina 3 mM con 5,6 % de manitol a pH 6,0. La referencia da regularmente un pico individual (área ≥97 %) por HPSEC. La estabilidad global de una formulación líquida que comprende SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno del RSV puede evaluarse por diversos ensayos inmunológicos que incluyen, por ejemplo, ELISA y radioinmunoensayo usando el epítipo específico del RSV.

Como se usa en el presente documento, el término “referencia estándar de SYNAGIS®” o términos análogos se refieren a SYNAGIS® liofilizado comercialmente disponible, como se describe en Physicians' Desk Reference, 56ª edición, 2002. SYNAGIS® reconstituido puede contener, por ejemplo, los siguientes excipientes: histidina 47 mM, glicina 3,0 mM y 5,6 % de manitol y el principio activo, el anticuerpo, a una concentración de 100 miligramos por ml de disolución.

Los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en el presente documento. Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferentemente un mamífero que incluye un no primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, gato, perro, rata y ratón) y un primate (por ejemplo, un chimpancé, un mono tal como un mono cinomolgo, y un ser humano), y más preferentemente un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente libre de tensioactivo” se refiere a una formulación de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, conteniendo dicha formulación menos del 0,0005 %, menos del 0,0003 % o menos del 0,0001 % de tensioactivos y/o menos del 0,0005 %, menos del 0,0003 % o menos del 0,0001 % de tensioactivo.

Como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente libre de sales inorgánicas” se refiere a una formulación de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, conteniendo dicha formulación menos del 0,0005 %, menos del 0,0003 % o menos del 0,0001 % de sales inorgánicas.

Como se usa en el presente documento, el término “tensioactivo” se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas; concretamente, están compuestas de grupos de tendencias de solubilidad opuestas, normalmente una cadena de hidrocarburo soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivos pueden clasificarse, dependiendo de la carga del resto tensioactivo, en tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. Los tensioactivos se usan frecuentemente como agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Como se usa en el presente documento, los términos “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a cualquier agente que pueda usarse en el tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. En ciertas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Según estas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un componente de una formulación líquida de la invención. En ciertas otras realizaciones, el término “agente terapéutico” no se refiere a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En todavía otras realizaciones, el término “agente terapéutico” no se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos, distintos de SYNAGIS® que se unen inmuno-específicamente a un antígeno del RSV. Preferentemente, un agente terapéutico es un agente que se sabe que es útil para, o se ha usado o está siendo actualmente usado para el tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de una formulación líquida de la invención que reduce o mejora la progresión, gravedad y/o duración de una infección por el RSV, y/o mejora uno o más síntomas asociados a una infección por el RSV. Con respecto al tratamiento de una infección por el RSV, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de un agente terapéutico suficiente para reducir o inhibir la replicación de un virus, inhibir o reducir la infección de células con el virus, inhibir o reducir la producción de las partículas virales, inhibir o reducir la liberación de partículas virales, inhibir o reducir la propagación del virus a otros tejidos o sujetos, o mejorar uno o más síntomas asociados a la infección. En una realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico reduce una o más de las siguientes etapas de un ciclo de vida del RSV: el enlace de la partícula de virus a una célula, la introducción de información genética viral en una célula, la expresión de proteínas virales, la producción de nuevas partículas de virus y la liberación de partículas de virus de una célula al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %. En otra realización específica, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico reduce la replicación, multiplicación o propagación de un virus al menos el 5 %, preferentemente al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 100 %.

Como se usa en el presente documento, los términos “terapias” y “terapia” puede referirse a cualquier protocolo, método y/o agente que pueda usarse en la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. En ciertas realizaciones, los términos “terapia” y “terapias” se refieren a una terapia biológica, y/u otras terapias útiles para el tratamiento de una infección por el RSV conocida para el personal médico experto.

Como se usa en el presente documento, los términos “tratan”, “tratar” y “tratamiento” se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una infección por el RSV y/o reduce o mejora uno o más síntomas de una infección por el RSV. En realizaciones específicas, tales términos se refieren a la reducción o inhibición de la replicación de un virus respiratorio sincitial (RSV), la inhibición o reducción en la propagación de un virus respiratorio sincitial (RSV) a otros tejidos o sujetos, la inhibición o reducción de la infección de una célula con un virus respiratorio sincitial (RSV), o la mejora de uno o más síntomas asociados a una infección por el virus respiratorio sincitial (RSV).

Como se usa en el presente documento, un “protocolo” incluye dosificar programas y pautas de dosificación. Los protocolos en el presente documento son métodos de uso e incluyen protocolos profilácticos y terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, el término “modulador de receptores de linfocitos T” se refiere a un agente que modula la fosforilación de un receptor de linfocitos T, la activación de una ruta de transducción de señales asociada a un receptor de linfocitos T y/o la expresión de una proteína particular tal como una citocina. Un agente tal puede modular directa o indirectamente la fosforilación de un receptor de linfocitos T, la activación de una ruta de transducción de señales asociada a un receptor de linfocitos T y/o la expresión de una proteína particular tal como una citocina. Ejemplos de moduladores de receptores de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un receptor de linfocitos T o un fragmento del mismo. Además, ejemplos de moduladores de receptores de linfocitos T incluyen,

pero no se limitan a, proteínas, péptidos, polipéptidos (por ejemplo, receptores de linfocitos T solubles), proteínas de fusión y anticuerpos que se unen inmuno específicamente a un ligando para un receptor de linfocitos T o un fragmento del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término “de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas” se refiere a actividades de anticuerpo, que incluyen capacidades de unión específica e SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno como se mide por diversos ensayos inmunológicos, que incluyen, pero no se limitan a, ELISA y radioinmunoensayos. En una realización, SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno de las formulaciones líquidas de la invención retienen aproximadamente el 50 %, preferentemente el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 98 % de la capacidad para unirse inmuno específicamente a un antígeno del RSV en comparación con un anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo como se mide por un ensayo inmunológico conocido para un experto en la materia o descrito en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse un ensayo basado en ELISA para comparar la capacidad de una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para unir inmuno específicamente un antígeno del RSV a un patrón de referencia de SYNAGIS®. En este ensayo, se recubren placas con un antígeno del RSV y se compara la señal de unión de una concentración fija de un patrón de referencia de SYNAGIS® con la señal de unión de la misma concentración de un anticuerpo de prueba o fragmento de anticuerpo.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra las líneas generales para preparar SYNAGIS® purificado. La Fig. 2 muestra el diagrama de flujo del estudio clínico para comparar la formulación líquida de SYNAGIS® con la formulación liofilizada de SYNAGIS®.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento proporcionan una preparación lista para su uso de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para administrar a un sujeto sin tener que reconstituir la preparación con exactitud y asépticamente y esperar durante un periodo de tiempo hasta que la disolución se clarifique antes de administrar la formulación al sujeto. Simplifica el procedimiento de administrar la formulación a un sujeto por un profesional sanitario. Además, debido a su alta estabilidad durante el almacenamiento, las formulaciones pueden contener SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a concentraciones en el intervalo de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml sin causar un efecto adverso sobre la(s) actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo debido a agregación y/o fragmentación de proteínas durante un almacenamiento prolongado. Tal estabilidad no solo garantiza la eficacia de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, sino que también reduce posibles riesgos de causar efectos adversos sobre un sujeto. Además, el proceso de fabricación de las formulaciones líquidas de la presente invención se simplifica y es más eficaz que el proceso de fabricación para la versión liofilizada debido a que todas las etapas de la fabricación de las formulaciones líquidas se llevan a cabo en una disolución acuosa, que no implica proceso de secado, tal como liofilización y secado por congelación. Por consiguiente, también es más rentable.

5.1 Formulaciones líquidas de SYNAGIS®

Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento proporcionan formulaciones de anticuerpo que están sustancialmente libres de tensioactivo, sales inorgánicas y/u otros excipientes y todavía presentan alta estabilidad durante largos periodos de almacenamiento. En una realización específica, tales formulaciones de anticuerpo son homogéneas. Las formulaciones pueden comprender histidina a concentraciones entre 1 y 100 mM y SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a concentraciones de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. Las formulaciones pueden no comprender otros componentes, excepto agua o disolventes adecuados. Una forma modificada del anticuerpo SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene semivida y/o afinidad mejoradas puede usarse en las formulaciones líquidas.

La concentración de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se incluye en las formulaciones líquidas pueden ser al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 35 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 45 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 55 mg/ml, al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml, al menos 70 mg/ml, al menos 75 mg/ml, al menos 80 mg/ml, al menos 85 mg/ml, al menos 90 mg/ml, al menos 95 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 105 mg/ml, al menos 110 mg/ml, al menos 115 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 125 mg/ml, al menos 130 mg/ml, al menos 135 mg/ml, al menos 140 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml, al menos 250 mg/ml o al menos 300 mg/ml.

La concentración de histidina que se incluye en las formulaciones líquidas puede oscilar de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 23 mM a aproximadamente 27 mM, y es lo más preferentemente aproximadamente 25 mM. La histidina puede estar en forma de L-histidina, D-histidina, o una mezcla de las mismas, pero la L-histidina es la más preferible. La histidina también puede estar en forma de hidratos. La histidina puede usarse en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato (por ejemplo, monoclóhidrato y

diclorhidrato), bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La pureza de la histidina debe ser al menos del 98 %, preferentemente al menos del 99 %, y lo más preferentemente al menos del 99,5 %.

El pH de la formulación no debe ser igual al punto isoelectrico del anticuerpo particular que va a usarse en la formulación (por ejemplo, el punto isoelectrico de SYNAGIS® oscila de 8,65 a 9,43) y puede oscilar de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7, preferentemente aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, más preferentemente aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, y lo más preferentemente aproximadamente 6,0.

Además de histidina y SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, las formulaciones pueden comprender además glicina a una concentración inferior a 150 mM, inferior a 100 mM, inferior a 50 mM, inferior a 3,0 mM, inferior a 2,0 mM o inferior a 1,8 mM, y lo más preferentemente 1,6 mM. La cantidad de glicina en la formulación no debe producir un efecto de tamponamiento significativo de manera que pueda evitarse la precipitación del anticuerpo en su punto isoelectrico. La glicina también puede usarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como clorhidrato, bromhidrato, sulfato, acetato, etc. La pureza de la glicina debe ser al menos del 98 %, preferentemente al menos del 99 %, y lo más preferentemente del 99,5 %. La glicina puede no incluirse en las formulaciones líquidas.

Opcionalmente, las formulaciones pueden comprender además otros excipientes, tales como sacáridos (por ejemplo, sacarosa, manosa, trehalosa, etc.) y polioles (por ejemplo, manitol, sorbitol, etc.). En una realización, el otro excipiente es un sacárido. En una realización específica, el sacárido es sacarosa, que está a un intervalo de concentración entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 20 %, preferentemente aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 15 %, más preferentemente aproximadamente el 8 % y el 10 %. En otra realización, el otro excipiente es un poliol. Preferentemente, sin embargo, las formulaciones líquidas de la presente invención no contienen manitol. En una realización específica, el poliol es polisorbato (por ejemplo, Tween 20), que está a un intervalo de concentración entre aproximadamente el 0,001 % y aproximadamente el 1 %, preferentemente aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 0,1.

Las formulaciones líquidas pueden presentar estabilidad a los intervalos de temperatura de 38 °C-42 °C durante al menos 60 días y, en algunas realizaciones, no más de 120 días, de 20 °C-24 °C durante al menos 1 año, de 2 °C-8 °C (en particular, a 4 °C) durante al menos 3 años, al menos 4 años, o al menos 5 años y a -20 °C durante al menos 3 años, al menos 4 años, o al menos 5 años, como se evalúa por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC). Concretamente, las formulaciones líquidas tienen niveles de bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación, como se define en el presente documento, después del almacenamiento durante los periodos definidos como se expone anteriormente. Preferentemente, no más del 5 %, no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 %, no más del 1 %, y lo más preferentemente no más del 0,5 %, de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo forma un agregado como se mide por HPSEC, después del almacenamiento durante los periodos definidos como se expone anteriormente. Además, las formulaciones líquidas pueden casi no presentar pérdida en la(s) actividad(es) biológica(s) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo durante el almacenamiento prolongado bajo la condición descrita anteriormente, como se evalúa por diversos ensayos inmunológicos que incluyen, por ejemplo, ensayo de inmunoadsorción (ELISA) y radioinmunoensayo para medir la capacidad de unión al antígeno del RSV de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o, por ejemplo, por un ensayo de C3a/C4a para medir la capacidad de activación del complemento de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Las formulaciones líquidas pueden retener después del almacenamiento durante los periodos anteriormente definidos más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 98 %, más del 99 %, o más del 99,5 % de la(s) actividad(es) biológica(s) inicial(es) antes del almacenamiento.

Las formulaciones líquidas pueden prepararse como formas de dosificación unitaria. Por ejemplo, una dosificación unitaria por vial puede contener 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml de diferentes concentraciones de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que oscilan de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de concentración de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a un RSV. Si fuera necesario, estas preparaciones pueden ajustarse a una concentración deseada añadiendo un diluyente estéril a cada vial.

5.1.1 SYNAGIS®

En el presente documento se desvelan formulaciones líquidas que comprenden SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. También se desvelan formulaciones líquidas de SYNAGIS®, un anticuerpo monoclonal humanizado que neutraliza una amplia variedad de cepas aisladas del RSV. La secuencia de aminoácidos de SYNAGIS® se desvela, por ejemplo, en Johnson et al., 1997, J. Infectious Disease 176:1215-1224, y la patente de EE.UU. nº 5.824.307, y sus V_HCDR y V_LCDR se muestran en la Tabla 1, abajo. Las propiedades y usos de SYNAGIS® también se desvelan en, por ejemplo, otras solicitudes, véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/724.396 presentada el 28 de noviembre de 2000; la patente de EE.UU. nº 6885493 (solicitud nº 09/996.265) presentada el 28 de noviembre de 2001 y la patente de EE.UU. nº 7179900 (solicitud nº 10/403.180) presentada el 31 de marzo de 2003.

Tabla 1. Secuencias de CDR de SYNAGIS®

CDR	Secuencia	SEC ID N°:
VH1	TSGMSVG	1
VH2	DIWWDDKDKDYNPSLK <u>S</u>	2
VH3	<u>S</u> MITNWYFDV	3
VL1	KCOLSVGYMH	4
VL2	DTSKLAS	5
VL3	FQGS <u>G</u> YPET	6

Además, la presente invención también engloba las formulaciones líquidas estables de formas modificadas de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tienen semividas mejoradas. En particular, la presente invención engloba una forma modificada de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene una semivida en un sujeto, preferentemente un ser humano, superior a 3 días, superior a 7 días, superior a 10 días, preferentemente superior a 15 días, superior a 25 días, superior a 30 días, superior a 35 días, superior a 40 días, superior a 45 días, superior a 2 meses, superior a 3 meses, superior a 4 meses, o superior a 5 meses. Prolongando las semividas de SYNAGIS® y fragmentos de unión al antígeno del mismo es posible reducir la cantidad y/o frecuencia de dosificación del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

Para prolongar la circulación en suero de un anticuerpo *in vivo*, pueden usarse diversas técnicas. Por ejemplo, pueden unirse moléculas de polímero inerte, tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG), a un anticuerpo con o sin un conector multifuncional tanto mediante conjugación específica del sitio del PEG al extremo N o C del anticuerpo como mediante grupos épsilon-amino presentes en residuos de lisina. Puede usarse derivatización de polímeros lineales o ramificados que produce pérdida mínima de la actividad biológica. El grado de conjugación puede monitorizarse estrechamente por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la apropiada conjugación de moléculas de PEG con los anticuerpos. Puede separarse el PEG sin reaccionar de conjugados de anticuerpo-PEG por exclusión por tamaño o por cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivatizados con PEG pueden probarse para actividad de unión, además de para eficacia *in vivo* usando métodos conocidos para aquellos de experto en la materia, por ejemplo, por inmunoensayos descritos en el presente documento.

También puede generarse un anticuerpo que tiene una elevada semivida *in vivo* introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o delecciones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn de la misma (preferentemente, un Fc o fragmento del dominio Fc de bisagra). Véase, por ejemplo, la publicación internacional n° WO 98/23289; publicación internacional n° WO 97/34631; y la patente de EE.UU. n° 6.277.375. SYNAGIS® y fragmentos de unión al antígeno del mismo con semividas *in vivo* mejoradas y métodos para prepararlos se desvelan en la solicitud internacional WO 02/060919, presentada el 12 de diciembre de 2001, titulada "Molecules with Extended Half-Lives, Compositions and Uses" y por L. Johnson *et al*

Además, un anticuerpo puede conjugarse con albúmina con el fin de hacer el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo más estable *in vivo* o que tenga una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas son muy conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n° WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y la patente europea n° EP 413. 622.

Las formulaciones líquidas pueden comprender SYNAGIS® o fragmentos de unión al antígeno del mismo que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, PEGilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc., y retener la actividad de unión al antígeno del RSV.

5.1.2 Conjugados de anticuerpo

Las formulaciones líquidas pueden comprender SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo (incluyendo formas modificadas que tienen elevadas semividas *in vivo*) conjugado con uno o más restos, que incluyen, pero no se limitan a, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas.

Las formulaciones líquidas pueden comprender SYNAGIS® recombinantemente fusionado o químicamente conjugado (incluyendo tanto conjugaciones covalentes como no covalentes) con una proteína heteróloga o polipéptido (o fragmento de unión al antígeno, preferentemente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. La fusión no necesita ser necesariamente directa, pero puede producirse mediante secuencias conectoras. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo para dirigir un polipéptido heterólogo a un tipo de célula particular, tanto *in vitro* como *in vivo*, fusionando o conjugando el anticuerpo con otro anticuerpo específico para receptores de la superficie celular particulares. También puede usarse un anticuerpo fusionado o conjugado con un polipéptido heterólogo en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n° WO 93/21232; patente europea

nº EP 439.095; Naramura et al., 1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99; patente de EE.UU. nº 5.474.981; Gillies et al., 1992, *PNAS* 89:1428-1432; y Fell et al., 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452.

Las composiciones pueden comprender una proteína heteróloga, péptido o polipéptido fusionado o conjugado con un fragmento de unión al antígeno de SYNAGIS®. Por ejemplo, un polipéptido heterólogo puede fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv o fragmento F(ab)₂. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugarse un polipéptido con la porción de anticuerpo. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; patentes europeas nº EP 307.434 y EP 367.166; publicaciones internacionales nº WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539; Zheng et al., 1995, *J. Immunol.* 154:5590-5600; y Vil et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-11341.

Pueden generarse proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de barajado de genes, barajado de motivos, barajado de exones y/o barajado de codones (denominadas conjuntamente "barajado de ADN"). Puede emplearse barajado de ADN para alterar las actividades de SYNAGIS® o fragmentos del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo con mayores afinidades y menores constantes de disociación). Véanse, generalmente, las patentes de EE.UU. nº 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458, y Patten et al., 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, *Biotechniques* 24(2):308-313. Pueden alterarse SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o el ácido nucleico que codifica SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, sometiendo a mutagénesis al azar por PCR propensa al error, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos antes de la recombinación. Puede recombinarse SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc., de una o más moléculas heterólogas.

Además, SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede fusionarse con una secuencia de marcador, tal como un péptido para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca de hemaglutinina "HA", que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de la hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., 1984, *Cell* 37:767) y la marca "flag".

Las formulaciones líquidas pueden comprender SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo conjugado con un agente de diagnóstico o detectable o cualquier otra molécula para la que se desea aumentar la semivida en suero. Un anticuerpo tal puede ser útil para monitorizar o pronosticar el desarrollo o progresión de una infección por el RSV como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección puede llevarse a cabo acoplando SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a una sustancia detectable que incluye, pero no se limita a, diversas enzimas, tales como, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no se limitan a, umbeliferona, fluoresceína, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficeeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no se limitan a, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In) y tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Tin; metales emisores de positrones usando diversas tomografías emisoras de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que se radiomarcen o conjugan con radioisótopos específicos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse tanto directamente a SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo como indirectamente mediante un producto intermedio (tal como, por ejemplo, un conector conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico según la presente invención.

SYNAGIS®, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede conjugarse con un resto terapéutico. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU)),

ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisdiclorodiamina-platino (II) (DDP cisplatino)); antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina); antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)); moléculas de auristatina (por ejemplo, auristatina PHE, briostatina 1, solastatina 10, véase 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 antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina); hormonas (por ejemplo, glucocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos); inhibidores de las enzimas reparadoras del ADN (por ejemplo, etopósido o topotecan); inhibidores de cinasas (por ejemplo, compuesto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian et al., *Clin Cancer Res.* 8(7):2167-76 (2002)), y aquellos compuestos desvelados en las patentes de EE.UU. nº 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 y 5.587.459); inhibidores de la farnesil transferasa (por ejemplo, R115777, BMS 214662, y los desvelados por, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº: 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 y 6.040.305); inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina, irinotecan, SN 38, topotecan, 9-aminocamptotecina, GG 211 (GI 147211), DX 8951f, IST 622, rubitecan, pirazoloacridina, XR 5000, saintopina, UCE6, UCE1022, TAN 1518A, TAN 1518B, KT6006, KT6528, ED 110, NB 506, ED 110, NB 506, rebecamicina y bulgareina); ligandos del surco menor del ADN tales como colorante 33342 de Hoescht y colorante 33258 de Hoechst; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta-lapachona; BC 4 1; y sales, solvatos, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos (véase, por ejemplo, Rothenberg, M.L., *Annals of Oncology* 8:837-855(1997); y Moreau et al., *J. Med. Chem.* 41:1631-1640(1998)). Los restos terapéuticos también pueden ser oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, los desvelados en las patentes de EE.UU. nº 6.277.832, 5.998.596, 5.885.834, 5.734.033 y 5.618.709); inmunomoduladores (por ejemplo, anticuerpos y citocinas); anticuerpos (por ejemplo, rituximab (Rituxan®), caliqueamicina (Mylotarg®), ibritumomab tiuxetano (Zevalin®) y tositumomab (Bexxar®)); e inhibidores de la adenosina desaminasa (por ejemplo, fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina).

Además, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede conjugarse con un resto terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. El resto terapéutico o restos de fármaco no deben interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase la publicación internacional nº WO 97/33899), AIM II (véase la publicación internacional nº WO 97/34911), ligando Fas (Takahashi et al., 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574) y VEGF (véase la publicación internacional nº WO 99/23105); o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una lincina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-4 ("IL-4"), interleucina-6 ("IL-6"), interleucina-9 (IL-9), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12), interferón- α , β , γ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")), o un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")).

Además, un anticuerpo puede conjugarse con restos terapéuticos tales como un ión metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa tales como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, que incluyen, pero no se limitan a, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , a polipéptidos. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede unirse al anticuerpo mediante una molécula conectora. Tales moléculas conectoras se conocen comúnmente en la técnica y se describen en Denardo et al., 1998, *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson et al., 1999, *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; y Zimmerman et al., 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50.

Las técnicas para conjugar restos terapéuticos a anticuerpos son muy conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *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", en *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", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58.

Alternativamente, SYNAGIS®, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado como se describe por Segal en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

SYNAGIS[®], o un fragmento de unión al antígeno del mismo, también puede unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, poli(cloruro de vinilo) o polipropileno.

El resto terapéutico o fármaco conjugado con SYNAGIS[®], o un fragmento de unión al antígeno del mismo, debe elegirse para lograr el (los) efecto(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) deseado(s) para una infección por el RSV en un sujeto. Un profesional clínico u otro profesional médico debe considerar lo siguiente cuando decide qué resto terapéutico o fármaco conjugar con SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo: la gravedad de la infección y la condición del sujeto.

SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo, con o sin un resto terapéutico conjugado con él, puede usarse como terapéutico.

5.2 Método de preparación de las formulaciones de anticuerpo

La presente invención proporciona métodos para preparar formulaciones líquidas de SYNAGIS[®], o un fragmento de unión al antígeno del mismo, según la reivindicación 1. La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra las líneas generales para preparar SYNAGIS[®] purificado. Métodos para preparar formulaciones líquidas pueden comprender: purificar el anticuerpo de medio acondicionado (tanto lotes individuales como lotes reunidos de medio) y concentrar una fracción que contiene SYNAGIS[®] purificado a una concentración final de anticuerpo de aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml o aproximadamente 300 mg/ml usando una membrana semipermeable con un corte de peso molecular (MW) apropiado (por ejemplo, 30 kD de corte para moléculas de anticuerpo completo y fragmentos F(ab')₂; y 10 kD de corte para fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab) y diafiltrar la fracción de anticuerpo concentrado en el tampón de formulación usando la misma membrana. El tampón de formulación de la presente invención comprende histidina a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 23 mM a aproximadamente 27 mM, y es lo más preferentemente aproximadamente 25 mM. Las formulaciones pueden comprender además glicina a una concentración inferior a 100 mM, inferior a 50 mM, inferior a 3,0 mM, inferior a 2,0 mM o inferior a 1,8 mM, y lo más preferentemente de 1,6 mM. La cantidad de glicina en la formulación no debe producir un tamponamiento significativo con el fin de evitar la precipitación del anticuerpo en su punto isoeléctrico. El pH de la formulación puede oscilar de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, preferentemente aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, más preferentemente aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2, y lo más preferentemente aproximadamente 6,0. Para obtener un pH apropiado para un anticuerpo particular es preferible que la histidina (y la glicina, si se añade) se disuelva primero en agua para obtener una disolución de tampón con pH superior al pH deseado y luego el pH se disminuye al nivel deseado añadiendo HCl. De esta forma puede evitarse la formación de sales inorgánicas (por ejemplo, formación de NaCl cuando se usa, por ejemplo, clorhidrato de histidina como histidina y el pH se eleva al nivel deseado añadiendo NaOH).

Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden prepararse como formas de dosificación unitaria preparando un vial que contiene una alícuota de la formulación líquida para un uso de una vez. Por ejemplo, una dosificación unitaria por vial puede contener 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml de diferentes concentraciones de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo que oscilan de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml de concentración de SYNAGIS[®] o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une inmuno específicamente a un RSV. Si fuera necesario, estas preparaciones pueden ajustarse a una concentración deseada añadiendo un diluyente estéril a cada vial.

Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse por diversos métodos de esterilización, que incluyen esterilización por filtración, radiación, etc. En una realización más preferida, la formulación de anticuerpo diafiltrada se esteriliza por filtración con un filtro de 0,2 ó 0,22 micrómetros previamente esterilizado. Las formulaciones líquidas esterilizadas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma.

Aunque la invención se refiere a formulaciones no liofilizadas líquidas, debe observarse para el fin de equivalentes que las formulaciones de la invención pueden liofilizarse, si se desea. Así, la invención engloba formas liofilizadas de formulaciones de la invención, aunque tales formulaciones liofilizadas no son necesarias y, por tanto, no preferidas.

5.3 Métodos de preparación de SYNAGIS[®]

Puede prepararse SYNAGIS[®] y un fragmento de unión al antígeno del mismo contenido en las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o, preferentemente, por técnicas de expresión recombinante.

La secuencia de nucleótidos que codifica los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de SYNAGIS® puede obtenerse a partir de, por ejemplo, la solicitud de patente en tramitación junto con la presente 09/724.396, presentada el 28 de noviembre de 2000, y la patente de EE.UU. n.º 6885493 (09/996.265), presentada el 28 de noviembre de 2001, ambas por Young et al. Véase también la patente de EE.UU. n.º 5.824.307 por Johnson et al. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica SYNAGIS®, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, puede sintetizarse o ensamblarse químicamente a partir de oligonucleótidos como es muy conocido en la técnica, y luego amplificarse por PCR, clonación u otro método conocido en la técnica.

La expresión recombinante de un anticuerpo (tal como SYNAGIS®) requiere la construcción de un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo. Una vez se ha obtenido una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica como se ha tratado en las secciones previas. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de las cadenas pesadas, región variable de las cadenas ligeras, tanto las regiones variables de las cadenas pesadas como de las cadenas ligeras, un fragmento de unión al epítipo de la región variable de las cadenas pesadas y/o ligeras, o una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo, puede clonarse en un vector tal para la expresión. El vector de expresión así preparado puede entonces introducirse en células huésped apropiadas para la expresión del anticuerpo. Por consiguiente, la divulgación incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

La célula huésped puede co-transfectarse con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de las cadenas pesadas y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de las cadenas ligeras. Los dos vectores pueden contener marcadores de selección idénticos que permiten expresión igual de los polipéptidos de las cadenas pesadas y ligeras o marcadores de selección diferentes para garantizar el mantenimiento de ambos plásmidos. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifica, y puede expresar, tanto polipéptidos de las cadenas pesadas como ligeras. En tales situaciones, la cadena ligera debe ponerse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature*, 322:52, 1986; y Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2 197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células huésped con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN extraño, puede dejarse que las células manipuladas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular por ingeniería líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Tales líneas celulares manipuladas por ingeniería pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de composiciones que interaccionan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, los genes timidina cinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977), hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202, 1992) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., *Cell*, 22:8-17, 1980) que pueden emplearse en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. También puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de la selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357, 1980 y O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Wu y Wu, *Biotherapy*, 3:87-95, 1991; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596, 1993; Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62: 191-217, 1993; y May, *TIB TECH*, 11(5):155-2 15, 1993); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante pueden aplicarse rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado, y tales métodos se describen, por ejemplo, en 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; en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds.), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; y Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación del vector (para una revisión véase Bebbington y Hentschel, 1987, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of*

cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. Academic Press, New York). Si un marcador en el sistema de vector que expresa anticuerpo es amplificable, el aumentar el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol., Cell. Biol., 3:257, 1983).

Una vez se ha producido una molécula de anticuerpo por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la purificación en proteína A y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede fusionarse con secuencias de proteínas heterólogas, polipéptidos o péptidos descritos en el presente documento o de otro modo conocidos en la técnica para facilitar la purificación.

Los fragmentos de unión al antígeno de SYNAGIS® que se unen inmuno-específicamente al RSV pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa, y la región variable, la región CH1 y la región bisagra de la cadena pesada.

5.4 Métodos de monitorización de la estabilidad y agregación de formulaciones de anticuerpo

Existen diversos métodos disponibles para evaluar la estabilidad de formulaciones de proteína, que incluyen formulaciones de anticuerpo, basándose en las estructuras físicas y químicas de las proteínas, además de en sus actividades biológicas. Por ejemplo, para estudiar la desnaturalización de proteínas están disponibles métodos tales como absorción por transferencia de carga, análisis térmico, espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular, RMN y HPSEC. Véase, por ejemplo, Wang et al., 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(supp):S4-S26. rCGE y HPSEC son los métodos más comunes y simples para evaluar la formación de agregados de proteína, degradación de proteína y fragmentación de proteína. Por consiguiente, la estabilidad de las formulaciones líquidas de la presente invención puede evaluarse por estos métodos.

Por ejemplo, la estabilidad de las formulaciones líquidas de la presente invención puede evaluarse por HPSEC o rCGE, en la que el porcentaje de área de los picos representa SYNAGIS® no degradado o fragmentos de unión al antígeno no degradados de SYNAGIS®. En particular, se inyectan aproximadamente 250 µg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo (aproximadamente 25 µl de una formulación líquida que comprende 10 mg/ml de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo) a una columna TOSOH TSK G3000SW_{XL} (7,8 mm x 30 cm) provista de una precolumna TSK SW x 1 (6,0 mm x 4,0 cm), SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo se eluye isocráticamente con difosfato de sodio 0,1 M que contiene sulfato de sodio 0,1 M y 0,05 % de azida de sodio, a una velocidad de flujo de 0,8 a 1,0 ml/min. La proteína eluida se detecta usando absorbancia de UV a 280 nm. El patrón de referencia de SYNAGIS® migra en el ensayo como un control, y los resultados se informan como el porcentaje de área del pico del monómero producto en comparación con todos los otros picos, excluyendo el pico de volumen incluido observado aproximadamente en 12 a 14 minutos. Los picos que eluyen antes que el pico de monómero se registran como el porcentaje de agregado.

Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento presentan niveles de bajos a indetectables de agregación como se mide por HPSEC o rCGE, es decir, no más del 5 %, no más del 4 %, no más del 3 %, no más del 2 %, no más del 1 %, y lo más preferentemente no más del 0,5 % de agregado en peso de proteína, y niveles de bajos a indetectables de fragmentación, es decir, 80 % o más, 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, 98 % o más, o 99 % o más, o 99,5 % o más del área del pico total en el (los) pico(s) que representa(n) anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. En el caso de SDS-PAGE, puede medirse la densidad o la radiactividad de cada banda teñida o marcada con radioisótopo y puede obtenerse el % de densidad o el % de radiactividad de la banda que representa SYNAGIS® no degradado o fragmentos de unión al antígeno del mismo.

La estabilidad de las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento también pueden evaluarse por cualquier ensayo que mida la actividad biológica de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación. Las actividades biológicas de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, actividad de unión al antígeno, actividad de activación del complemento, actividad de unión al receptor de Fc, etc. La actividad de unión al antígeno de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede medirse por cualquier método conocido para aquellos expertos en la materia, que incluye, pero no se limita a ELISA, radioinmunoensayo, transferencia Western y similares. La actividad de activación del complemento puede medirse por un ensayo de C3a/C4a en el sistema por el cual SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo se hace reaccionar en presencia de componentes del complemento con células que expresan un antígeno del RSV. Véase también Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (incorporado por referencia en el presente documento en su totalidad). Puede usarse un ensayo basado en ELISA, por ejemplo, para comparar la capacidad de una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para unir inmuno-específicamente un antígeno del RSV a un patrón de referencia de SYNAGIS®. En este ensayo, se recubren placas con antígeno del RSV (en particular, el sitio antigénico A de la proteína F del RSV) y la señal de

unión de una concentración fija de un patrón de referencia de SYNAGIS® se compara con la señal de unión de la misma concentración de la formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

La pureza de las formulaciones de anticuerpo líquidas desveladas en el presente documento puede medirse por cualquier método muy conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, HPSEC. La esterilidad de las formulaciones de anticuerpo líquidas puede evaluarse del siguiente modo: se inoculan medio de digestión de caseína de soja estéril y medio de tioglicolato fluido con una formulación de anticuerpo líquida de prueba filtrando la formulación de anticuerpo líquida a través de un filtro estéril que tiene una porosidad nominal de 0,45 µm. Si se usa el método Sterisure™ o Steritest™, cada dispositivo de filtro se llena asépticamente con aproximadamente 100 ml de medio de digestión de caseína de soja estéril o medio de tioglicolato fluido. Si se usa el método convencional, el filtro expuesto se transfiere asépticamente a 100 ml de medio de tioglicolato fluido o medio de tioglicolato fluido. Los medios se incuban a temperaturas apropiadas y se observan tres veces durante un periodo de 14 días para evidencia de crecimiento bacteriano o fúngico.

5.5 Utilidad profiláctica y terapéutica de las formulaciones de anticuerpo

Las terapias basadas en anticuerpo pueden implicar administrar a un sujeto, preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano, las formulaciones de anticuerpo líquidas desveladas en el presente documento para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Formulaciones profilácticas y terapéuticas de la invención comprenden SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a concentraciones de aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml en una disolución que contiene histidina.

Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden comprender SYNAGIS® modificado o fragmentos de unión al antígeno del mismo que tienen semividas *in vivo* mejoradas en comparación con anticuerpos conocidos que se unen inmuno-específicamente a un antígeno del RSV (por ejemplo, SYNAGIS® sin modificar).

Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden administrarse a un mamífero, preferentemente un ser humano, para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden administrarse a un ser humano con fibrosis quística, displasia broncopulmonar, enfermedad cardíaca congénita, inmunodeficiencia congénita o inmunodeficiencia adquirida, o a un ser humano que ha tenido un trasplante de médula ósea para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden administrarse a un lactante humano, preferentemente un lactante humano nacido prematuramente o un lactante humano en riesgo de hospitalización por una infección por el RSV, para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden administrarse a una persona anciana para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto en una institución o centro de acogida (por ejemplo, una residencia de ancianos u orfanato).

Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden usarse localmente o sistémicamente en el cuerpo de un sujeto profilácticamente o terapéuticamente. Las formulaciones desveladas en el presente documento también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con otras terapias útiles en la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico distinto de SYNAGIS®). Para ejemplos no limitantes de agentes profilácticos o terapéuticos que pueden usarse en combinación con las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento véase la Sección 5.6, más adelante.

Cuando se usan una o varios de otras terapias, pueden administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. Una formulación líquida desvelada en el presente documento puede administrarse a un mamífero, preferentemente un ser humano, simultáneamente con una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de terapias en exactamente el mismo momento, sino que se indica que una formulación líquida desvelada en el presente documento y otra terapia pueden administrarse a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma que SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo contenido en la formulación líquida pueda actuar junto con la otra terapia para proporcionar un beneficio mayor que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, una formulación líquida desvelada en el presente documento y uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse suficientemente próximas en el tiempo de manera que se proporcione el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Una formulación líquida desvelada en el presente documento y una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse menos de 1 hora separadas,

aproximadamente 1 hora separadas, aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas separadas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas separadas, aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas separadas, aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas separadas, aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas separadas, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas separadas, aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas separadas, aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas separadas, aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas separadas, aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas separadas, aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas separadas, no más de 24 horas separadas o no más de 48 horas separadas. Una formulación líquida de la invención y una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse dentro de la misma visita del paciente. Una formulación líquida de la invención y una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse aproximadamente 2 a 4 días separadas, aproximadamente 4 a 6 días separadas, aproximadamente 1 semana parte, at aproximadamente 1 a 2 semanas separadas, o más de 2 semanas separadas. Una formulación líquida desvelada en el presente documento y uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse en un periodo de tiempo en el que ambos agentes son todavía activos. Un experto en la materia sería capaz de determinar un periodo de tiempo tal determinando la semivida de los agentes administrados.

Una formulación líquida desvelada en el presente documento y una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia y/o tercera terapia durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a una o más de las terapias, evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias, y/o mejora la eficacia del tratamiento.

Una formulación líquida y una o varias de otras terapias (por ejemplo, uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos) útiles para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o un síntoma de la misma pueden administrarse en un ciclo de menos de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 10 días o aproximadamente una vez cada semana. Un ciclo puede comprender la administración de una terapia (por ejemplo, un agente terapéutico o profiláctico) por infusión durante aproximadamente 90 minutos cada ciclo, aproximadamente 1 hora cada ciclo, aproximadamente 45 minutos cada ciclo. Cada ciclo puede comprender al menos 1 semana de descanso, al menos 2 semanas de descanso, al menos 3 semanas de descanso. El número de ciclos administrados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 ciclos, más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ciclos, y más normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ciclos.

Generalmente, se prefiere la administración de productos de un origen de especie o reactividad de especie (en el caso de anticuerpos) que sea la misma especie que la del paciente. Así, pueden administrarse anticuerpos humanos o humanizados, derivados de fragmentos, o análogos, a un paciente humano para terapia o profilaxis.

5.6 Agentes útiles en combinación con formulaciones de SYNAGIS®

Métodos para prevenir, controlar, tratar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma pueden comprender administrar a un sujeto en necesidad de los mismos una formulación líquida desvelada en el presente documento sola o en combinación con una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de SYNAGIS®. Métodos para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma pueden comprender administrar a un sujeto en necesidad de los mismos una formulación líquida desvelada en el presente documento sola o en combinación con una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de SYNAGIS®. Las composiciones pueden comprender una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de SYNAGIS® y métodos para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma pueden utilizar dichas composiciones. Agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN que incluyen, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos antisentido, hélices triples, interferencia por ARN (iARN) y secuencias de nucleótidos que codifican proteínas biológicamente activas, polipéptidos o péptidos) anticuerpos, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales.

Cualquier terapia que sea conocida por ser útil, o que se ha usado o está siendo actualmente usada para la prevención, control, tratamiento o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma, puede usarse en combinación con una formulación líquida descrita en el presente documento. Véase, por ejemplo, Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Berkow, M.D. et al. (eds.), 17th Ed., Merck Sharp & Dohme

Research Laboratories, Rahway, NJ, 1999; Cecil Textbook of Medicine, 20th Ed., Bennett and Plum (eds.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1996, para información referente a terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que han sido usadas o están siendo actualmente usadas para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, adrenocorticoides, corticosteroides (por ejemplo, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, triamcinolona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, hidrocortisona), glucocorticoides, esteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, diclofenaco e inhibidores de la COX-2), analgésicos, antagonistas de leucotrieno (por ejemplo, montelukast, metilxantinas, zafirlukast y zileuton), agonistas de beta2 (por ejemplo, albuterol, biterol, fenoterol, isoetarina, metaproterenol, pirbuterol, salbutamol, terbutalina-formoterol, salmeterol y salbutamol-terbutalina), agentes anticolinérgicos (por ejemplo, bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio), sulfasalazina, penicilamina, dapsona, antihistaminas, agentes antipalúdicos (por ejemplo, hidroxicloroquina) y agentes antivirales.

Una formulación líquida desvelada en el presente documento puede usarse en combinación con un anticuerpo monoclonal o quimérico, o con una linfocina o factor de crecimiento hepatopoyético (tal como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 e interferón α , β y γ), que, por ejemplo, sirve para aumentar el número o actividad de células efectoras que interactúan con el anticuerpo. Una formulación líquida desvelada en el presente documento puede también utilizarse ventajosamente en combinación con otros anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfocinas o factores de crecimiento hepatopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 e interferón α , β , y γ), que, por ejemplo, sirven para aumentar la respuesta inmunitaria. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos usados para tratar infección por el RSV tales como, por ejemplo agentes antivirales. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden usarse en combinación con uno o más de los siguientes fármacos: NIH-351 (Gemini Technologies), vacuna para el RSV recombinante (MedImmune Vaccines, Inc., solicitudes de EE.UU. nº 60/358.934 presentada el 21 de febrero de 2002, 10/373.567 presentada el 21 de febrero de 2003, 10/371.099 presentada el 21 de febrero de 2003, 10/371.122 presentada el 21 de febrero de 2003, 10/371.264 presentada el 21 de febrero de 2003, 60/466.181 presentada el 25 de abril de 2003 y 60/465.811 presentada el 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 y PFP-2 (American Home Products), vacuna para el RSV (Avant Immunotherapeutics) y F-50077 (Pierre Fabre).

5.6.1 Agentes inmunomoduladores

Puede usarse cualquier agente inmunomodulador muy conocido para un experto en la materia según los métodos desvelados en el presente documento para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Los agentes inmunomoduladores pueden afectar uno o más o todos los aspectos de la respuesta inmunitaria en un sujeto. Los aspectos de la respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a, la respuesta inflamatoria, la cascada del complemento, diferenciación, proliferación y/o función efectora de leucocitos y linfocitos, recuentos de monocitos y/o basófilos y la comunicación celular entre células del sistema inmunitario. En ciertas realizaciones de la invención, un agente inmunomodulador modula un aspecto de la respuesta inmunitaria. Un agente inmunomodulador modula más de un aspecto de la respuesta inmunitaria. La administración de un agente inmunomodulador a un sujeto inhibe o reduce uno o más aspectos de las capacidades de respuesta inmunitaria del sujeto. El agente inmunomodulador potencia uno o más aspectos de una respuesta inmunitaria del sujeto. Un agente inmunomodulador no es un agente antiinflamatorio. Un agente inmunomodulador es un agente distinto de un agente quimioterapéutico.

Ejemplos de agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, agentes proteínicos tales como citocinas, peptidomiméticos y anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, quiméricos, monoclonales, policlonales, Fv, scFv, fragmentos Fab o F(ab)₂ o fragmentos de unión al epítipo), moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos antisentido y hélices triples), moléculas pequeñas, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. En particular, agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, citoxano, Immuran, ciclosporina A, minociclina, azatioprina, antibióticos (por ejemplo, FK506 (tacrolimus)), - metilprednisolona (MP), corticosteroides, esteroides, micofenolato mofetilo, rapamicina (sirolimus), mizoribina, desoxiespergualina, brequinar, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunomida), moduladores de receptores de linfocitos T y moduladores de receptores de citocinas.

Ejemplos de moduladores de receptores de linfocitos T incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-receptor de linfocitos T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, cM-T412 (Boeringer), IDEC-CE9.1® (IDEC y SKB), mAB 4162W94, Orthoclone y OKTcdr4a (Janssen-Cilag)), anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, Nuvion (Product Design Labs), OKT3 (Johnson & Johnson) o Rituxan (IDEC)), anticuerpos anti-CD5 (por ejemplo, un inmunoconjugado ligado a ricina de anti-CD5), anticuerpos anti-CD7 (por ejemplo, CHH-380 (Novartis)), anticuerpos anti-CD8, anticuerpos monoclonales de ligando anti-CD40 (por ejemplo, IDEC-131 (IDEC)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH 1H (Ilex)), anticuerpos anti-CD2 (por ejemplo, MEDI-507 (MedImmune, Inc., publicaciones internacionales nº WO 02/098370 y WO 02/069904), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, Xanelim (Genentech)) y anticuerpos anti-B7 (por ejemplo, IDEC-114 (IDEC))), CTLA4-inmunoglobulina y LFA-3TIP (Biogen, publicación internacional WO 93/08656 y la patente de EE.UU. nº 6.162.432).

Ejemplos de moduladores de receptores de citocinas incluyen, pero no se limitan a, receptores de citocinas solubles (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor de TNF- α o un fragmento de unión al antígeno del mismo, el dominio extracelular de un receptor de IL-1 β o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el dominio extracelular de un receptor de IL-6 o un fragmento de unión al antígeno del mismo), citocinas o fragmentos de las mismas (por ejemplo, interleucina IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23, TNF- α , TNF- β , interferón (IFN)- α , IFN- β , IFN- γ y GM-CSF), anticuerpos anti-receptor de citocinas (por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de IFN, anticuerpos anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, Zenapax (Protein Design Labs)), anticuerpos anti-receptor de IL-3, anticuerpos anti-receptor de IL-4, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-receptor de IL-9, anticuerpos anti-receptor de IL-10, anticuerpos anti-receptor de IL-12, anticuerpos anti-receptor de IL-13, anticuerpos anti-receptor de IL-15 y anticuerpos anti-receptor de IL-23), anticuerpos anti-citocinas (por ejemplo, anticuerpos anti-IFN, anticuerpos anti-TNF- α , anticuerpos anti-IL-1 β , anticuerpos anti-IL-3, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, ABX-IL-8 (Abgenix)), anticuerpos anti-IL-9, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IL-13, anticuerpos anti-IL-15 y anticuerpos anti-IL-23).

Un modulador de receptores de citocinas es IFN, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12 o un fragmento de unión al antígeno de los mismos. Un modulador de receptores de citocinas es un anticuerpo anti-IL-1 β , anticuerpo anti-IL-6, anticuerpo anti-IL-9, anticuerpo anti-receptor de IL-12 o anticuerpo anti-TNF- α . Un modulador de receptores de citocinas es el dominio extracelular de un receptor de TNF- α o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Puede seleccionarse un agente inmunomodulador para interferir con las interacciones entre los subconjuntos de linfocitos T colaboradores (TH1 o TH2) y linfocitos B para inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos que interfieren con o bloquean las interacciones necesarias para la activación de linfocitos B por linfocitos TH (T colaboradores), y así bloquear la producción de anticuerpos neutralizantes, son útiles como agentes inmunomoduladores en los métodos de la invención. Por ejemplo, la activación de linfocitos B por linfocitos T requiere que se produzcan ciertas interacciones (Durie et al., Immunol. Today, 15(9):406-410 (1994)), tal como la unión del ligando de CD40 sobre el linfocito T colaborador al antígeno CD40 sobre el linfocito B, y la unión de los ligandos de CD28 y/o CTLA4 sobre el linfocito T al antígeno B7 sobre el linfocito B. Sin ambas interacciones, el linfocito B no puede activarse para inducir la producción del anticuerpo neutralizante.

La interacción ligando de CD40 (CD40L)-CD40 es un punto deseable para bloquear la respuesta inmunitaria debido a su amplia actividad en tanto la activación como la función de linfocitos T colaboradores, además de la ausencia de redundancia en su ruta de señalización. Así, en una realización específica de la invención, la interacción de CD40L con CD40 se bloquea transitoriamente en el momento de la administración de uno o más de los agentes inmunomoduladores. Esto puede llevarse a cabo tratando con un agente que bloquea el ligando de CD40 sobre el linfocito TH e interfiere con la unión normal del ligando de CD40 sobre el linfocito T colaborador con el antígeno CD40 sobre el linfocito B. Puede seleccionarse y usarse un anticuerpo para el ligando de CD40 (anti-CD40L) (disponible de Bristol-Myers Squibb Co; véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 555.880, publicada el 18 de agosto de 1993) o una molécula de CD40 soluble como agente inmunomodulador según los métodos desvelados en el presente documento.

Puede seleccionarse un agente inmunomodulador para inhibir la interacción entre linfocitos TH1 y linfocitos T citotóxicos ("CTL") para reducir la aparición de destrucción mediada por CTL. Puede seleccionarse un agente inmunomodulador para alterar (por ejemplo, inhibir o suprimir) la proliferación, diferenciación, actividad y/o función de los linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos específicos para linfocitos T como agentes inmunomoduladores para agotar, o alterar la proliferación, diferenciación, actividad y/o función de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺.

Un agente inmunomodulador que reduce o inhibe una o más actividades biológicas (por ejemplo, la diferenciación, proliferación y/o funciones efectoras) de subconjuntos TH0, TH1 y/o TH2 de linfocitos T colaboradores CD4⁺ se administra a un sujeto con una infección por el RSV según los métodos de la invención. Un ejemplo de un agente inmunomodulador tal es IL-4. IL-4 potencia la actividad específica del antígeno de células TH2 a costa de la función de linfocitos TH1 (véase, por ejemplo, Yokota et al., 1986 Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:5894-5898; y la patente de EE.UU. n° 5.017.691). Otros ejemplos de agentes inmunomoduladores que afectan la actividad biológica (por ejemplo, proliferación, diferenciación y/o funciones efectoras) de linfocitos T colaboradores (en particular, linfocitos TH1 y/o TH2) incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23 e interferón (IFN)- γ .

Un agente inmunomodulador administrado a un sujeto con una infección por el RSV según los métodos desvelados en el presente documento puede ser una citocina que previene la presentación del antígeno. Un agente inmunomodulador usado en los métodos de la invención es IL-10. La IL-10 también reduce o inhibe la acción de macrófagos que implica eliminación bacteriana.

Pueden administrarse uno o más agentes inmunomoduladores a un sujeto con una infección por el RSV antes de, posterior a, o concomitantemente con una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Pueden administrarse uno o más agentes inmunomoduladores en combinación con una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a un sujeto con una infección por el RSV para reducir

o inhibir uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria como se considera necesario por un experto en la materia. Puede usarse cualquier técnica muy conocida para un experto en la materia para medir uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria en un sujeto particular, y así determinar cuándo es necesario administrar un agente inmunomodulador a dicho sujeto. En una realización preferida, se mantiene un recuento de linfocitos absoluto medio de aproximadamente 500 células/mm³, preferentemente 600 células/mm³, 650 células/mm³, 700 células/mm³, 750 células/mm³, 800 células/mm³, 900 células/mm³, 1000 células/mm³, 1100 células/mm³ o 1200 células/mm³ en un sujeto. En otra realización preferida, un sujeto con una infección por el RSV no se administra con un agente inmunomodulador si su recuento de linfocitos absoluto es 500 células/mm³ o menos, 550 células/mm³ o menos, 600 células/mm³ o menos, 650 células/mm³ o menos, 700 células/mm³ o menos, 750 células/mm³ o menos, o 800 células/mm³ o menos.

Pueden administrarse uno o más agentes inmunomoduladores en combinación con una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo a un sujeto con una infección por el RSV de manera que se reduzca o inhiba transitoriamente uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria. Una inhibición o reducción transitoria tal de uno o más aspectos del sistema inmunitario puede durar durante horas, días, semanas o meses. Preferentemente, la inhibición o reducción transitoria en uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria dura durante algunas horas (por ejemplo, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas o 48 horas), algunos días (por ejemplo, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o 14 días) o algunas semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas). La reducción o inhibición transitoria de uno o más aspectos de la respuesta inmunitaria potencia el (los) efecto(s) profiláctico(s) y/o terapéutico(s) de una formulación líquida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Las proteínas, polipéptidos o péptidos (incluyendo anticuerpos) que se utilizan como agentes inmunomoduladores pueden derivarse de las mismas especies que el receptor de las proteínas, polipéptidos o péptidos de manera que se reduzca la probabilidad de una respuesta inmunitaria a aquellas proteínas, polipéptidos o péptidos. Si el sujeto es un ser humano, las proteínas, polipéptidos o péptidos que se utilizan como agentes inmunomoduladores pueden ser humanos o humanizados.

Pueden administrarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas, polipéptidos o péptidos con actividad inmunomoduladora o proteínas, polipéptidos o péptidos con actividad inmunomoduladora a un sujeto con una infección por el RSV según los métodos desvelados en el presente documento. Además, pueden administrarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican derivados, análogos o fragmentos de proteínas, polipéptidos o péptidos con actividad inmunomoduladora, o derivados, análogos o fragmentos de proteínas, polipéptidos o péptidos con actividad inmunomoduladora a un sujeto con una infección por el RSV según los métodos desvelados en el presente documento. Tales derivados, análogos y fragmentos retienen la actividad inmunomoduladora de la proteína natural, polipéptido o péptido de longitud completa.

Agentes que están comercialmente disponibles y son conocidos por funcionar como agentes inmunomoduladores se usan en los métodos desvelados más adelante. La actividad inmunomoduladora de un agente puede determinarse *in vitro* y/o *in vivo* por cualquier técnica muy conocida para un experto en la materia, que incluye, por ejemplo, por ensayos de CCF, ensayos de proliferación e inmunoensayos (por ejemplo, ELISA) para la expresión de proteínas particulares tales como moléculas co-estimulantes y citocinas.

5.6.2 Agentes antiinflamatorios

Puede usarse cualquier agente antiinflamatorio, que incluye agentes útiles en terapias para trastornos inflamatorios, muy conocido para un experto en la materia según métodos desvelados en el presente documento para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Ejemplos no limitantes de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), fármacos antiinflamatorios esteroideos, anticolinérgicos (por ejemplo, sulfato de atropina, metilnitrato de atropina y bromuro de ipratropio (ATROVENT™)), agonistas beta2 (por ejemplo, albuterol (VENTOLIN™ y PROVENTIL™), bitolterol (TORNALATE™), levalbuterol (XOPONEX™), metaproterenol (ALUPENT™), pirbuterol (MAXAIR™), terbutalina (BRETHAIRE™ y BRETHINE™), albuterol (PROVENTIL™, REPETABS™ y VOLMAX™), formoterol (FORADIL AEROLIZER™) y salmeterol (SEREVENT™ y SEREVENT DISKUS™)) y metilxantinas (por ejemplo, teofilina (UNIPHIL™, THEO-DUR™, SLO-BID™ y TEHO-42™)). Ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, aspirina, ibuprofeno, celecoxib (CELEBREX™), diclofenaco (VOLTAREN™), etodolaco (LODINA™), fenoprofeno (NALFON™), indometacina (INDOCIN™), ketorolaco (TORADOL™), oxaprozina (DIAPROT™), nabumetona (RELAFEN™), sulindaco (CLINORIL™), tolmetina (TOLECTIN™), rofecoxib (VIOXX™), naproxeno (ALEVE™, NAPROSYN™), ketoprofeno (ACTRON™) y nabumetona (RELAFEN™). Tales AINE funcionan inhibiendo una enzima ciclooxigenasa (por ejemplo, COX-1 y/o COX-2). Ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, pero no se limitan a, glucocorticoides, dexametasona (DECADRON™), corticosteroides (por ejemplo, metilprednisolona (MEDROL™)), cortisona, hidrocortisona, prednisona (PREDNISONE™ y DELTASONE™), prednisolona (PRELONE™ y PEDIAPRED™), triamcinolona, azulfidina e inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (véase la Tabla 2, más adelante, para ejemplos no limitantes de leucotrieno y dosificaciones típicas de tales agentes)).

5.6.3 Agentes antivirales

Puede usarse cualquier agente antiviral muy conocido para experto en la materia (en particular, uno útil para el tratamiento, prevención, control o mejora de una infección por el RSV) según los métodos desvelados en el presente documento para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Ejemplos no limitantes de agentes antivirales incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas y moléculas pequeñas que inhiben y/o reducen la unión de un virus a su receptor, la internalización de un virus en una célula, la replicación de un virus, o la liberación de virus de una célula. En particular, agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a, análogos de nucleósidos (por ejemplo, zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscarnet, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, alfa-interferones y otros interferones, y AZT.

En realizaciones específicas, el agente antiviral es un agente de anticuerpo distintos de SYNAGIS® que es inmuno-específico para un antígeno viral. Como se usa en el presente documento, el término "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido, polipéptido y proteína del RSV (por ejemplo, glucoproteína F del RSV y glucoproteína G del RSV) que puede provocar una respuesta inmunitaria.

La infección viral es RSV y el antígeno antiviral es un anticuerpo distinto de SYNAGIS® que se une inmuno-específicamente a un antígeno de RSV. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-antígeno del RSV se une inmuno-específicamente a un antígeno del RSV del grupo A de RSV. El anticuerpo anti-antígeno del RSV se une inmuno-específicamente a un antígeno del RSV del grupo B de RSV. El anticuerpo anti-antígeno del RSV se une inmuno-específicamente a un antígeno de RSV de un grupo y reacciona de forma cruzada con el antígeno análogo del otro grupo. El anticuerpo anti-antígeno del RSV se une inmuno-específicamente a una nucleoproteína del RSV, fosfoproteína del RSV, proteína de la matriz del RSV, proteína hidrófoba pequeña del RSV, ARN polimerasa dependiente del ARN del RSV, proteína F del RSV y/o proteína G del RSV. El anticuerpo anti-antígeno del RSV se une a variantes alélicas de una nucleoproteína del RSV, una proteína de la nucleocápside del RSV, una fosfoproteína del RSV, una proteína de la matriz del RSV, una glucoproteína de unión al RSV, una glucoproteína de fusión del RSV, una proteína de la nucleocápside del RSV, una proteína de la matriz del RSV, una proteína hidrófoba pequeña del RSV, una ARN polimerasa dependiente del ARN del RSV, una proteína F del RSV, una proteína L del RSV, una proteína P del RSV y/o una proteína G del RSV.

Terapias antivirales y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en bibliografía tal como Physician's Desk Reference (57ª ed., 2003). Información adicional sobre las infecciones virales respiratorias está disponible en Cecil Textbook of Medicine (18ª ed., 1988).

5.7 Métodos de administración de las formulaciones de SYNAGIS®

Métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma pueden comprender administrar a un sujeto una cantidad eficaz de formulaciones líquidas de la invención. El sujeto puede ser un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, mono tal como un mono cinomolgo y un ser humano). El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto pueden ser un lactante humano o un lactante humano nacido prematuramente.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar una formulación líquida de la presente invención. Los métodos de administrar formulaciones líquidas de SYNAGIS® desveladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración tópica, administración pulmonar y administración a la mucosa (por ejemplo, intranasal y vías orales). Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento se administran intramuscularmente, intravenosamente o subcutáneamente y, preferentemente, intramuscularmente. Las formulaciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador.

La invención también proporciona que una formulación líquida desvelada en el presente documento está envasada en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de SYNAGIS® o fragmentos de unión al antígeno del mismo. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden estar en un envase herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La formulación líquida desvelada en el presente documento puede suministrarse en un envase herméticamente sellado a al menos 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml o 300 mg/ml y, lo más preferentemente, 105 mg/ml, en una cantidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml y, lo más preferentemente, 1,2 ml.

La cantidad de las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento que será eficaz en la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. Por ejemplo, la dosificación de la composición que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de los síntomas asociados a una infección por el RSV puede determinarse administrando la formulación a una rata del algodón, midiendo el título de RSV después de exponer la rata del algodón a 10^5 ufp del RSV y comparando el título de RSV con el obtenido para una rata del algodón que no se administra con la formulación. Por consiguiente, una dosificación que produce una disminución de 2 logaritmos o una reducción del 99 % en el título de RSV en la rata del algodón expuesta a 10^5 ufp del RSV con respecto a la rata del algodón expuesta a 10^5 ufp del RSV, pero no administrada con la formulación, es la dosificación de formulación que puede administrarse a un ser humano para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. La dosificación de formulación que será eficaz en la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma puede determinarse administrando la formulación a un modelo animal (por ejemplo, una rata del algodón o mono) y midiendo el título en suero de SYNAGIS® o fragmentos de unión al antígeno del mismo. Por consiguiente, una dosificación de formulación que produce un título en suero de al menos 1 µg/ml, preferentemente 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, al menos 35 µg/ml, al menos 40 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 75 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 400 µg/ml o al menos 450 µg/ml, puede administrarse a un ser humano para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos.

La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la infección por el RSV, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas del sistema de prueba de modelos *in vitro* o animales (por ejemplo, la rata del algodón o mono cinomolgo).

Para anticuerpos (por ejemplo, SYNAGIS®), proteínas, polipéptidos, péptidos y proteínas de fusión, la dosificación administrada a un paciente es normalmente aproximadamente 1 mg/kg a 30 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 10 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferentemente 15 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Así, frecuentemente son posible menores dosificaciones de anticuerpos humanos y administración menos frecuente. Además, la dosificación, volumen y frecuencia de administración de las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento pueden reducirse aumentando la concentración de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en las formulaciones, aumentando la afinidad y/o avidez de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y/o aumentando la semivida de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Dosis a modo de ejemplo de una molécula pequeña incluyen cantidades de miligramo o microgramo de la molécula pequeña por kilogramo de sujeto o peso de muestra (por ejemplo, aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo).

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una formulación líquida estable de la presente invención para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para disminuir los títulos del RSV. Una cantidad eficaz de las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento reduce los títulos del RSV en el pulmón como se mide, por ejemplo, por la concentración de RSV en muestras de esputo o un lavado de los pulmones de un mamífero. Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una formulación líquida desvelada en el presente documento para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, se administra con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, o 0,5 mg/kg o menos de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 1 µg/ml, preferentemente al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 30 µg/ml, al menos 35 µg/ml, al menos 40 µg/ml 20 días (preferentemente 25, 30, 35, 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior. Una formulación líquida desvelada en el presente documento comprende SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo y puede administrarse a un sujeto una primera dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg para inducir un título en suero de aproximadamente 40 µg/ml o mayor 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior. Preferentemente, el título en suero de dicho SYNAGIS® o un

fragmento de unión al antígeno del mismo es inferior a 50 µg/ml 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos o 0,5 mg/kg o menos de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 1 µg/ml, preferentemente al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml o al menos 25 µg/ml 20 días (preferentemente 25, 30, 35, 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de dosis posteriores. Preferentemente, el título en suero de dicho SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo es inferior a 30 µg/ml 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos o 0,5 mg/kg o menos de una forma modificada de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma que tiene una elevada semivida *in vivo* en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 1 µg/ml, preferentemente al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml o al menos 25 µg/ml 25 días (preferentemente 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior. Preferentemente, el título en suero de dicho SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo es inferior a 30 µg/ml 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos o 0,5 mg/kg o menos de un SYNAGIS® modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma que tiene una elevada semivida *in vivo* en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 1 µg/ml, preferentemente al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml o al menos 25 µg/ml 25 días (preferentemente 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior. Preferentemente, el título en suero de dicho SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo es inferior a 30 µg/ml 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de la formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende aproximadamente 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos (preferentemente 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, o 0,5 mg/kg o menos) de una forma modificada de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene una elevada semivida *in vivo* para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 30 µg/ml, preferentemente al menos 35 µg/ml, al menos 40 µg/ml o al menos 50 µg/ml 25 días (preferentemente 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento para administración pulmonar que comprende 30 mg/kg o menos, 15 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, 0,5 mg/kg o menos, o 0,01 mg/kg o menos de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título de al menos 20 ng por mg de proteína de pulmón (preferentemente al menos 40 ng/mg, al menos 60 ng/mg, al menos 80 ng/mg, al menos 50 ng/mg, al menos 75 ng/mg, al menos 100 ng/mg, o al menos 150 ng/mg) en una muestra de entubación o lavado de los pulmones de dicho mamífero 20 días (preferentemente 25, 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior. Preferentemente, el título en suero de dicho SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo es inferior a 100 ng/ml de proteína 30 días después de la administración de la primera dosis y antes de la administración de una dosis posterior.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, o 0,5 mg/kg o menos de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 35 µg/ml, al menos 40 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 80 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 120 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 250 µg/ml o al menos 300 µg/ml 20 días (preferentemente 25, 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis. Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una primera dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende aproximadamente 15 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de

unión al antígeno del mismo para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero de al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 400 µg/ml o al menos 450 µg/ml 20 días (preferentemente 25, 30, 35 ó 40 días) después de la administración de la primera dosis. El término “aproximadamente 15 mg/kg” como se usa en el presente documento se refiere a un intervalo de entre 14 mg/kg y 16 mg/kg.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para la prevención de una infección por el RSV o un síntoma de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero profilácticamente eficaz inferior a 10 µg/ml, inferior a 8 µg/ml, inferior a 5 µg/ml, inferior a 3 µg/ml, inferior a 1 µg/ml, o inferior a 0,5 µg/ml 30 días después de la administración de la dosis, en el que dicho título en suero profilácticamente eficaz es el título en suero que reduce la incidencia de infección por el RSV en el ser humano o el título en suero en una rata del algodón que produce un título de RSV 5 días después de la exposición a 10⁵ ufp del RSV que es el 99 % inferior al título de RSV en la rata del algodón 5 días después de la exposición a 10⁵ ufp del RSV en una rata del algodón no administrada con la dosis antes de la exposición. Preferentemente, la dosis de la composición terapéutica o farmacéutica comprende 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, o 0,5 mg/kg o menos de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Un mamífero, preferentemente un ser humano, puede administrarse con una dosis de una formulación líquida desvelada en el presente documento que comprende SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo para el tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma en una cantidad eficaz para inducir un título en suero terapéuticamente eficaz inferior a 10 µg/ml, inferior a 8 µg/ml, inferior a 5 µg/ml, inferior a 3 µg/ml, inferior a 1 µg/ml, o inferior a 0,5 µg/ml 30 días después de la administración de la dosis, en el que dicho título en suero terapéuticamente eficaz es el título en suero que reduce la gravedad o duración de la infección por el RSV o es el título en suero en una rata del algodón que produce un título del RSV en la rata 5 días después de la exposición a 10⁵ ufp del RSV que es el 99 % inferior al título de RSV 5 días después de la exposición a 10⁵ ufp del RSV en una rata del algodón no administrada con la dosis antes de la exposición. Preferentemente, la dosis de la formulación líquida de la presente invención comprende 12 mg/kg o menos, 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 3 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, o 0,5 mg/kg o menos de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

Las formulaciones desveladas en el presente documento pueden administrarse una vez al mes justo antes de o durante la estación del RSV. Las formulaciones pueden administrarse cada dos meses justo antes de o durante la estación del RSV. Las formulaciones estables desveladas en el presente documento pueden administrarse una vez justo antes de o durante la estación del RSV. El término “estación del RSV” se refiere a la estación cuando es más probable que se produzca la infección por el RSV. Normalmente, la estación del RSV en el hemisferio norte comienza en noviembre y dura hasta abril.

Una formulación líquida que comprende aproximadamente 5 mg/kg o menos (preferentemente 1,5 mg/kg o menos) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede administrarse cinco veces, 3 veces, o 1 a 2 veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano. Pueden administrarse aproximadamente 1,5 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, en las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento, mensualmente cinco veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente. Pueden administrarse 3 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación líquida desvelada en el presente documento mensualmente tres veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente. Pueden administrarse 5 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en una formulación líquida desvelada en el presente documento mensualmente una a dos veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente.

Pueden administrarse 15 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación líquida desvelada en el presente documento a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente cinco veces durante una estación del RSV, en el que dicho SYNAGIS® o fragmento de anticuerpo tiene una elevada semivida *in vivo*. Pueden administrarse aproximadamente 5 mg/kg o menos (preferentemente 1,5 mg/kg o menos) de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la formulación líquida desvelada en el presente documento cinco veces, 3 veces, o 1 a 2 veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano. Pueden administrarse 3 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una elevada semivida *in vivo*, en la formulación líquida desvelada en el presente documento mensualmente tres veces durante una estación del RSV a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente. Pueden administrarse 5 mg/kg de SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene una elevada semivida *in vivo*, en la formulación líquida desvelada en el presente documento a un mamífero, preferentemente un ser humano, intramuscularmente dos veces durante una estación del RSV.

5.8 Ensayos biológicos

5.8.1 Inmunoespecificidad de los anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden caracterizarse en una variedad de formas muy conocidas para un experto en la materia. En particular, los anticuerpos de la invención o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en una formulación líquida desvelada en el presente documento pueden ensayarse para la capacidad para unirse inmunoespecíficamente a un epítipo de un virus respiratorio sincitial. Un ensayo tal puede realizarse en disolución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), sobre perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), sobre chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), sobre bacterias (patente de EE.UU. nº 5.223.409), sobre esporas (patentes de EE.UU. nº 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), sobre plásmidos (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o sobre fago (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310). Puede ensayarse SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo en una formulación líquida desvelada en el presente documento para su especificidad y afinidad.

Puede ensayarse SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo desvelado en el presente documento para la unión inmunoespecífica a un antígeno del RSV y reactividad cruzada con otros antígenos por cualquier método conocido en la técnica. Inmunoensayos que pueden usarse para analizar la unión inmunoespecífica y reactividad cruzada incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación al complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos. Tales ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nuevas York, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad).

5.8.2 Ensayos *in vitro* e *in vivo*

Una formulación líquida o una terapia de combinación desvelada en el presente documento pueden probarse *in vitro* y/o *in vivo* en diversos ensayos o sistemas de modelo animal adecuados para su actividad.

Una formulación líquida desvelada en el presente documento para tratar, controlar, prevenir o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma, puede ensayarse para determinar su capacidad para inhibir la replicación viral o reducir la carga viral en ensayos *in vitro*. Por ejemplo, puede ensayarse la replicación viral por un ensayo en placa tal como se describe, por ejemplo, por Johnson et al., 1997, *Journal of Infectious Diseases* 176:1215-1224 176:1215-1224. Una formulación líquida desvelada en el presente documento, administrada según los métodos de la invención, también puede ensayarse para determinar su capacidad para inhibir o regular por disminución la expresión de polipéptidos virales. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern y RT-PCR para medir en la expresión de polipéptidos virales y/o títulos virales.

Una formulación líquida desvelada en el presente documento puede ensayarse en sistemas de modelo animal adecuados antes de uso en seres humanos. Tales sistemas de modelo animal incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, cerdos, perros, conejos, etc. Puede usarse cualquier sistema animal muy conocido en la técnica. Varios aspectos del procedimiento pueden variar; dichos aspectos incluyen, pero no se limitan a, la pauta temporal de administrar las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) si tales terapias se administran por separado o como una mezcla, y la frecuencia de administración de las terapias.

Pueden usarse modelos animales para evaluar la eficacia de los métodos desvelados en el presente documento para tratar, controlar, prevenir o mejorar una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Modelos animales para infección por el RSV incluyen, pero no se limitan a, aquellos como se describen por, por ejemplo, Piedimonte et al., *Am J Physiol* 1999, 277:L831-L840; McArthur-Vaughan et al., *J. Med. Primatol.* 2002, 31(2):61-73; y Byrd et al., *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25(6): 1363-8. En una realización específica, ratas del algodón se administran con una formulación líquida que comprende SYNAGIS® según los métodos de la invención, se exponen a 10⁵ ufp del RSV, y cuatro o más días después, las ratas se sacrifican y se determina el título de RSV y el título en suero de SYNAGIS®. Por consiguiente, una dosificación que produce una disminución de 2 logaritmos o una reducción del 99 % en el título de RSV en la rata del algodón expuesta a 10⁵ ufp del RSV con respecto a la rata del algodón expuesta a 10⁵ ufp del RSV, pero no administrada con la formulación, es la dosificación de formulación que puede administrarse a un ser humano para el tratamiento, prevención o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Además, en esta realización, los tejidos (por ejemplo, los tejidos de pulmón) de las ratas sacrificadas pueden examinarse para cambios histológicos.

La administración de una formulación líquida desvelada en el presente documento según los métodos de la presente invención puede probarse para su capacidad para reducir el transcurso de tiempo de una infección por el RSV al menos el 25 %, preferentemente al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %. Una formulación líquida desvelada en el presente documento también puede probarse

para su capacidad para aumentar el periodo de supervivencia de seres humanos que padecen una infección por el RSV al menos el 25 %, preferentemente al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %. Además, una formulación líquida de la invención puede probarse para su capacidad para reducir el periodo de hospitalización de un ser humano que padece infección por el RSV al menos el 60 %, preferentemente al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 95 % o al menos el 99 %. Pueden usarse técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia para analizar la función de una formulación líquida de la invención *in vivo*.

Además, puede usarse cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo* conocido para aquellos expertos en la materia para evaluar la utilidad profiláctica y/o terapéutica de una formulación líquida de la invención desvelada en el presente documento para una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma.

5.8.3 Ensayo de toxicidad

La toxicidad y/o eficacia de los protocolos profilácticos y/o terapéuticos desvelados en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Se prefieren las terapias que presentan grandes índices terapéuticos. Aunque pueden usarse terapias que presentan efectos secundarios tóxicos, deberá tenerse cuidado en diseñar un sistema de administración que dirija tales agentes al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el posible daño a las células no infectadas y así reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación de los agentes profilácticos y/o terapéuticos para su uso en seres humanos. La dosificación de tales agentes se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier terapia usada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluyen la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de síntomas) como se ha determinado en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

5.9 Kits

Un envase farmacéutico o kit puede comprender uno o más recipientes llenos de una formulación líquida desvelada en el presente documento para la prevención, tratamiento, control o mejora de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma. Las formulaciones líquidas desveladas en el presente documento comprenden SYNAGIS® o un fragmento de unión al antígeno del mismo recombinantemente fusionado o químicamente conjugado con otro resto, que incluye, pero no se limita a, una proteína heteróloga, un polipéptido heterólogo, un péptido heterólogo, una molécula grande, una molécula pequeña, una secuencia de marcador, un agente de diagnóstico o detectable, un resto terapéutico, un resto de fármaco, un ión metálico radiactivo, un segundo anticuerpo y un soporte sólido.

En el presente documento se desvelan kits que pueden usarse en los métodos anteriores. Un kit puede comprender una formulación líquida desvelada en el presente documento, en uno o más recipientes. Un kit puede comprender una formulación líquida desvelada en el presente documento, en uno o más recipientes, y uno o varios de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para la prevención, control o tratamiento de una infección por el RSV o uno o más síntomas de la misma, en uno o varios de otros recipientes. El kit puede comprender además instrucciones para prevenir, tratar, controlar o mejorar una infección por el RSV (por ejemplo, usando las formulaciones líquidas de la invención solas o en combinación con otro agente profiláctico o terapéutico), además de efectos secundarios e información de dosificación para el método de administración. Opcionalmente asociados a tal(es) recipiente(s) puede estar una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, nota que refleja la autorización por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana.

6. EJEMPLOS

6.1 Ejemplo 1 (Estudio de estabilidad)

Se preparó una formulación de anticuerpo de la presente invención que comprende, en un vehículo acuoso, 25 mM de histidina, 1,6 mM de glicina y SYNAGIS® a pH 6 según el siguiente protocolo:

Para un 1 kg de disolución de tampón: En 800 g de agua se disolvieron 3,875 g de histidina (base libre) y 0,12 g de glicina. El pH se ajustó con HCl 6 N a $6,0 \pm 0,2$. Se añadió agua para llevar la masa total hasta 1,0 kg (c.s.p).

Para la diafiltración: Después de la etapa de cromatografía en el proceso de purificación, SYNAGIS® se concentró a un objetivo de 150 g/l. El producto concentrado se diafiltra en tampón de formulación. El producto formulado se diluyó a una concentración de fabricación diana de 103 ± 3 g/l.

Para un estudio de estabilidad, se prepararon dos formulaciones: una contuvo 105 mg/ml de SYNAGIS® y la otra contuvo 160 mg/ml de SYNAGIS®. La estabilidad de cada formulación se midió usando HPSEC en términos de grados de formación y fragmentación de agregados durante el almacenamiento a 2-8 °C durante hasta 15 meses y a 38-42 °C durante hasta 1 año. Para el análisis de HPSEC, normalmente, se usa la columna TosoHaas G3000WXL con una fase móvil que contiene fosfato de sodio 0,1 M y sulfato de sodio 0,1 M, pH 6,8, a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. Se inyecta una muestra que contiene 250 mg de proteína en un volumen apropiado en la columna y se detectan picos de proteína por UV a 280 nm y/o fluorescencia (280 nm de excitación y 340 nm de emisión).

Los datos mostraron que no hubo aumento detectable en la agregación cuando cada formulación de SYNAGIS® se almacenó a 2-8 °C durante 15 meses como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de agregados durante el almacenamiento a 2-8 °C

Mes	% 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

$\pm 0,1$ % error.

Cuando las formulaciones se almacenaron a 38-42 °C durante 60 días, se observó un aumento de aproximadamente el 1,5 % en el agregado conteniendo la formulación 105 mg/ml de SYNAGIS® y se observó un aumento del 2,0 % conteniendo la formulación 160 mg/ml de SYNAGIS®.

6.2 Ejemplo 2 (Estudio clínico)

La formulación líquida de la presente invención que comprende 100 mg/ml de SYNAGIS® en una disolución acuosa que contiene 25 mM de histidina y 1,6 mM de glicina a pH 6 se prueba para el estudio de seguridad y tolerabilidad en un estudio aleatorizado de doble ciego de grupos paralelos de fase I en dos sitios. Los fármacos del estudio son una formulación líquida (Liq) de SYNAGIS® y la formulación liofilizada (Lio) actualmente autorizada de SYNAGIS®. Se aleatorizarán un total de 48 voluntarios a uno de los cuatro grupos de tratamiento:

GRUPO 1: N=12 3 mg/kg de SYNAGIS® (Liq) en los días de estudio 0 y 30 (IM)
 GRUPO 2: N=12 3 mg/kg de SYNAGIS® (Lio) en los días de estudio 0 y 30 (IM)
 GRUPO 3: N=12 15 mg/kg de SYNAGIS® (Liq) en los días de estudio 0 (IV)
 GRUPO 4: N=12 15 mg/kg de SYNAGIS® (Lio) en los días de estudio 0 (IV)

Se obtendrán las constantes vitales antes y 30 minutos después de cada dosis del fármaco en estudio. Se monitorizarán acontecimientos adversos durante 30 días después de la última dosis del fármaco en estudio y se monitorizarán acontecimientos adversos graves hasta el día del estudio 60.

En el día del estudio 0, se recogerá sangre de todos los voluntarios para la concentración de SYNAGIS® en suero antes de la dosificación, al final de la infusión (grupos de dosis IV solo) y 0,25, 0,5, 1, 4, 8 y 12 horas después de la inyección IM o final de la infusión. Posteriormente, se recogerán diariamente muestras de sangre para la determinación de niveles de SYNAGIS® durante el día del estudio 5 y en los días del estudio 7, 14, 21, 30, 37 (grupos IM solo) y 60. Las muestras de suero para anticuerpos anti-SYNAGIS® se recogerán en los días del estudio 0, 7, 14, 21, 30, 37 (grupos IM solo) y 60. Las muestras para la química del suero y CBC con diferencial y plaquetas, y las muestras de orina para el análisis de orina se recogerán en el día del estudio 0, además de 7 días después de cada dosis de SYNAGIS® (día del estudio 7 para los grupos IV y días del estudio 7 y 37 para los grupos IM). Se realizarán análisis de β HCG en orina en el día de la dosificación ante de cada dosis de SYNAGIS® (día del estudio 0 para los grupos IV y días del estudio 0 y 30 para los grupos IM). Se muestra un diagrama de flujo del estudio en la Fig. 2.

6.2.1 Procedimientos del estudio

A. Selección de voluntarios

Los voluntarios en este estudio serán adultos masculinos o femeninos sanos. El voluntario será aconsejado por un investigador (médico) que tratará las preguntas y cuestiones del voluntario y obtendrá el consentimiento informado

por escrito para la participación en el estudio. El consentimiento informado por escrito se obtendrá antes de realizar los procedimientos del estudio o administración del fármaco en estudio.

a. Criterios de inclusión

Los voluntarios deben cumplir *todos* los siguientes criterios:

1. Hombre o mujer.
2. Edad 18 a 49 años en el momento de la primera dosis del fármaco en estudio.
3. Peso ≤ 150 kg.
4. Consentimiento informado por escrito obtenido del voluntario.
5. Las mujeres sexualmente activas, a menos que quirúrgicamente estériles, deben haber usado un método eficaz para evitar el embarazo (incluyendo anticonceptivos orales o implantados, DIU, preservativo femenino, diafragma con espermicida, capuchón cervical, abstinencia, uso de un preservativo por el compañero sexual o compañero sexual estéril) durante 14 días antes de la primera dosis del fármaco en estudio, deben aceptar continuar usando tales precauciones durante 30 días después de la dosis final del fármaco en estudio y deben tener una prueba de embarazo en suero negativa en el plazo de 2 días antes de la primera dosis del fármaco en estudio.
6. Sano por historia médica y exploración física.
7. Capacidad para completar el periodo de seguimiento de 60 días según se requiera por el protocolo.

b. Criterios de exclusión

Los voluntarios no deben tener *ninguno* de los siguientes:

1. Enfermedad aguda al principio del estudio
2. Fiebre $\geq 99,5$ °F al principio del estudio
3. Cualquier terapia con fármacos en el plazo de 7 días antes del día del estudio 0 (excepto por anticonceptivos)
4. Donación de sangre superior a 400 ml en el plazo de 6 meses del inicio del estudio
5. Receptor de inmunoglobulina o hemoderivados en el plazo de 60 días antes de la entrada en el estudio
6. Receptor de cualquier terapia con fármaco en investigación o vacuna estándar en el plazo de 120 días antes de la primera dosis del fármaco en estudio en este protocolo durante 60 días después de la dosis final del fármaco en estudio
7. Historia de inmunodeficiencia
8. Historia de enfermedad alérgica o reacciones que probablemente vayan a agravarse por cualquier componente del fármaco en estudio
9. Historia médica previa o evidencia de una enfermedad intercurrente que pueda comprometer la seguridad del voluntario en el estudio
10. Prueba de infección con virus de la hepatitis A, B o C o VIH-1
11. Cualquiera de los siguientes en el cribado (debe ser en el plazo de 21 días antes de la entrada en el estudio): CBC: Hgb $< 12,0$ g/dl; WBC $< 4.000/\text{mm}^3$; recuento plaquetario $< 120.000/\text{mm}^3$ (o valores normales de laboratorio); AST, ALT, BUN, creatinina $>$ límite superior del normal; otros valores de laboratorio anormales en el panel de cribado que en la opinión del investigador principal son considerados clínicamente significativos; otros valores de laboratorio anormales en el panel de cribado que en la opinión del investigador principal se considera que pueden confundir el análisis de los resultados del estudio
12. Madre lactante
13. Historia de alcoholismo o toxicomanía en el plazo de los 2 últimos años
14. Evidencia de cualquier enfermedad sistémica con la exploración física

B. Aleatorización

a. Procedimientos de aleatorización voluntarios y asignación del tratamiento

En la visita de cribado, los voluntarios serán evaluados por el investigador principal para evaluar la elegibilidad para la entrada en el estudio. Se mantendrá un registro maestro para todos los voluntarios cribados. Los voluntarios que firman un consentimiento informado y que cumplen los criterios de elegibilidad entrarán en el estudio. Cuando un voluntario llega al sitio del estudio para la aleatorización (día del estudio 0), el investigador confirmará que el voluntario cumple todos los criterios de inclusión y de exclusión. El investigador asignará entonces un número de identificación del paciente (PID). Los números de identificación del paciente se asignarán secuencialmente dentro de cada uno de los sitios del estudio empezando con nº 101 en el sitio 1 y con el nº 201 en el sitio 2. Se considerará que los voluntarios han entrado en el estudio cuando se asigne el PID. Una lista de aleatorización proporcionada al farmacéutico del estudio en cada sitio del estudio contendrá las asignaciones a cada uno de los cuatro grupos de tratamiento para los voluntarios en ese sitio. El investigador notificará a MedImmune por transmisión de fax (fax) al 301-527-4217 que un voluntario se ha aleatorizado. Los voluntarios a los que se les ha asignado un PID y no reciben ningún fármaco en estudio, que reciben una infusión incompleta del fármaco en estudio, que no reciben ambas

inyecciones IM del fármaco en estudio, o que no completan al menos el 50 % de las visitas del estudio, pueden sustituirse a criterio del patrocinador. No se sustituirán los voluntarios que se retiran debido a un acontecimiento adverso o cuyo estado no puede determinarse. Pueden sustituirse los voluntarios que retiraron el consentimiento por motivos distintos de un acontecimiento adverso. A los voluntarios de sustitución se les asignará un nuevo PID. Los voluntarios que son sustituidos continuarán siendo seguidos para seguridad según el protocolo.

b. Cegado

Es un estudio de doble ciego. El cegado se mantendrá para la asignación de voluntarios a la formulación liofilizada o líquida dentro de los grupos IM o IV. Con el fin de mantener el cegado durante la administración de las dos formulaciones de SYNAGIS[®], el farmacéutico del estudio en cada sitio preparará el fármaco en estudio en un sitio físicamente separado de la estación de tratamiento y protegido de la observación del investigador principal o cualquier personal del estudio que participe directamente en la realización del estudio. Para inyección IM, el farmacéutico preparará jeringas de 5 ml de aspecto idéntico que contienen el volumen calculado de tanto SYNAGIS[®] líquido como liofilizado reconstituido. Para infusión IV, el farmacéutico preparará bolsas de infusión de 200 ml de aspecto idéntico que contienen el volumen calculado de tanto SYNAGIS[®] líquido como liofilizado reconstituido. Las etiquetas no identificarán si la jeringa/bolsa contiene SYNAGIS[®] líquido o liofilizado reconstituido. Un monitor independiente que revisará el registro de farmacia solo, el estadístico y el gerente de suministros clínicos en MedImmune, y el farmacéutico del estudio en el sitio del estudio, son los únicos individuos que tendrán acceso a la lista de aleatorización que identifica una asignación del tratamiento del estudio a los voluntarios. Estos individuos no deben revelar la información de aleatorización a nadie. En el supuesto caso de que el tratamiento del estudio para un voluntario sea conocido por el investigador, MedImmune debe ser informado inmediatamente por el investigador. Todos los casos de desenmascaramiento se documentarán en el informe del estudio.

C. Fármaco en estudio

a. Suministros y recuento del fármaco en estudio

El patrocinador proporcionará al investigador cantidades adecuadas de SYNAGIS[®] líquido, SYNAGIS[®] liofilizado y diluyente (agua estéril para inyección). El fármaco en estudio debe almacenarse a 2 °C a 8 °C (36°F a 46°F) y no debe congelarse.

SYNAGIS[®] líquido se proporcionará en viales de 3 ml que contienen 100 mg de producto líquido estéril en un volumen de 1 ml (histidina 25 mM, glicina 1,6 mM, a pH 6,0).

SYNAGIS[®] liofilizado se proporcionará en viales de 5 ml que contienen 100 mg de producto liofilizado estéril que cuando se formula (antes de la liofilización) contiene histidina 25 mM, glicina 1,6 mM y 3 % (peso/volumen) de manitol a pH 6,0.

Se requiere que el farmacéutico del estudio mantenga registros exactos del recuento del fármaco. Tras completarse el estudio, todos los registros del recuento del fármaco en estudio se devolverán al patrocinador. Todo el fármaco en estudio sin usar se devolverá al patrocinador.

b. Pautas de tratamiento

Se emplean las siguientes pautas en el estudio:

GRUPO 1:	N=12	3 mg/kg de SYNAGIS [®] (Liq) en los días del estudio 0 y 30 (IM)
GRUPO 2:	N=12	3 mg/kg de SYNAGIS [®] (Lio) en los días del estudio 0 y 30 (IM)
GRUPO 3:	N=12	15 mg/kg de SYNAGIS [®] (Liq) en el día del estudio 0 (IV)
GRUPO 4:	N=12	15 mg/kg de SYNAGIS [®] (Lio) en el día del estudio 0 (IV)

c. Pedido y preparación del fármaco en estudio

La dosis del fármaco en estudio para administración debe prepararse por el farmacéutico del estudio. La forma de prescripción del fármaco en estudio que indica el PID y el peso corporal del voluntario se enviarán al farmacéutico por el investigador (o representante). Entonces, el farmacéutico del estudio usará esta información para preparar el fármaco en estudio.

Para preparar SYNAGIS[®] líquido o liofilizado para administración, el farmacéutico debe quitar la porción de lengüeta de la cápsula del vial y limpiar el tapón de caucho con 70 % de etanol o equivalente. The vial debe ventilarse. Las dosis para cada voluntario se calcularán como se describe más adelante basándose en el peso del voluntario (al 0,1 kilogramo más próximo) el día que se administra SYNAGIS[®]. La dosis debe redondearse al 0,1 ml más próximo. Todas las preparaciones del fármaco en estudio deben administrarse en el plazo de 6 horas después de entrar en el vial de SYNAGIS[®]. Si no se administran en el plazo de 6 horas debe usarse un nuevo vial o viales.

Preparación de SYNAGIS® líquido

(1) Para inyecciones IM: El volumen requerido de SYNAGIS® líquido (100 mg/ml) se obtendrá reuniendo el contenido de tantos viales como sean necesarios con una jeringa de 5 ml.

Dosis (ml) = [Peso del voluntario (kg) x Nivel de dosis (3 mg/kg) ÷ Concentración de fármaco (100 mg/ml)]
Ejemplo: Un voluntario que pesa 75,6 kg recibe 2,3 ml de SYNAGIS®
 $(75,6 \text{ kg} \times 3 \text{ mg/ml}) \div 100 \text{ mg/ml} = 2,268 \text{ ml}$ (redondeado a 2,3 ml)

(2) Para infusiones IV: El volumen requerido de SYNAGIS® líquido (100 mg/ml) se obtendrá reuniendo el contenido de tantos viales como sean necesarios con una jeringa de 20 ml (o mayor).

Dosis (ml) = [Peso del voluntario (kg) x Nivel de dosis (15 mg/kg) ÷ Concentración de fármaco (100 mg/ml)]
 Este volumen de líquido SYNAGIS® se inyectará entonces en una bolsa de infusión de 200 ml vacía y se diluirá con diluyente 1:4 añadiendo cuatro volúmenes de diluyente a la bolsa para una concentración final de 20 mg/ml de SYNAGIS®.
Ejemplo: Un voluntario que pesa 71,4 kg recibe 10,7 ml de SYNAGIS®
 $[(71,4 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/ml}) \div 100 \text{ mg/ml}] = 10,71 \text{ ml}$ (redondeado a 10,7 ml)
y 42,8 ml de diluyente (4 x 10,7) para un volumen de infusión total de 53,5 ml.

Preparación de SYNAGIS® liofilizado

(1) Para inyecciones IM: Debe añadirse un (1) ml de diluyente lentamente al vial de SYNAGIS® liofilizado para una concentración final de 100 mg/ml de SYNAGIS®. Entonces, el vial debe rodarse suavemente durante 30 segundos para evitar la espumación. SYNAGIS® reconstituido debe reposar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos hasta que se clarifique SYNAGIS®. El volumen requerido de SYNAGIS® liofilizado reconstituido (100 mg/ml) se obtendrá reuniendo el contenido de tantos viales como sean necesarios con una jeringa de 5 ml.

Dosis (ml) = [Peso del voluntario (kg) x Nivel de dosis (3 mg/kg) ÷ Concentración de fármaco (100 mg/ml)]
Ejemplo: Un voluntario que pesa 75,6 kg recibe 2,3 ml de SYNAGIS®
 $(75,6 \text{ kg} \times 3 \text{ mg/ml}) \div 100 \text{ mg/ml} = 2,268 \text{ ml}$ (redondeado a 2,3 ml)

(2) Para infusiones IV: Debe añadirse cinco (5) ml de diluyente lentamente al vial de SYNAGIS® liofilizado para una concentración final de 20 mg/ml de SYNAGIS®. Entonces, el vial debe rodarse suavemente durante 30 segundos para evitar la espumación. SYNAGIS® reconstituido debe reposar a temperatura ambiente durante un mínimo de 20 minutos hasta que se clarifique SYNAGIS®. El volumen requerido de SYNAGIS® liofilizado reconstituido (20 mg/ml) se obtendrá reuniendo el contenido de tantos viales como sean necesarios con una jeringa de 20 ml (o mayor) e inyectando este volumen en una bolsa de infusión de 200 ml vacía.

Dosis (ml) = [Peso del voluntario (kg) x Nivel de dosis (15 mg/kg) ÷ Concentración de fármaco (20 mg/ml)]

Ejemplo: Un voluntario que pesa 71,4 kg recibe 53,6 ml de SYNAGIS®

$(71,4 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/ml}) \div 20 \text{ mg/ml} = 53,55 \text{ ml}$ (redondeado a 53,6 ml)

d. Administración del fármaco en estudio

El fármaco en estudio para los grupos de tratamiento IM y IV se dispensará de la farmacia en jeringas de 5 ml de aspecto idéntico y bolsas de infusión de 200 ml de aspecto idéntico, respectivamente.

Inyección IM

El fármaco en estudio se administrará por inyección IM en el músculo deltoide (después de confirmar que la aguja no está en un vaso sanguíneo) usando técnica aséptica estándar. Los voluntarios permanecerán bajo observación en el sitio del estudio durante al menos 30 minutos después de la inyección.

Infusión IV

Antes de la administración del fármaco se colocará un catéter IV en una vena accesible usando técnicas de inserción estándar. La permeabilidad del catéter IV se mantendrá por una infusión IV continua del 5 % de dextrosa para inyección USP a una tasa de 10 a 25 ml/h. Se interrumpirá la infusión de dextrosa y se infundirá SYNAGIS® a través de un filtro de 0,22 µm de baja unión a proteína a una tasa de aproximadamente 1-2 ml/minuto. Después de administrarse SYNAGIS®, el tubo IV debe lavarse y mantenerse abierto con 5 % de dextrosa para inyección USP a 10 a 25 ml/h hasta que se retire el catéter IV.

e. Medicaciones concomitantes

Todas las medicaciones concomitantes usadas por el voluntario del día del estudio 0 hasta el día del estudio 60 se registrarán en el cuaderno de recogida de datos. Los voluntarios pueden no recibir lo siguiente:

- 5 1. Medicación inmunosupresora (se permiten corticosteroides inhalados y tópicos).
2. Agentes en investigación 120 días antes de la entrada en el estudio hasta el día del estudio 60.

10 El patrocinador puede ser informado si cualquier voluntario recibe medicaciones concomitantes prohibidas. Los voluntarios pueden recibir medicaciones para tratar acontecimientos adversos según se considere necesario por el investigador o el médico de los voluntarios.

D. Programa de evaluaciones de voluntarios

15 Todos los voluntarios a los que se les asignó un PID y reciban cualquier fármaco en estudio serán seguidos según el protocolo independientemente del número de dosis de fármaco en estudio recibidas, a menos que se retire el consentimiento para el seguimiento. El patrocinador debe ser informado de todas las desviaciones de las visitas o evaluaciones del protocolo y estas evaluaciones, si son aplicables, deben reprogramarse o realizarse en el momento más próximo posible al programa original.

20 Se indicará a los voluntarios que llamen al personal del estudio para informar cualquier anomalía durante los intervalos entre las visitas del estudio y a ir al sitio del estudio si se necesita evaluación médica y lo permite la urgencia de la situación. Para visitas de emergencia y otras no programadas a una instalación médica distinta del sitio del estudio, las historias clínicas se obtendrán por el investigador. En la Tabla 4 se presenta un programa de
25 cribado y procedimientos de visita durante el estudio, seguido de una descripción detallada de cada visita.

Tabla 4 Programa de evaluaciones de voluntarios

	Cribado	Día del estudio											
		0	1	2	3	4	5	7	14	21	30	37	60
Consentimiento informado por escrito	x												
Verificar los criterios de elegibilidad	x	x											
Historia médica	x												
Exploración física	x												
Altura y peso corporal ^g	x	x									x ^d		
Análisis de orina	x	x						X				x ^d	
Hepatitis A, B, C	x												
βHCG en suero ^b	x												
βHCG en orina ^b		x									x ^d		
Química del suero ^c	x	x						X				x ^d	
CBC, diferencial, plaquetas	x	x						X				x ^d	
Nivel en suero de SYNAGIS [®]		x ^a	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x ^d	x
Anticuerpo anti-SYNAGIS [®]		x						X	x	x	x	x ^d	x
Constantes vitales ^e		x									x ^d		
Aleatorización/asignación de PID		x											
Inyección del fármaco en estudio (grupos IM)		x									x ^d		
Infusión del fármaco en estudio (grupos IV)		x											
Evaluación de acontecimientos adversos ^f		x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x ^d	x

- a. La sangre se muestreará para concentración en suero de SYNAGIS® antes de la dosificación, al final de la infusión (grupos de dosis IV solo) y 0,25, 0,5, 1, 4, 8 y 12 horas después de la inyección/final de la infusión.
- b. Mujeres solo.
- c. ALT, AST, BUN, creatinina.
- d. Grupos de dosis IM solo.
- e. Constantes vitales obtenidas antes y 30 minutos después de cada dosis.
- f. Acontecimientos adversos durante 30 días después de cada dosis. Acontecimientos adversos graves durante el día del estudio 60.
- g. Peso corporal solo en el día del estudio 30.

a. Cribado

Nota: Todas las evaluaciones de laboratorio del cribado deben realizarse en el plazo de 21 días antes de la entrada en el estudio (día del estudio 0). Las evaluaciones del cribado pueden llevarse a cabo durante más de una visita.

1. Consentimiento informado por escrito
2. Verificar los criterios de elegibilidad
3. Historia médica del cribado
4. Exploración física del cribado
5. Altura y peso corporal
6. Análisis de orina
7. Extracción de sangre para el cribado
 - Suero para anticuerpo para hepatitis A, antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpo para hepatitis C
 - βHCG en suero (voluntarias femeninas solo)
 - Panel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC con recuento diferencial y de plaquetas

Día del estudio 0: Dosis 1

Visita 1

1. Verificar los criterios de elegibilidad
2. Altura y peso corporal
3. Análisis de orina
4. βHCG en orina (voluntarias femeninas solo)
5. Extracción de sangre inicial
 - Panel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC con recuento diferencial y de plaquetas
 - Suero para nivel de SYNAGIS®
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS®
6. Aleatorización y asignación de PID
7. Constantes vitales antes de la administración del fármaco en estudio (temperatura, tensión arterial, frecuencia del pulso, frecuencia respiratoria)

Nota: Todo lo anterior debe completarse antes de la administración del fármaco en estudio.

1. Administración del fármaco en estudio
2. Monitorización de las constantes vitales 30 minutos después de la inyección o final de la infusión
3. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves
4. Extracción de sangre después de la dosis
 - Suero para niveles de SYNAGIS® inmediatamente después de completarse la infusión (grupos de dosis IV solo) y 0,25, 0,5, 1, 4, 8 y 12 horas después de la inyección/final de la infusión

Día del estudio 1: Muestreo farmacocinético de la dosis 1

Visita 2

1. Extracción de sangre después de la dosis para el nivel en suero de SYNAGIS® a las 24 horas
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

Día del estudio 2: Muestreo farmacocinético de la dosis 1

Visita 3

1. Extracción de sangre después de la dosis para el nivel en suero de SYNAGIS® a las 48 horas
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

Día del estudio 3: Muestreo farmacocinético de la dosis 1

5

Visita 4

1. Extracción de sangre después de la dosis para el nivel en suero de SYNAGIS® a las 72 horas
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

10

Día del estudio 4: Muestreo farmacocinético de la dosis 1

Visita 5

- 15 1. Extracción de sangre después de la dosis para el nivel en suero de SYNAGIS® a las 96 horas
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

Día del estudio 5: Muestreo farmacocinético de la dosis 1

20

Visita 6

1. Extracción de sangre después de la dosis para el nivel en suero de SYNAGIS® a las 120 horas
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

25

Día del estudio 7:

Visita 7

- 30 1. Análisis de orina
2. Extracción de sangre
 - Panel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC con recuento diferencial y de plaquetas
 - Suero para nivel de SYNAGIS®
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS®
- 35 3. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

Día del estudio 14 ± 1:

Visita 8

40

1. Extracción de sangre
 - Suero para nivel de SYNAGIS®
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS®
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

45

Día del estudio 21 ± 1:

Visita 9

- 50 1. Extracción de sangre
 - Suero para nivel de SYNAGIS®
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS®
2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

55

Día del estudio 30 ± 1:

Visita 10

Todos los voluntarios

60

1. Extracción de sangre
 - Suero para nivel de SYNAGIS®
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS®
 2. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves
- Voluntarios en grupos IM solo

65

3. Peso corporal

4. Orina β HCG
5. Constantes vitales antes de la administración del fármaco en estudio
6. Administración de fármaco en estudio
7. Monitorización de constantes vitales 30 minutos después de la inyección

5

Día del estudio 37 $\pm$ 1:

Visita 11

10 Voluntarios en grupos IM solo

1. Análisis de orina
2. Extracción de sangre
 - Panel de química (AST, ALT, BUN, creatinina)
 - CBC con recuento diferencial y de plaquetas
 - Suero para nivel de SYNAGIS[®]
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS[®]
3. Monitorización de acontecimientos adversos y acontecimientos adversos graves

15

Día del estudio 60 $\pm$ 2:

20

Visita 12

1. Extracción de sangre
 - Suero para nivel de SYNAGIS[®]
 - Suero para anticuerpo anti-SYNAGIS[®]
2. Monitorización de acontecimientos adversos graves

25

E. Métodos de evaluación de voluntarios

30

a. Evaluaciones de laboratorio rutinarias

Se realizarán pruebas de laboratorio rutinarias durante el cribado y durante el estudio en cada laboratorio clínico local del sitio del estudio. Se realizarán análisis de orina y pruebas de embarazo durante el estudio en el sitio del estudio usando una prueba autorizada. Los resultados de laboratorio anormales deben repetirse tan pronto como sea posible (preferentemente en el plazo de 24-48 horas).

35

b. Evaluaciones farmacocinéticas e inmunológicas

Se medirán la concentración en suero de SYNAGIS[®] y anticuerpos anti-SYNAGIS[®] por MedImmune, Inc. por ELISA.

40

F. Completitud del estudio y pérdida de seguimiento

Se considerará que los voluntarios han completado el estudio si se siguieron hasta el día del estudio 60. Debe especificarse en el cuaderno de recogida de datos si el voluntario completó o no los procedimientos de seguimiento del estudio hasta el día del estudio 60. Se considerará que los voluntarios se perdieron para el seguimiento solo si no se ha establecido contacto en el momento en el que el estudio se completa de forma que haya información insuficiente para determinar el estado del voluntario en el día del estudio 60. El investigador debe documentar los intentos por restablecer el contacto con voluntarios desaparecidos durante todo el periodo del estudio. Si se restablece el contacto con un voluntario desaparecido, el seguimiento debe reanudarse según el protocolo.

50

Se harán evaluaciones farmacocinéticas e inmunológicas basándose en la concentración en suero de SYNAGIS[®] y anticuerpos anti-SYNAGIS[®] medidos por ELISA.

Equivalentes

55

Aquellos expertos en la materia reconocerán, o pueden determinar usando no más de la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

La citación o discusión de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que tal sea el estado de la técnica para la presente invención.

60

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune, LLC

65

<120> Formulaciones de anticuerpos anti-RSV líquidas estabilizadas

<130> Documento PC/PG431000EPB

<150> 60/388.921
 5 <151> 14-06-2002

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 1

Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
 1 5

<210> 2
 20 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

45 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

60 Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una formulación de palivizumab acuosa estable de alta concentración, que comprende:

- (a) concentrar una fracción purificada de palivizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo a una concentración final de aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml o aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o 200 mg/ml, usando una membrana semipermeable y diafiltrar el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab concentrado en un tampón de formulación que comprende 10 mM a 50 mM de histidina y menos de 3 mM de glicina, en el que el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab está en una fase acuosa durante la preparación de la formulación de palivizumab acuosa estable, y en el que la formulación acuosa de alta concentración es estable a 38 °C a 42 °C durante al menos 60 días como se evalúa por cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HPSEC); o
- (b) concentrar una fracción purificada de palivizumab o un fragmento de unión al antígeno del mismo a una concentración final de aproximadamente 150 mg/ml y diafiltrar el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab concentrado en un tampón de formulación que comprende 25 mM de histidina y 1,6 mM de glicina, en el que el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab está en una fase acuosa durante la preparación de la formulación de palivizumab acuosa estable, y en el que la formulación acuosa de alta concentración es estable a 2 °C a 8 °C durante al menos 15 meses como se evalúa por HPSEC.

2. El proceso de la reivindicación 1a, en el que el tampón de formulación comprende aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM de histidina, aproximadamente 23 mM a aproximadamente 27 mM de histidina, o aproximadamente 25 mM de histidina.

3. El proceso de las reivindicaciones 1a o 2, en el que el tampón de formulación comprende menos de 2 mM de glicina o 1,6 mM de glicina.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación acuosa estable tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, o un pH de aproximadamente 6,0.

5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el proceso comprende además la esterilización de la formulación de palivizumab acuosa estable de alta concentración.

6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el proceso comprende la purificación del fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab de medio acondicionado antes concentrar el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab y diafiltrar el fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab concentrado en el tampón de formulación.

7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración se prepara como una dosificación unitaria que contiene 1 ml.

8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1a o 2 a 6, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración comprende al menos 85 mg/ml, al menos 90 mg/ml, al menos 95 mg/ml o al menos 100 mg/ml del fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab.

9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1a o 2 a 6, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración comprende 95 mg/ml o 100 mg/ml de fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab.

10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración comprende 103 ± 3 mg/ml de fragmento de unión al antígeno de palivizumab o palivizumab.

11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración está sustancialmente libre de tensioactivos y sales inorgánicas.

12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración está sustancialmente libre de otros excipientes.

13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración no comprende manitol.

14. El proceso de la reivindicación 1b, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración es estable a 2 °C a 8 °C durante 15 meses como se evalúa por HPSEC.

15. El proceso de la reivindicación 1(b), en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración es estable a 38-42 °C durante 60 días como se evalúa por HPSEC.
- 5 16. El proceso de las reivindicaciones 1a o 2 - 14, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración es estable a 2 °C a 8 °C durante al menos 3 años como se evalúa por HPSEC.
17. El proceso de la reivindicación 1a, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración es estable a 38 °C a 42 °C durante no más de 120 días como se evalúa por HPSEC.
- 10 18. El proceso de las reivindicaciones 1a, 2 - 13, 16 ó 17, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración es estable a 20 °C a 24 °C durante al menos 1 año como se evalúa por HPSEC.
- 15 19. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración contiene no más del 3 % de agregación en peso de proteína como se mide por HPSEC.
- 20 20. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la formulación de palivizumab acuosa estable a alta concentración contiene igual o más del 98 % de la proteína total en un pico individual como se ha determinado por HSPEC y no contiene otros picos individuales que tengan más del 2 % de proteína total cada uno.
21. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que no implica una etapa de secado.

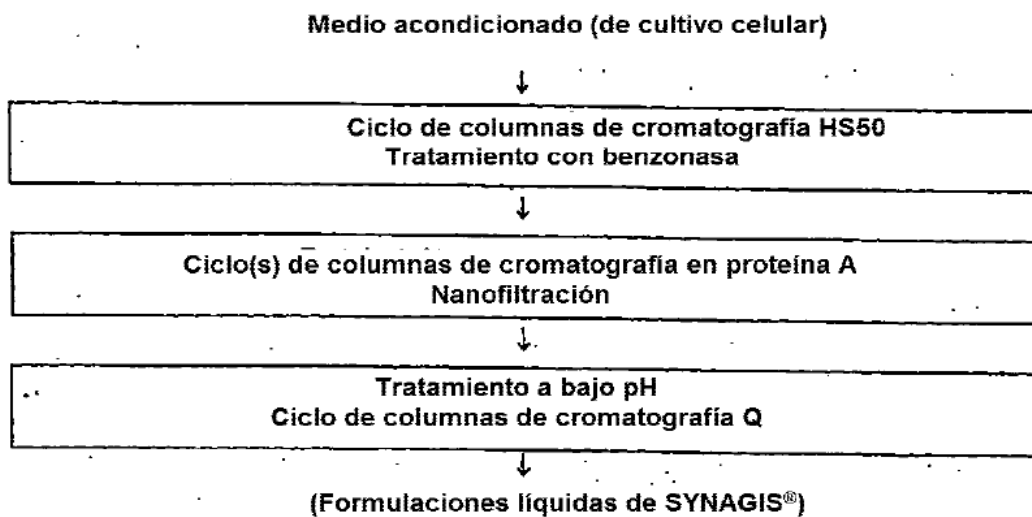


Fig. 1

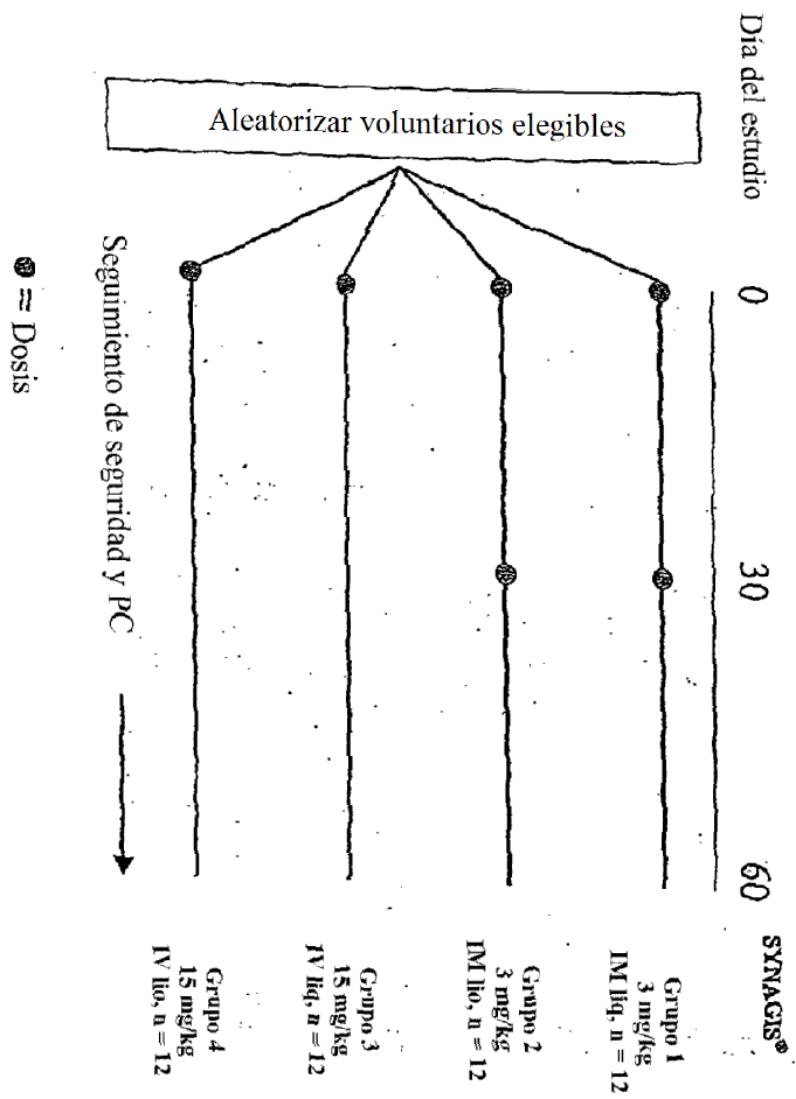


Fig. 2