



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014008864-0 B1



(22) Data do Depósito: 31/10/2012

(45) Data de Concessão: 09/11/2021

(54) Título: FORMULAÇÕES, SEU USO E ARTIGO DE MANUFATURA

(51) Int.Cl.: C07K 16/00.

(30) Prioridade Unionista: 31/10/2011 US 61/553,916.

(73) Titular(es): GENENTECH, INC.

(72) Inventor(es): AJAY DESHMUKH; JOUMANA ZEID; THOMAS M SCHERER.

(86) Pedido PCT: PCT US2012062572 de 31/10/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/066866 de 10/05/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/04/2014

(57) Resumo: FORMULAÇÕES, ARTIGO DE MANUFATURA, MÉTODO DE TRATAMENTO DA ASMA, MÉTODO DE TRATAMENTO DA FIBROSE PULMONAR IDIOPÁTICA, MÉTODO PARA A ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA DE UMA FORMULAÇÃO E USO DE UMA FORMULAÇÃO. São fornecidas formulações compreendendo um anticorpo anti-IL-13, incluindo formulações farmacêuticas e métodos de utilização de tais formulações.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
“FORMULAÇÕES, SEU USO E ARTIGO DE MANUFATURA”

REFERÊNCIA CRUZADA PARA OS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente Provisório US 61/553,916, depositado em 31 de outubro de 2011, cuja divulgação é integralmente incorporada ao presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] São fornecidas formulações compreendendo um anticorpo anti-IL-13, incluindo formulações farmacêuticas e métodos de utilização de tais formulações.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

[003] O presente pedido contém uma lista de sequências que foi submetida no formato ASCII via EFS-Web e que está integralmente incorporada a presente pela referência. A referida cópia ASCII, criada em 4 de outubro de 2012 é nomeada P4786R1W.txt e tem 22.776 bytes de tamanho.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] A interleucina (IL-)13 é uma citoquina pleiotrópica de células T auxiliares (*helper*) da subclasse 2 (Th2). Foi postulado que a IL13 pode desempenhar um papel mais importante do que as outras citocinas Th2 nas funções efetoras associadas com os sintomas da asma (Corry, *Curr. Opin. Immunol*, 11: 610 (1999)). Anticorpos humanizados anti-IL-13 foram descritos. Vide, por exemplo, a publicação Internacional 2005/062967. Um anticorpo anti-IL13 específico, o lebrikizumab, foi clinicamente investigado para o tratamento de pacientes com asma mal controlada. Alguns destes resultados foram descritos em Corren *et al.*, *N Engl J Med* 365 (12) :1088-98 (2011).

[005] Pelo fato de proteínas, incluindo anticorpos, serem maiores e mais complexas do que as drogas orgânicas e inorgânicas tradicionais

(por exemplo, as que possuem múltiplos grupos funcionais além de estruturas tridimensionais complexas), a formulação de tais proteínas apresenta problemas especiais. Por que uma proteína permaneça biologicamente ativa, uma formulação deve preservar intacta a integridade de conformação de pelo menos uma sequência central dos aminoácidos da proteína e, ao mesmo tempo, proteger da degradação os múltiplos grupos funcionais da proteína. As vias da degradação de proteínas podem envolver a instabilidade química (por exemplo, qualquer processo que envolva a modificação da proteína pela formação de ligação ou clivagem, resultando em uma nova entidade química) ou instabilidade física (por exemplo, alterações na estrutura de ordem superior da proteína). A instabilidade química pode resultar a partir da desamidação, racemização, hidrólise, oxidação, beta eliminação ou troca de dissulfeto. A instabilidade física pode resultar da desnaturação, agregação, precipitação ou adsorção, por exemplo. As três vias de degradação de proteínas mais comuns são; agregação, desamidação e oxidação da proteína. Cleland *et al Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

[006] As formulações líquidas de anticorpos em alta concentração (por exemplo, > 100 mg/mL) são desejáveis, por exemplo, para as vias de administração terapêutica ou para aplicações terapêuticas em que são aconselháveis pequenos volumes de medicamento, por exemplo, na injeção subcutânea. As formulações de anticorpos de alta concentração, no entanto, colocam vários desafios e problemas. Um dos problemas é a instabilidade devido à formação de partículas. Com formulações líquidas reconstituídas, este problema tem sido tratado pelo uso de tensoativos (por exemplo, um polissorbato), mas acredita-se que os tensoativos são muitas vezes inadequados para formulações líquidas, pois requerem um difícil processamento adicional. Além disso, tensoativos ainda não reduzem o aumento da viscosidade causada

como resultado de numerosas interações intermoleculares da natureza macromolecular dos anticorpos.

[007] Embora tenha sido demonstrado que os tensoativos reduzem significativamente o grau de formação de partículas de proteínas, eles não abordam o problema do aumento da viscosidade que dificulta a manipulação e administração das formulações de anticorpos concentrados. Os anticorpos tendem a formar soluções viscosas quando em alta concentração devido à sua natureza macromolecular e o potencial de interações intermoleculares. Além disso, açúcares farmacologicamente aceitáveis são muitas vezes utilizados como estabilizantes. Tais açúcares podem melhorar as interações intermoleculares, aumentando assim a viscosidade da formulação. As formulações altamente viscosas são difíceis de fabricar, de serem extraídas para uma seringa e de serem injetadas subcutaneamente. O uso da força na manipulação das formulações viscosas leva a formação excessiva de espuma, o que pode levar à desnaturação e inativação de produtos biológicos ativos.

[008] Algumas formulações de anticorpos de alta concentração já foram descritas. Vide, por exemplo, as Publicações Internacionais nºs 2006/065746 e 2002/30463. Estas publicações não descrevem especificamente alta concentração de anticorpos anti-IL13.

[009] Seria altamente vantajoso dispor de formulações que contenham um anticorpo anti-IL-13 com estabilidade prolongada e baixa viscosidade em altas concentrações de anticorpo. As formulações em alta concentração de anticorpo possuindo tais propriedades seriam altamente vantajosas para determinadas vias de administração, por exemplo, para a administração subcutânea. As formulações fornecidas na presente invenção atendem estas necessidades e proporcionam outros benefícios úteis.

[010] Todas as referências citadas no presente, incluindo patentes

e publicações, são integralmente incorporadas ao presente pela referência em sua totalidade para qualquer finalidade.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[011] As composições da invenção são baseadas, pelo menos em parte, na constatação de que o anticorpo anti-IL13 aqui descrito, o lebrikizumab, pode ser formulado em altas concentrações (> 100 mg/mL) em um tampão histidina contendo poliol e tensoativo e que tal formulação em alta concentração de anticorpo é de baixa viscosidade, possuindo uma estabilidade física e química prolongada e retém a potência. As composições ou formulações da invenção são úteis para, por exemplo, tratar a asma e outras doenças pulmonares como a fibrose pulmonar idiopática e determinadas doenças alérgicas, autoimunes e outros distúrbios inflamatórios. Além disso, esta formulação pode ser embalada em dispositivos para a administração subcutânea, tal como descrito no presente, com a manutenção, por exemplo, da estabilidade do produto e de outros atributos desejáveis.

[012] Conseqüentemente, em um aspecto da invenção, é fornecida uma formulação que compreende um anticorpo anti-IL13. Em determinados exemplos de realização, a concentração do anticorpo na formulação é de pelo menos 100 mg/mL e a viscosidade da formulação é inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C. Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 125 mg/mL. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 150 mg/mL.

[013] Em outro aspecto, a formulação compreende o tampão acetato de histidina, pH 5,4 a 6,0, e a concentração de acetato de histidina no tampão está entre 5 mM e 40 mM. Em determinados exemplos de realização, a formulação compreende um poliol e um tensoativo e a concentração do poliol na formulação está entre 100 mM e 200 mM e a concentração de tensoativo na formulação está entre 0,01% e 0,1%. Em determinados exemplos de realização, o poliol é sacarose e o tensoativo é polissorbato 20. Em determinados exemplos de realização, o tampão acetato de histidina é de pH 5,7 e a concentração de acetato de histidina no tampão é de 20 mM, e a concentração de sacarose na formulação é de 175 mM e a concentração de polissorbato 20 é de 0,03%. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 125 mg/mL ou 150 mg/mL.

Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[014] Em outro aspecto, a formulação compreende um anticorpo anti-IL13 em um tampão acetato de histidina, pH 5,4 a 6,0, e a concentração de acetato de histidina no tampão está compreendida entre 5 mM e 40 mM e a concentração de anticorpo na formulação é de pelo menos 100 mg/mL. Em determinados exemplos de realização, a formulação compreende ainda um poliol e um tensoativo e a concentração do poliol na formulação está entre 100 mM e 200 mM e a concentração de tensoativo na formulação está entre 0,01% e 0,1%. Em um exemplo de realização, o poliol é sacarose e o tensoativo é polissorbato 20. Em um exemplo de realização, o tampão acetato de histidina é pH 5,7 e a concentração de acetato de histidina no tampão é de 20 mM, e a concentração de sacarose na formulação é de 175 mM e a concentração de polissorbato 20 é de 0,03%. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada

possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, a formulação tem uma viscosidade inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 125 mg/mL. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 150 mg/mL.

[015] Em outro aspecto, é fornecida uma formulação que compreende um anticorpo anti-IL13 possuindo estabilidade prolongada. Em determinados exemplos de realização, a concentração do anticorpo é de pelo menos 100 mg/mL e a viscosidade da formulação é inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é estável durante pelo menos um ano a 5 °C. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é estável durante pelo menos dois anos a 5 °C. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é estável durante três anos a 5 °C. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é estável durante pelo menos quatro semanas a 25 °C, ou pelo menos 8 semanas a 25 °C, ou pelo menos 12 semanas a 25

°C, ou durante 26 semanas a 4 °C. Em um exemplo de realização, a formulação compreende o tampão acetato de histidina, pH 5,4 a 6,0, e a concentração de acetato de histidina no tampão está entre 5 mM e 40 mM. Em um exemplo de realização, a formulação compreende ainda um poliol e um tensoativo e a concentração do poliol na formulação está entre 100 mM e 200 mM e a concentração de tensoativo na formulação está entre 0,01% e 0,1%. Em um exemplo de realização, o poliol é sacarose e o tensoativo é polissorbato 20. Em um exemplo de realização, o tampão acetato de histidina é pH 5,7 e a concentração de acetato de histidina no tampão é de 20 mM, e a concentração de sacarose na formulação é de 175 mM e a concentração de polissorbato 20 é de 0,03%. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo é de 125 mg/mL ou 150 mg/mL. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[016] Ainda em outro aspecto, é fornecida uma formulação compreendendo um anticorpo anti-IL13 possuindo estabilidade prolongada em tampão acetato de histidina 20 mM, pH 5,7, sacarose 175 mM, 0,03% de polissorbato 20. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo na formulação é de 125 mg/mL e a viscosidade da formulação é inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C. Em um exemplo de realização, a concentração de anticorpo na formulação é de 150 mg/mL e a viscosidade da formulação é inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13

compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

[017] Ainda em outro aspecto, é fornecido um artigo manufaturado compreendendo um dispositivo de administração subcutânea. Em determinados exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea entrega a um paciente uma dose fixa de um anticorpo anti-IL13. Em um exemplo de realização, a dose fixa é de 37,5 mg de anticorpo anti-IL13. Em um exemplo de realização, a dose fixa é de 75 mg de anticorpo anti-IL13. Em um exemplo de realização, a dose fixa é de 125 mg de anticorpo anti-IL13. Em um exemplo de realização, a dose fixa é de 150 mg de anticorpo anti-IL13. Em determinados exemplos de realização, o anticorpo anti-IL13 é o lebrikizumab. O anticorpo anti-IL 13 no dispositivo de administração subcutânea é formulado em um tampão com outros excipientes, tal como descrito acima de modo que ele é fornecido em uma formulação farmacêutica estável. Em certos exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea é uma seringa pré-carregada compreendendo um cilindro de vidro, uma

haste de êmbolo que compreende um êmbolo e uma agulha. Em certos exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende ainda uma proteção da agulha e, opcionalmente, um dispositivo que protege a agulha. Em determinados exemplos de realização, o volume da formulação contida na seringa pré-carregada é de 0,3 mL, 1 mL, 1,5 mL ou 2,0 mL. Em certos exemplos de realização, a agulha é uma agulha incorporada que compreende uma ponta com bisel trifacetado ou uma ponta com bisel de 5 facetas. Em determinados exemplos de realização, a agulha é de calibre (*gauge* - G) 25G e 30G e tem entre 1/2 polegada de comprimento e 5/8 polegadas de comprimento. Em um exemplo de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende uma seringa de 1,0 mL de vidro borossilicato com baixo teor de tungstênio (tipo I) pré-carregada e uma agulha incorporada de aço inoxidável com bisel de 5 facetas, calibre de 27G 1/2 polegada de comprimento de parede fina. Em alguns exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende um protetor de agulha rígido. Em certos exemplos de realização, o protetor de agulha rígido compreende uma formulação de borracha com baixo teor de zinco. Em um exemplo de realização, a proteção de agulha é rígida e compreende um componente elastomérico, FM27/0, e um protetor rígido de polipropileno. Em certos exemplos de realização, a haste do êmbolo compreende um êmbolo de borracha. Em alguns exemplos de realização, o êmbolo de borracha compreende borracha 4023/50 e revestimento de FluroTec[®] etileno-tetrafluoroetileno (ETFE). Em certos exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende um dispositivo de segurança para a agulha. Dispositivos de segurança para a agulha exemplares incluem, mas não estão limitados a, *Ultrasafe Passive[®] Needle Guard X100L* (Safety Syringes, Inc.) e *Rexam Safe n Sound[®]* (Rexam).

[018] Ainda em outro aspecto, é fornecido um método para tratar

a asma em um paciente. Em determinados exemplos de realização, o método compreende a administração de uma quantidade eficaz de qualquer uma das formulações referidas acima. Em certos exemplos de realização, a quantidade eficaz é de 0,3 mL, meio mL, um mL ou dois mL, ou cerca de 0,3 mL, cerca de meio mL, cerca de um mL ou cerca de dois mL. Em outro aspecto, é fornecido um método de tratamento da fibrose pulmonar idiopática em um paciente. Em determinados exemplos de realização, o método compreende a administração de uma quantidade eficaz de qualquer uma das formulações referidas acima. Em certos exemplos de realização, a quantidade eficaz é de meio mL, um mL ou dois mL, ou aproximadamente meio mL, aproximadamente um mL ou aproximadamente dois mL.

[019] Ainda em outro aspecto, são fornecidos métodos de administração subcutânea e uma formulação que compreende o anticorpo anti-IL13. Tais métodos compreendem a administração subcutânea de qualquer uma das formulações de anticorpos anti-IL13 descritos acima. Em certos exemplos de realização, os métodos compreendem um dispositivo de administração subcutânea de acordo com qualquer um dos dispositivos descritos acima.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[020] A Figura 1 exibe a taxa de degradação de monômero de anticorpo anti-IL13 por semana, em função do pH, conforme descrito no Exemplo 1.

[021] A Figura 2 mostra o aumento da turbidez em solução a 350 nm de soluções de anticorpo anti-IL13 em função do pH durante o armazenamento a 30 °C, conforme descrito no Exemplo 1.

[022] A Figura 3 exibe as alterações em fragmentos solúveis de baixo peso molecular (LMW) e agregados de alto peso molecular (HMW) mensurados por CE-SDS não redutora durante o armazenamento a 30 °C em função do pH, conforme descrito no

Exemplo 1.

[023] A Figura 4 exibe taxas de formação de variantes ácidos (AV) e variantes básicos (pico 1) (BV) a 30 °C em função do pH, conforme descrito no Exemplo 1. A taxa de formação de variante é expressa como %/semana mostrada no eixo vertical.

[024] A Figura 5 mostra as taxas de formação de variante básico (pico 2) (BV2) e a perda do pico principal (MP) a 30 °C em função do pH, conforme descrito no Exemplo 1. A taxa de formação de variante é expressa como %/semana mostrada no eixo vertical.

[025] A Figura 6 mostra uma caracterização reológica do anticorpo anti-IL13 como uma função da concentração de anticorpo e do pH da solução conforme descrito no Exemplo 1. A viscosidade da solução é expressa em centipoise (cP) a 25 °C mostrada no eixo vertical.

[026] A Figura 7 exibe uma caracterização reológica de anticorpos monoclonais diferentes ao longo de um amplo intervalo de concentrações conforme descrito no Exemplo 1. A viscosidade da solução é expressa em centipoise (cP) a 25 °C mostrada no eixo vertical.

[027] A Figura 8 mostra a quantificação da aparência visual de soluções de anticorpo anti-IL13 e anti-CD20 em função da concentração usando nefelometria a 90 graus conforme descrito no Exemplo 1.

[028] A Figura 9 exibe medições da turbidez (A350) para soluções com anticorpo anti-IL13 e anti-CD20 em função da concentração de mAb conforme descrito no Exemplo 1.

[029] A Figura 10 exibe a turbidez da solução de anticorpo anti-IL13 em função da concentração e pH, conforme descrito no Exemplo 1.

[030] A Figura 11 exibe a contagem de partículas subvisíveis em soluções com anticorpo anti-IL13 e anti-CD20 em função da concentração de mAb conforme descrito no Exemplo 1.

[031] A Figura 12 exibe medições de nefelometria, turbidimetria, e

dispersão de luz estática de de uma solução de 125 mg/mL de anticorpo anti-IL13 conforme descrito no Exemplo 1.

[032] A Figura 13 resume a dependência de temperatura na opalescência da solução em diferentes condições de pH para a solução de anticorpo anti-IL13 a 125 mg/mL e a 204 mg/mL conforme descrito no Exemplo 1.

[033] A Figura 14 resume os picos de transição de fusão térmica observados para dois picos parcialmente resolvidos na DSC capilar em função da composição da formulação anti-IL13 e do pH da solução conforme descrito no Exemplo 1.

[034] A Figura 15 resume as medições do segundo coeficiente virial osmótico (B_2), para o anticorpo anti-IL13 em função do pH da solução com amostras em tampões simples conforme indicado e mensurado a partir de 0,1-1,0 mg/mL, conforme descrito no Exemplo 1.

[035] A Figura 16 exhibe as medições do segundo coeficiente virial osmótico para o anticorpo anti-IL13 em função da composição da formulação e do pH em um intervalo de 1,0-10 mg/mL, conforme descrito no Exemplo 1.

[036] A Figura 17 mostra a intensidade da dispersão de luz estática mensurada em função da concentração para cada um dos anticorpos anti-IL13 e anti-CD20 em comparação com o modelo de esfera rígida (HS), tal como descrito no Exemplo 1.

[037] A Figura 18 exhibe os dados de dispersão de luz estática para anticorpos anti-IL13 em função do pH da formulação representados como pesos moleculares aparentes observados em concentrações de até 200 mg/mL conforme descrito no Exemplo 1.

[038] A Figura 19 exhibe os pesos moleculares aparentes de anticorpos anti-IL13 e anti-CD20 em solução em concentrações elevadas de até 200 mg/mL conforme descrito no Exemplo 1.

[039] A Figura 20 exhibe a medição do viscosidade cisalhamento

para o anti-IL13 e anti-CD20 sob as respectivas condições de formulação a 25 °C, conforme descrito no Exemplo 1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[040] A menos que definido de outra forma, os termos técnicos e científicos utilizados no presente têm o mesmo significado que é comumente compreendido por um técnico hábil no assunto ao qual esta invenção pertence. Singleton *et al.* “*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*” 2 Ed., J. Wiley & Sons (Nova Iorque, NY, 1994), e March, “*Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure*” 4ª Ed. John Wiley & Sons (Nova York, NY, 1992), fornecem para um técnico hábil no assunto um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido.

ALGUMAS DEFINIÇÕES

[041] Para os propósitos de interpretação deste relatório descritivo, as seguintes definições serão aplicadas e, sempre que necessário, os termos usados na forma singular também incluirão o plural e vice-versa. No caso de qualquer definição estabelecida abaixo conflitar com qualquer documento incorporado ao presente pela referência, a definição definida abaixo prevalecerá.

[042] Tal como utilizado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um, uma” e “o, a” abrangem os referentes no plural, a menos que o contexto expresse claramente de outra maneira. Assim, por exemplo, a referência a “uma proteína” ou “um anticorpo” inclui uma pluralidade de proteínas ou anticorpos, respectivamente, e a referência a “uma célula” inclui misturas de células, e similares.

[043] O termo “formulação farmacêutica” refere-se a uma preparação que está em uma forma que permita que a atividade biológica do ingrediente ativo seja eficaz, e que não contenha componentes adicionais que são inaceitavelmente tóxicos para um

indivíduo ao qual a formulação deveria ser administrada. Tais formulações são estéreis. E excipientes (veículos, aditivos) “farmaceuticamente aceitáveis” são aqueles que podem ser administrados razoavelmente a um sujeito mamífero para fornecer uma dose eficaz do ingrediente ativo empregado.

[044] Uma formulação “estéril” é asséptica ou livre de todos os micro-organismos vivos e seus esporos.

[045] Uma formulação “congelada” é aquela em uma temperatura abaixo de 0 °C. Geralmente, a formulação congelada não é congelada a seco, nem é submetida a liofilização anterior ou subsequente. Em determinados exemplos de realização, a formulação congelada compreende a substância fármaco congelada para armazenamento (em tanque de aço inoxidável) ou produto fármaco congelado (na configuração final de ampola).

[046] Uma formulação “estável” é aquela em que a proteína presente nela essencialmente retém sua estabilidade física e/ou estabilidade biológica quando submetida ao armazenamento. Em alguns exemplos de realização, a formulação essencialmente retém sua estabilidade física e química, assim como sua atividade biológica quando submetida ao armazenamento. O período de armazenamento é geralmente selecionado com base na vida útil (prazo de validade) desejada da formulação.

[047] Conforme utilizado no presente, uma formulação com “estabilidade prolongada” significa aquela em que a proteína retém essencialmente a sua estabilidade física, estabilidade química e atividade biológica após o armazenamento a 5 °C durante um ano ou mais. Em determinados exemplos de realização, o armazenamento é a 5 °C durante dois anos ou mais. Em certos exemplos de realização, o armazenamento é a 5 °C por até três anos.

[048] Uma proteína “retém sua estabilidade física” em uma

formulação farmacêutica se ela não mostra ou mostra ou muito pouco sinais de agregação, precipitação e/ou desnaturação ao exame visual de cor/ou limpidez, ou conforme mensurado pela dispersão de luz UV ou por cromatografia por exclusão de tamanho.

[049] Uma proteína “retém sua estabilidade química” em uma formulação farmacêutica se a estabilidade química em um determinado momento é tal que a proteína é considerada ainda como retendo sua atividade biológica conforme definido abaixo. A estabilidade química pode ser avaliada pela detecção e quantificação das formas quimicamente alteradas da proteína. A alteração química pode envolver a modificação do tamanho (por exemplo, *clipping*) que pode ser avaliada, por exemplo, por meio de cromatografia por exclusão de tamanho, SDS-PAGE e/ou ionização e dessorção a laser assistida por matriz / espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI/TOF MS). Outros tipos de alteração química incluem alteração de carga (por exemplo, as que ocorrem como resultado da desamidação), que pode ser avaliada, por exemplo, por cromatografia de troca iônica ou focalização isoeletrica capilar com imagem (icIEF), por exemplo.

[050] Um anticorpo “retém sua atividade biológica” em uma formulação farmacêutica, se a atividade biológica do anticorpo em um determinado momento está dentro de cerca de 10% (dentro dos erros do ensaio) da atividade biológica apresentada no momento em que a formulação farmacêutica foi preparada conforme determinado em um ensaio de ligação do antígeno ou ensaio de potência, por exemplo.

[051] No presente pedido, “atividade biológica” de um anticorpo monoclonal refere-se à capacidade do anticorpo se ligar ao antígeno. Isto pode incluir ainda a ligação do anticorpo ao antígeno que resulta em uma resposta biológica mensurável que pode ser medida por métodos *in vitro* ou *in vivo*. Essa atividade pode ser antagonista ou agonista.

[052] Um anticorpo monoclonal “desamidado” é aquele em que um ou mais resíduos de asparagina foi derivatizado, por exemplo, de um ácido aspártico ou ácido iso-aspártico.

[053] Um anticorpo que é “suscetível a desamidação” é aquele que compreende um ou mais resíduos que foram encontrados com sendo propensos a desamidação.

[054] Um anticorpo que é “suscetível de agregação” é aquele que foi encontrado por agregar-se com outra(s) molécula(s) de anticorpo, especialmente sob congelamento ou agitação.

[055] Um anticorpo que é “suscetível à fragmentação” é aquele que foi encontrado por estar clivado em dois ou mais fragmentos, por exemplo, na sua região de dobradiça.

[056] Pela expressão “redução de desamidação, agregação ou fragmentação” pretende-se dizer uma prevenção ou diminuição da quantidade de desamidação, agregação ou fragmentação com relação ao anticorpo monoclonal formulado em um pH diferente ou em um tampão diferente.

[057] O anticorpo que é formulado é essencialmente puro e desejavelmente homogêneo (por exemplo, livre de proteínas contaminantes e etc.). Um anticorpo “essencialmente puro” significa uma composição compreendendo pelo menos cerca de 90% em peso de anticorpo, com base no peso total da composição, ou pelo menos cerca de 95% em peso. Um anticorpo “essencialmente homogêneo” significa uma composição que compreende cerca de pelo menos 99% em peso de anticorpo, com base no peso total da composição.

[058] Por “isotônico” é entendido que a formulação de interesse tem essencialmente a mesma pressão osmótica que do sangue humano. A formulação isotônica geralmente terá uma pressão osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm (miliosmóis). A isotonicidade pode ser mensurada pelo uso de um osmômetro de pressão de vapor

ou do tipo que determina o ponto de congelamento.

[059] Conforme usado no presente, o termo “tampão” refere-se a uma solução tamponada que resiste a mudanças de pH pela ação de seus componentes conjugados ácido-base.

[060] Um “tampão histidina” é um tampão compreendendo íons histidina. Exemplos de tampões histidina incluem cloreto de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina, succinato de histidina, etc. Em um exemplo de realização, o tampão histidina é acetato de histidina. Em um exemplo de realização, o tampão acetato de histidina é preparado pela titulação de L-histidina (base livre, sólido) com ácido acético (líquido). Em determinados exemplos de realização, o tampão histidina ou histidina-acetato tem o pH entre 4,5 a 6,5. Em determinados exemplos de realização, o tampão histidina ou tampão histidina-acetato tem o pH entre 5,4 a 6,0. Em um exemplo de realização, o tampão tem um pH de 5,6. Em um exemplo de realização, o tampão tem um pH de 5,7. Em um exemplo de realização, o tampão tem um pH de 5,8.

[061] No presente pedido, um “tensoativo” ou “surfactante” refere-se a um agente com atividade de superfície, sendo preferivelmente um tensoativo aniônico. Exemplos de tensoativos no presente pedido incluem polisorbato (por exemplo, polisorbato 20 e polisorbato 80); poloxamer (por exemplo, poloxamer 188); Triton; dodecil sulfato de sódio (SDS); lauril sulfato de sódio; octil glicosídeo de sódio; lauril-, miristil-, linoleil-, ou estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil-, ou estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- ou cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isostearamidopropil-betaína (por exemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, ou isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil de sódio, ou metil oleilaurato de sódio; e a série MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polietil

glicol, polipropil glicol e copolímeros de etileno e propileno glicol (por exemplo, pluronics, PF68 etc.); etc. Em um exemplo de realização, o tensoativo é polisorbato 20.

[062] Um “conservante” é um composto que pode ser opcionalmente incluído na formulação para reduzir essencialmente a ação bacteriana nele, facilitando assim a produção de uma formulação multi uso, por exemplo. Exemplos de conservantes em potencial incluem cloreto octadecildimetilbenzil amônio, cloreto hexametônio, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloretos alquilbenzildimetilamônio em que os grupos alquilas são compostos de cadeia longa), e cloreto de benzetônio. Outros tipos de conservantes incluem alcoóis aromáticos tais como álcool fenólico, butílico e benzílico, alquil parabenos tais como metil- ou propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol e m-cresol. Em um exemplo de realização, o conservante preferido da presente invenção é o álcool benzílico.

[063] Um “poliol” é uma substância com vários grupos hidroxila e inclui açúcares (açúcares redutores e não redutores), alcoóis de açúcar e ácidos de açúcar. Um poliol pode, opcionalmente, estar incluído na formulação. Em determinados exemplos de realização, os polióis na presente invenção têm um peso molecular inferior a cerca de 600 kD (por exemplo, na faixa de aproximadamente 120 a 400 kD). Um “açúcar redutor” é aquele que possui um grupo hemiacetal que pode reduzir íons metálicos ou reagir covalentemente com a lisina e de outros grupos amino nas proteínas e um “açúcar não redutor” é aquele que não possui essas propriedades do açúcar redutor. Exemplos de açúcares redutores são: frutose, manose, maltose, lactose, arabinose, xilose, ramnose, galactose e glicose. Açúcares não redutores incluem sacarose, trealose, sorbose, melezitose e rafinose. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol e glicerol são exemplos de alcoóis de açúcar. Quanto aos ácidos de

açúcar, estes incluem L gluconato e sais metálicos deste. Quando se deseja que a formulação seja estável ao congelamento e descongelamento, o poliol é normalmente aquele que não se cristaliza em temperatura de congelamento (por exemplo, -20 °C), de modo que ele não desestabiliza o anticorpo na formulação. Em um exemplo de realização, o poliol é um açúcar não redutor. Em um exemplo de realização, um açúcar não redutor é sacarose.

[064] Conforme utilizado no presente utilizado, “asma” refere-se a um distúrbio complexo caracterizado por sintomas variáveis e recorrentes, obstrução reversível do fluxo de ar (por exemplo, com broncodilatador) e hiper-responsividade brônquica que pode ou não ser associada com inflamação subjacente. Exemplos de asma incluem asma sensível / exacerbada pelo uso de aspirina, asma atópica, asma grave, asma leve, asma moderada a grave, asma virgem de tratamento com corticosteroides, asma crônica, asma resistente a corticosteroide, asma refratária a corticosteroide, asma recém-diagnosticada e tratada, asma devido ao tabagismo, asma não controlada com corticosteroides e outras asma tal como aquelas mencionadas em *J Allergy Clin Immunol* (2010) 126(5):926-938.

[065] Conforme utilizado no presente, o termo “tratamento” se refere a intervenções clínicas em uma tentativa de alterar o curso natural da célula ou indivíduo que está sendo tratado, e pode ser realizado antes ou durante o desenvolvimento da patologia clínica. Os efeitos desejáveis de tratamento incluem evitar a ocorrência ou a recorrência de uma doença ou uma condição ou sintoma, aliviar uma condição ou sintoma da doença, diminuir quaisquer consequências patológicas diretas ou indiretas da doença, diminuir a taxa de progressão da doença, melhorar ou amenizar o estado da doença, e alcançar a remissão ou melhora do prognóstico.

[066] Uma “quantidade eficaz” refere-se a uma quantidade eficaz,

nas dosagens e períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático ou terapêutico desejado. Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” de um agente terapêutico pode variar de acordo com fatores como estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo suscitar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também aquela em que qualquer efeito tóxico ou prejudicial da substância seja superado pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

[067] Um “indivíduo”, “sujeito” ou “paciente” é um vertebrado. Em certos exemplos de realização, vertebrado é um mamífero. Os mamíferos incluem, mas não estão limitados a, primatas (incluindo humanos e primatas não humanos) e roedores (por exemplo, camundongos e ratos). Em alguns exemplos de realização, o mamífero é um humano.

[068] Um “medicamento” é uma droga ativa para tratar uma doença, distúrbio e/ou condição.

[069] “Anticorpos” (Abs) e “imunoglobulinas” (Igs) refere-se a glicoproteínas que possuem características estruturais similares. Apesar dos anticorpos exibirem uma especificidade de ligação a um antígeno específico, as imunoglobulinas incluem tanto anticorpos quanto moléculas similares a anticorpo que geralmente não tem especificidade ao antígeno. Polipeptídeos deste último tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema linfático e em altos níveis por mielomas.

[070] Os termos “anticorpo” e “imunoglobulina” são utilizados de forma alternada no sentido mais amplo e incluem anticorpos monoclonais (tais como anticorpos monoclonais intactos ou de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos monovalentes, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (tais como anticorpos multiespecíficos contanto que eles apresentem a atividade

biológica desejada), e pode ainda incluir determinados fragmentos de anticorpos (conforme descrito em maior detalhe no presente). Um anticorpo pode ser quimérico, humano, humanizado e/ou maturado por afinidade.

[071] As expressões “anticorpo de comprimento total”, “anticorpo intacto” e “anticorpo completo” são utilizadas no presente de forma alternada, e se referem a um anticorpo na sua forma substancialmente intacta, e não como fragmentos de anticorpos conforme descrito abaixo. As expressões se referem particularmente a um anticorpo com cadeias pesadas que possuem a região Fc.

[072] “Fragmentos de anticorpos” compreendem uma porção de um anticorpo intacto, compreendendo preferivelmente a região de ligação ao antígeno deste. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem Fab, Fab', F(ab')₂ e fragmentos Fv, diacorpos, anticorpos lineares, moléculas de anticorpos de cadeia única e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos.

[073] A digestão de anticorpos pela papaína produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, denominados fragmentos “Fab”, cada qual com um único sítio de ligação ao antígeno, e um fragmento “Fc” residual, cujo nome reflete a sua capacidade de rápida cristalização. O tratamento com a pepsina gera um fragmento F(ab')₂ que contém dois sítios de ligação a antígenos e ainda é capaz de reticular o antígeno.

[074] “Fv” é o menor fragmento de anticorpo, que contém um sítio de ligação ao antígeno completo. Em uma realização, uma cadeia de duas espécies de Fv consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e em um de cadeia leve em estreita associação não covalente. Coletivamente, as seis CDRs de um Fv conferem ao anticorpo especificidade de ligação ao antígeno. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreende apenas

três CDRs específicos para um antígeno), possui a capacidade de reconhecer e ligar ao antígeno, embora em menor afinidade do que o sítio de ligação inteiro.

[075] O fragmento Fab contém o domínio constante de cadeia leve e pesado e também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab' diferem dos fragmentos Fab pela adição de alguns resíduos na extremidade carbóxi-terminal do domínio CH1 da cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas a partir da região de articulação do anticorpo. Fab'-SH é a designação da presente invenção para Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína do domínio constante sustenta(m) um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpos $F(ab')_2$ foram produzidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que possuem pontes de cisteínas entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

[076] A expressão "anticorpo monoclonal", da forma utilizada no presente refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos e/ou se ligam ao mesmo epítopo, exceto por possíveis mutações, por exemplo, mutações de ocorrência natural, que podem estar presentes em quantidades menores. Assim, o adjetivo "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como não sendo obtido a partir de uma mistura de anticorpos distintos. Em certos exemplos de realização, tal anticorpo monoclonal inclui tipicamente um anticorpo que compreende uma sequência de polipeptídeo que liga um alvo, em que a sequência de polipeptídeo de ligação alvo foi obtida por um processo que inclui a seleção de uma única sequência peptídica de ligação alvo a partir de uma diversidade de sequências polipeptídicas. Por exemplo, o processo de seleção pode ser a seleção de um único clone a partir de uma série

de clones, tal como um conjunto (*pool*) de clones de hibridoma, clones de fago ou clones de DNA recombinante. Deve-se compreender que a sequência de ligação ao alvo selecionada pode ser adicionalmente alterada, por exemplo, para aprimorar a afinidade ao alvo, para humanizar a sequência de ligação ao alvo, para aprimorar sua produção na cultura celular, para reduzir sua imunogenicidade *in vivo*, para criar um anticorpo multiespecífico e etc., e que um anticorpo que compreendendo a sequência de ligação ao alvo alterada é também um anticorpo monoclonal desta invenção. Ao contrário de preparações de anticorpo policlonal que incluem tipicamente diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal de uma preparação de anticorpo monoclonal é direcionado a um único determinante em um antígeno. Além de sua especificidade, as preparações com anticorpo monoclonal são vantajosas por serem tipicamente livre de contaminação por outras imunoglobulinas.

[077] O adjetivo “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como uma necessidade de se produzir o anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção, podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, o método de hibridoma (Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, em: *Monoclonal Antibodies e T-Cell hybridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), métodos de DNA recombinante (vide, Patente US 4.816.567), tecnologias de exibição por fago (vide Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472

(2004); e Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)), e tecnologias para a produção de anticorpos humanos ou similares a de humanos em animais que possuem partes ou todos os *locus* ou genes da imunoglobulina humana, codificando seqüências de imunoglobulina humana (vide, documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patente US 5.545.807; Patente US 5.545.806; Patente US 5.569.825; Patente US 5.625.126; Patente US 5.633.425; Patente US 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) e Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

[078] Os anticorpos monoclonais da presente invenção incluem especificamente anticorpos “quiméricos” nos quais uma porção da cadeia leve e/ou pesada é idêntica com, ou homóloga às seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica, ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da cadeia é idêntico com, ou homóloga às seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies, ou pertencente à outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos destes anticorpos, desde que eles exibam a atividade biológica desejada (Patente US 4.816.567; e Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6855-9855 (1984)).

[079] “Anticorpos nativos” referem-se a moléculas de imunoglobulinas de ocorrência natural com diferentes estruturas. Por exemplo, os anticorpos IgG nativos são glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, compostas por duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas que são

ligadas por dissulfureto. A partir da extremidade N- para a C-terminal, cada cadeia pesada tem uma região variável (VH), também denominada de domínio pesado variável ou domínio variável de cadeia pesada, seguido por três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). Do mesmo modo, a partir da extremidade N- para a C-terminal, cada cadeia leve tem uma região variável (VL), também denominada de domínio leve variável ou domínio variável de cadeia leve, seguido por um domínio constante (CL). A “cadeia leve” de um anticorpo pode ser atribuída a um dentre dois tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos de seus domínios constantes.

[080] O termo “região variável” ou “domínio variável” refere-se ao domínio de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo que está envolvido na ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios variáveis da cadeia pesada e cadeia leve (VH e VL, respectivamente) de um anticorpo nativo geralmente têm estruturas semelhantes, com cada domínio compreendendo quatro arcabouços (*frameworks* - FRs) e três regiões hipervariáveis (HVRs). (Vide, por exemplo, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman & Co., página 91 (2007)). Um único domínio VH ou VL pode ser suficiente para conferir especificidade de ligação ao antígeno. Além disso, os anticorpos que se ligam a um antígeno específico podem ser isolados utilizando um domínio VH ou VL a partir de um anticorpo que se liga ao antígeno para pesquisar uma biblioteca de domínios VL ou VH complementares, respectivamente. Vide, por exemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

[081] Um anticorpo “humanizado” refere-se a um anticorpo quimérico compreendendo resíduos de aminoácidos a partir de HVRs não humanas e resíduos de aminoácidos a partir de FRs humanas. Em alguns exemplos de realização, o anticorpo humanizado compreenderá

de substancialmente todos dentre pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as HVRs (por exemplo, CDRs) correspondem aos de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs correspondem àquelas de um anticorpo humano. Um anticorpo humanizado pode compreender, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante do anticorpo derivado de um anticorpo humano. Uma “forma humanizada” de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo não humano, refere-se a um anticorpo que foi submetido à humanização.

[082] O termo “região hipervariável” ou “HVR” conforme utilizado no presente refere-se a cada uma das regiões de um domínio variável de anticorpo que é hipervariável na sequência e/ou forma alças estruturalmente definidas (“alças hipervariáveis”). Geralmente, os anticorpos nativos de quatro cadeias compreendem seis HVRs; sendo três na VH (H1, H2, H3), e três na VL (L1, L2, L3). As HVRs geralmente compreendem resíduos de aminoácidos das alças hipervariáveis e/ou das “regiões determinantes de complementaridade” (CDRs), sendo esta última de maior variabilidade de sequência e/ou estando envolvida no reconhecimento do antígeno. Alças hipervariáveis exemplares ocorrem nos resíduos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3). (Chothia e Lesk, *J. Mol.Biol.*196:901-917 (1987)) Os CDRs exemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, e CDR-H3) ocorrem nos resíduos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 e 95-102 de H3. (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Com exceção da CDR1 no VH, as CDRs compreendem geralmente os resíduos de aminoácidos que formam as alças hipervariáveis. As CDRs também compreendem “resíduos determinantes da especificidade”, ou “SDRs”, que são os resíduos que

fazem contato com o antígeno. Os SDRs estão contidos dentro de regiões das CDRs denominadas de CDRs-abreviadas, ou “a-CDRs”. As a-CDRs exemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 e a-CDR-H3) ocorrem nos resíduos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 e 95-102 de H3. (Vide Almagro e Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)). Salvo quando indicado de outra forma, os resíduos HVR e outros resíduos do domínio variável (por exemplo, resíduos FR) são numerados na presente invenção de acordo com o sistema de Kabat *et al.*, *Supra*.

[083] Um “anticorpo humano” é aquele que possui uma sequência de aminoácido que corresponde à sequência de um anticorpo produzido por um humano e/ou produzido pelo uso de qualquer técnica para a produção de anticorpos humanos conforme descrito no presente. Tais técnicas incluem triagem de bibliotecas combinatórias derivadas de humanos, como bibliotecas de exibição por fagos (vide, por exemplo, Marks *et al. J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) e Hoogenboom *et al. Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)); utilizando linhagens de células de mieloma humano e heteromieloma de camundongos para a produção de anticorpos monoclonais humanos (vide, por exemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987); e Boerner *et al. J. Immunol.*, 147: 86 (1991)); e geração de anticorpos monoclonais em animais transgênicos (por exemplo, camundongos), que são capazes de produzir um repertório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena (vide, por exemplo, Jakobovits *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al. Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al. Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)). Esta definição de um anticorpo humano exclui especificamente um anticorpo

humanizado compreendendo resíduos de ligação ao antígeno de um animal não humano.

[084] Um anticorpo “maturado por afinidade” é um anticorpo que possui uma ou mais alterações em um ou mais CDRs do mesmo que resulta na melhora da afinidade de ligação do anticorpo ao antígeno, comparado ao anticorpo parental que não possui tal(ais) alteração(ões). Em um exemplo de realização os anticorpos maturados por afinidades preferidos irão possuir afinidades nanomolares ou ainda picomolares ao antígeno alvo. Anticorpos submetidos à maturação da afinidade são produzidos por procedimentos conhecidos no estado da técnica. Marks, *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992) descrevem a maturação por afinidade pelo método de *shuffling* do domínio VL e VH. A mutagênese aleatória de HVR e/ou resíduos da região de arcabouço é descrita por: Barbas, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Shier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); e Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[085] Um “anticorpo de bloqueio” ou “anticorpo antagonista” é aquele que inibe ou reduz uma atividade biológica do antígeno ao qual ele se liga. Determinados anticorpos de bloqueio ou anticorpos antagonistas inibem de forma parcial ou completa a atividade biológica do antígeno.

[086] A “classe” de um anticorpo refere-se ao tipo de domínio constante ou região constante presente em sua cadeia pesada. Existem cinco classes principais de anticorpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias delas podem ser divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. As regiões constantes de cadeia pesada que correspondem as diferentes classes de anticorpos são denominadas de α , δ , ϵ , γ , e μ , respectivamente.

[087] Conforme utilizado no presente, “anticorpo anti-IL13,”

também referido como lebrikizumab, significa um anticorpo IgG₄ humanizado que se liga à IL13 humana. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada, CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2), e CDR-H3 (SEQ ID NO: 3). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia leve, CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5), e CDR-L3 (SEQ ID NO: 6). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada e três CDRs de cadeia leve, CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2), e CDR-H3 (SEQ ID NO: 3), CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5), e CDR-L3 (SEQ ID NO: 6). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada, VH, possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 7 e 8. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia leve, VL, possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada, VH, possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 7 e 8 e uma região variável de cadeia leve, VL, possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 10 ou SEQ ID NO.: 11 ou SEQ ID NO.: 12 ou SEQ ID NO.: 13. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos selecionada a partir da SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13 e uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Os anticorpos anti-IL13 estão adicionalmente descritos no Pedido

2005/062967.

[088] Uma molécula biológica “isolada”, tal como um ácido nucleico, polipeptídeo ou anticorpo, é aquela que foi identificada e separada e/ou recuperada a partir de pelo menos um componente de seu ambiente natural.

[089] A referência para “aproximadamente” ou “cerca de” um valor ou parâmetro no presente inclui (e descreve) exemplos que são direcionados a esse valor ou parâmetro *per se*. Por exemplo, a descrição referindo-se a “cerca de X” inclui a descrição de “X”

[090] Um “dispositivo de administração subcutânea” refere-se a um dispositivo que está adaptado ou é destinado a administrar um medicamento, por exemplo, um anticorpo terapêutico ou formulação farmacêutica por via subcutânea. Exemplos de dispositivos de administração subcutânea incluem, mas não estão limitados a, uma seringa, incluindo uma seringa pré-carregada, um dispositivo de injeção, bomba de infusão, caneta de injeção, dispositivo de agulha, e um sistema de entrega na forma de *patches*. Um dispositivo de administração subcutânea administra um determinado volume da formulação farmacêutica, por exemplo, cerca de 1,0 mL, cerca de 1,25 mL, cerca de 1,5 mL, cerca de 1,75 mL, ou cerca de 2,0 mL.

[091] Uma “bula” ou “rótulo” são usados para se referirem às instruções usualmente incluídas nas embalagens comerciais de produtos ou medicamentos terapêuticos, que contêm informações sobre as indicações, utilização e dosagem, administração, contraindicações, outros produtos terapêuticos para serem combinados com o produto embalado e/ou advertências relativas à utilização de tais produtos terapêuticos, e similares.

[092] Um “kit” é qualquer manufaturado (por exemplo, uma embalagem ou recipiente) compreendendo pelo menos um reagente, por exemplo, um medicamento para o tratamento de asma ou outras

doenças pulmonares. Em determinados exemplos de realização, a manufatura é preferencialmente promovida, distribuída ou vendida como uma unidade para realizar os métodos da presente invenção.

[093] Um “público alvo” é um grupo de pessoas ou instituição a quem, ou ao qual, um medicamento específico está sendo promovido, ou ao qual existe a intenção promover tal medicamento, por exemplo, por meio de *marketing* ou publicidade, especialmente para usos específicos, tratamentos ou indicações; tais como pacientes, populações de pacientes, leitores de jornais, literatura médica, revistas, espectadores de televisão ou internet, ouvintes de rádio ou internet, médicos, empresas farmacêuticas, e *etc.*

[094] O termo “amostra de soro” refere-se a qualquer amostra de soro obtida a partir de um indivíduo. Os métodos para a obtenção de soro a partir de mamíferos são bem conhecidos no estado da técnica.

[095] O termo “sangue total” refere-se a qualquer amostra de sangue total obtida a partir de um indivíduo. Normalmente, o sangue total contém todos os componentes do sangue, por exemplo, componentes celulares e plasma. Os métodos para a obtenção de sangue total a partir de mamíferos são bem conhecidos no estado da técnica.

[096] A “quantidade” ou “nível” de um biomarcador associado a um aumento do benefício clínico em um paciente que sofre de uma determinada doença ou distúrbio, ou resposta preditiva a um agente terapêutico particular ou regime de tratamento, é um nível detectável em uma amostra biológica. Eles podem ser mensurados por métodos conhecidos pelos especialistas hábeis na técnica e também divulgados pela presente invenção. O nível de expressão ou quantidade do biomarcador avaliado pode ser usado para determinar a resposta ou prever a resposta ao tratamento ou agente terapêutico.

[097] Os termos “nível de expressão” ou “nível da expressão” são

em geral utilizados de maneira alternada na presente invenção, e referem-se de modo geral a quantidade de um produto de aminoácidos ou proteína em uma amostra biológica. “Expressão” se refere ao processo pelo qual a informação codificada no gene é convertida em estruturas presentes e operantes na célula. Portanto, de acordo com a invenção a “expressão” de um gene pode se referir à transcrição em um polinucleotídeo, a tradução em uma proteína, ou mesmo a modificação pós-traducional da proteína.

ASMA E OUTRAS DOENÇAS PULMONARES E DETERMINADAS DOENÇAS ALÉRGICAS, AUTOIMUNES E OUTRAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

[098] A asma é descrita como uma doença pulmonar crônica que envolve a inflamação das vias aéreas, hiper-responsividade e obstrução. Fisiologicamente, a hiper-responsividade das vias aéreas está documentada pela diminuição do fluxo de ar brônquico após a broncoprovocação com metacolina ou histamina. Outros gatilhos que provocam a obstrução das vias aéreas incluem ar frio, exercício, infecção respiratória superior viral, fumaça de cigarro e alérgenos respiratórios. A provocação brônquica com alérgeno induz uma rápida fase precoce de diminuição do fluxo de ar brônquico mediada por imunoglobulina E (IgE) seguido em muitos pacientes por uma fase tardia de reação mediada por IgE com um decréscimo no fluxo de ar brônquico por 4-8 horas. A resposta inicial é causada pela libertação de substâncias inflamatórias agudas, tais como a histamina, PGD₂, leucotrienos, triptase e fator de ativação das plaquetas (PAF), ao passo que a resposta tardia é causada por citocinas pró-inflamatórias sintetizadas *de novo* (por exemplo, TNF α , IL4, IL13) e quimiocinas (por exemplo, MCP-1 e MIP-1 α) (Busse *et al.* Em: *Allergy: Principles and Practice*, Ed. Middleston, 1173 (1998)). Em pacientes asmáticos crônicos, os sintomas pulmonares persistentes são mediados pela resposta aumentada de células Th2. Acredita-se que as citocinas Th2

desempenham um papel vital na doença (Larche *et al. J. Allergy Clin. Immunol.*, 111:450 (2003)), em particular a IL13 e IL4 produzida por células Th2 com fenótipo NK (NKT) nas vias aéreas, tal como indicado em um modelo de asma em roedores (Akbari *et al, Nature Med.*, 9:582 (2003)). A patologia macroscópica das vias aéreas na asma exibe uma hiperinsuflação pulmonar, hipertrofia do músculo liso, espessamento da lâmina reticular, edema da mucosa, descamação de células epiteliais, rompimento de cílios celular, e hipersecreção de muco nas glândulas. Microscopicamente, a asma é caracterizada pela presença de números crescentes de eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células plasmáticas nos tecidos bronquiais, brônquios, e muco. Inicialmente, há o recrutamento de leucócitos a partir da corrente sanguínea para as vias aéreas por linfócitos T CD4⁺ ativados. Os linfócitos T também conduzem a liberação de mediadores inflamatórios a partir de eosinófilos, mastócitos e linfócitos. Além disso, as células Th2 produzem IL4, IL5, IL9 e IL13. A IL4, juntamente com a IL13, sinaliza a troca de anticorpos IgM para IgE.

[099] A reticulação de moléculas IgE ligadas à membrana por alérgenos faz com que os mastócitos se desgranulem, liberando histamina, leucotrienos e outros mediadores que perpetuam a inflamação das vias aéreas. A IL5 ativa o recrutamento e a ativação de eosinófilos. Os mastócitos e eosinófilos ativados também geram suas citocinas que ajudam a perpetuar a inflamação. Estes ciclos repetidos de inflamação nos pulmões com lesão nos tecidos pulmonares, seguido pelo processo de reparo podem produzir uma alteração estrutural das vias aéreas a longo prazo (“remodelação”).

[0100] A asma moderada é atualmente tratada com a inalação de anti-inflamatórios corticosteroides de uso diário ou com inibidores de mastócitos tais como cromolina sódica ou nedocromil mais um agonista beta2 inalado quando necessário (3-4 vezes por dia) para aliviar a avanço dos sintomas ou a asma induzida por alérgeno ou

exercício. A cromolina sódica e nedocromil bloqueiam o broncoespasmo e a inflamação, mas geralmente são eficazes apenas para a asma associada com alérgenos ou exercício e, normalmente, apenas para asmáticos juvenis. O corticosteroides inalados melhoram a inflamação, a hiper-reatividade das vias aéreas e a obstrução, e reduzem o número de exacerbações agudas. No entanto, leva pelo menos um mês para os efeitos se tornarem evidentes e até um ano para uma notável melhora ocorrer. Os efeitos colaterais mais frequentes são rouquidão e infecção fúngica oral, por exemplo, candidíase. Efeitos colaterais mais graves têm sido relatados, por exemplo, supressão adrenal parcial, inibição do crescimento, formação óssea reduzida, mas apenas com o uso de doses mais elevadas. A beclometasona, triancinolona e flunisolida provavelmente têm potências semelhantes, enquanto a budesonida e fluticasona são mais potentes e supostamente tem menos efeitos colaterais sistêmicos.

[0101] Mesmos os pacientes com doença leve exibem inflamação das vias aéreas, incluindo a infiltração da mucosa e epitélio com células T, mastócitos e eosinófilos ativados. As células T e mastócitos liberam citocinas que promovem o crescimento e a maturação de eosinófilos e a produção de anticorpos IgE, e estes, por sua vez, aumentam a permeabilidade microvascular, perturbam o epitélio, e estimulam os reflexos neurais e glândulas secretoras de muco. O resultado é a hiper-reatividade das vias aéreas, broncoespasmo, hipersecreção, manifestada por chiado, tosse e dispnéia.

[0102] Tradicionalmente a asma tem sido tratada com broncodilatadores orais e inalatórios. Esses agentes ajudam os sintomas da asma, mas não fazem nada quanto à inflamação subjacente. O reconhecimento durante a última década da importância da inflamação na etiologia da asma tem levado ao aumento do uso de corticosteroides, mas muitos pacientes continuam a sofrer de asma não

controlada.

[0103] Além da asma, outras doenças que podem ser tratadas pelas formulações da invenção incluem alergia, doença autoimune, ou outras doenças inflamatórias. Outras doenças alérgicas incluem rinite alérgica, dermatite atópica, hipersensibilidade alimentar e urticária, doenças da pele mediadas pelo sistema imunológico incluem doenças bolhosas da pele, eritema multiforme e dermatite de contato, doença autoimune incluem psoríase, artrite reumatoide, artrite crônica juvenil, doença inflamatória do intestino (ou seja, colite ulcerativa, doença de Crohn); outras doenças associadas com a IL13 incluem pneumonia idiopática intersticial, metaplasia de células calciformes, doenças inflamatórias e fibróticas do pulmão tal como a fibrose cística, enteropatia sensível ao glúten, e doença de Whipple, doenças imunológicas do pulmão, tais como pneumonia eosinofílica, fibrose pulmonar idiopática e pneumonite por hipersensibilidade, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecção por VSR, uvelitis, esclerodermia, osteoporose e linfoma de Hodgkin.

[0104] A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é um distúrbio passível de tratamento com as formulações da invenção. A FIP é uma doença pulmonar restritiva caracterizada pela fibrose intersticial progressiva do parênquima pulmonar que afeta cerca de 100.000 pacientes nos Estados Unidos (Raghu *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 174:810-816 (2006)). Esta fibrose intersticial associada a FPI leva à perda progressiva da função pulmonar, resultando em morte por insuficiência respiratória na maioria dos pacientes. A sobrevida média a partir do momento do diagnóstico é de 2-3 anos (Raghu *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 183:788-824 (2011)). A etiologia e as chaves moleculares e fisiopatológicas que conduzem à FPI são desconhecidas. O único tratamento que demonstrou prolongar a sobrevida dos pacientes com FPI é o transplante de pulmão (Thabut *et al.*, *Annals of Internal Medicine* 151:767-774 (2009)). O transplante de pulmão, no entanto, está

associado com considerável morbidade, nem todos os pacientes com FPI são candidatos apropriados para isso, e há uma relativa escassez de pulmões de doadores adequados. Apesar das inúmeras tentativas, nenhuma terapia à base de drogas até o momento mostrou prolongar substancialmente a sobrevida em um estudo randomizado, controlado por placebo intervencionista em pacientes com FPI, embora algumas intervenções surgiram diminuir a taxa de declínio da função pulmonar em alguns pacientes (Raghu *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 183:788-824 (2011); Richeldi *et al.*, *The New England J. of Med* 365:1079-1087. (2011)).

[0105] Embora o prognóstico para todos os pacientes com FPI seja grave, há considerável heterogeneidade na trajetória da doença (Raghu *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* 183:788-824 (2011)). Alguns pacientes apresentam um curso relativamente indolente, perdendo a função pulmonar em uma taxa relativamente constante durante 10 anos ou mais, enquanto outros experimentam um declínio mais rápido da função pulmonar, sucumbindo à morte em um ou dois anos após o diagnóstico. Além disso, alguns doentes sofrem de exacerbações agudas da doença, geralmente caracterizadas por reduções dramáticas bruscas na função pulmonar. Em geral, estes pacientes não se recuperam totalmente após o evento agudo e muitas vezes morrem durante ou logo após uma exacerbação. Esta heterogeneidade na trajetória da doença sugere que os diferentes pacientes com FPI pode ter diferentes fatores patofisiológicos subjacentes à sua doença, que podem ser diferencialmente susceptíveis à terapêutica molecularmente orientada, tal como as formulações da invenção.

[0106] A inflamação eosinofílica está associada a uma variedade de doenças, tanto alérgicas quanto não alérgicas (Gonlugur (2006) *Immunol. Invest.* 35 (1):29-45). A inflamação é uma resposta reparadora de tecidos vivos à uma lesão. Uma característica de reações

inflamatórias é o acúmulo de leucócitos no tecido lesionado devido a determinados produtos químicos produzidos no próprio tecido. Os leucócitos eosinófilos se acumulam em uma ampla variedade de condições, tais como doenças alérgicas, infecções helmínticas e doenças neoplásicas (Kudlacz *et al.*, (2002) *Inflammation* 26:. 111-119). Os leucócitos eosinófilos, um componente do sistema imune, são elementos defensivos de superfícies mucosas. Eles respondem não apenas aos antígenos mas também à parasitas, produtos químicos e traumas.

[0107] O tecido eosinofílico ocorre em doenças da pele tais como eczema, pênfigo, urticária aguda, e necrólise epidérmica tóxica, bem como na dermatite atópica ([Rzany *et al.*, 1996]). Os eosinófilos se acumulam no tecido e proteínas de grânulos vazios em reações cutâneas alérgicas mediadas por IgE ([Nielsen *et al.* 2001]). Os eosinófilos combinados com os mastócitos provavelmente causam inflamação das articulações (Miossec *et al.*, 1997). A inflamação eosinofílica às vezes acompanha trauma articular. A eosinofilia no fluido sinovial pode estar associada com doenças como a artrite reumatoide, doença parasitária, síndrome hipereosinofílica, doença de Lyme, e processos alérgicos, bem como hemartrose e artrografia ([Atanes *et al.*, 1996]). A inflamação eosinofílica também pode afetar os ossos ([Yetiser *et al.*, 2002]). Exemplos de doenças musculares eosinofílicas incluem perimiosite eosinofílica, polimiosite eosinofílica, e miosite eosinofílica focal ([Lakhanpal *et al.*, 1988]). As inflamações eosinofílicas que afetam músculos esqueléticos pode estar associadas às infecções parasitárias ou drogas ou podem ser características de algumas doenças sistêmicas de hipereosinofilia (por exemplo, síndrome hipereosinofílica idiopática e síndrome da eosinofilia-mialgia). Os eosinófilos participam na resposta inflamatória em epítomos reconhecidos por anticorpos autoimunes ([Engineer *et al.* 2001]). Doenças do tecido conjuntivo podem levar a

inflamações vasculares neutrofilicas, eosinofílicas ou linfocíticas ([Chen *et al.*, 1996]). A eosinofilia nos tecidos e sangue periférico pode ocorrer em doenças reumáticas ativas. A elevação dos níveis séricos de ECP na espondilite anquilosante, um tipo de doença do tecido conjuntivo, sugere que os eosinófilos também estão envolvidos no processo subjacente desta doença (Feltelius *et al.*, 1987). A granulomatose de Wegener pode raramente estar presente com nódulos pulmonares, derrame pleural, e eosinofilia periférica ([Krupsky *et al.*, 1993]).

[0108] A eosinofilia do sangue periférico de pelo menos $400/\text{mm}^3$ pode ocorrer em 7% dos casos de esclerose sistêmica, 31% dos casos de esclerodermia localizada, e 61% dos casos de fascite eosinofílica ([Falanga e Medsger, 1987]). A esclerodermia produz um processo inflamatório muito semelhantes aos plexos de Auerbach e Meissner e consiste de mastócitos e leucócitos eosinófilos no sistema gastrointestinal. As neurotoxinas derivadas de eosinófilos podem contribuir para a disfunção motora gastrintestinal, tal como ocorre na esclerodermia ([de Schryver Kecskemeti e Clouse, 1989]).

[0109] A eosinofilia pode acompanhar a proliferação do tecido conjuntivo localizada ([Bouros *et al.*, 2002]) ou sistêmica ([Varga e Kahari de 1997]). Ela pode incitar a fibrose, inibindo a degradação de proteoglicanos em fibroblastos ([Hernnas *et al.*, 1992]), e fibroblastos mediar a sobrevivência de eosinófilos pela secreção de GM-CSF ([Vancheri *et al.*, 1989]). Os eosinófilos podem ser encontrados em tecidos de pólipos nasais ([Bacherct *et al.* 2001]), brônquicos ([Arguelles e Blanco, 1983]), e gastrointestinais ([Assarian e Sundareson, 1985]). Da mesma forma, os eosinófilos podem estar localizados em pseudotumores inflamatórios (tumor miofibroblástico). Os eosinófilos frequentemente acompanham pseudotumores inflamatórios na região orbital, neste caso a doença pode mimetizar um angioedema ou uma rinoconjuntivite alérgica ([Li *et al.*, 1992]).

[0110] A inflamação eosinofílica pode ser encontrada no trauma tecidual (por exemplo, como resultado de cirurgia ou lesão). A inflamação eosinofílica também pode estar associada com doenças cardiovasculares (por exemplo, miocardite eosinofílica, arterite coronária eosinofílica, a doença isquêmica do coração, infarto agudo do miocárdio, ruptura cardíaca). Os processos inflamatórios necróticos podem também envolver a inflamação eosinofílica (polimiosite, dissecação da artéria coronária, lesões necrosantes da doença neuro- Behçet, demência, infarto cerebral).

ALGUNS AGENTES TERAPÊUTICOS

[0111] Um agente terapêutico para o tratamento da asma e outras doenças pulmonares é fornecido no presente. Em um exemplo de realização, o agente terapêutico é um anticorpo anti-IL13, também referido como lebrikizumab. O lebrikizumab como um anticorpo IgG₄. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada, CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2), e CDR-H3 (SEQ ID NO: 3). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia leve, CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5), e CDR-L3 (SEQ ID NO: 6). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada e três CDRs de cadeia leve, CDR-H1 (SEQ ID NO: 1), CDR-H2 (SEQ ID NO: 2), e CDR-H3 (SEQ ID NO: 3), CDR-L1 (SEQ ID NO: 4), CDR-L2 (SEQ ID NO: 5), e CDR-L3 (SEQ ID NO: 6). Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada, VH, possuindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 7 e 8. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia leve, VL, possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada, VH, possuindo uma

sequência de aminoácidos selecionada a partir das SEQ ID NOs: 7 e 8 e uma região variável de cadeia leve, VL, possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.: 10 ou SEQ ID NO.: 11 ou SEQ ID NO.: 12 ou SEQ ID NO.: 13. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada possuindo a sequência de aminoácidos selecionada a partir da SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13 e uma cadeia leve possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Os anticorpos anti-IL13 estão adicionalmente descritos no Pedido 2005/062967.

[0112] Em outro aspecto, um anticorpo anti-IL-13 compreende uma sequência do domínio variável de cadeia pesada (VH) possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Em alguns exemplos de realização, uma sequência VH possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade contém substituições (por exemplo, substituições conservadoras), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas o anticorpo anti-IL-13 compreendendo tal sequência de aminoácidos ainda mantém a capacidade de se ligar a IL-13 humana. Em certos exemplos de realização, um total de 1 a 10 aminoácidos foi(foram) substituído(s), alterado(s), inserido(s) ou deletado(s) na SEQ ID NO: 8. Em certos exemplos de realização, as substituições, inserções ou deleções ocorrem fora das CDRs (ou seja, nas FRs). Opcionalmente, o anticorpo anti-IL-13 compreende a sequência VH na SEQ ID NO: 8, incluindo modificações pós-

traducionais da referida sequência.

[0113] Em outro aspecto, é fornecido um anticorpo anti-IL-13, em que o anticorpo compreende um domínio variável de cadeia leve (VL) possuindo, pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em alguns exemplos de realização, uma sequência VL possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade contém substituições (por exemplo, substituições conservadoras), inserções ou deleções em relação à sequência de referência, mas o anticorpo anti-IL-13 compreendendo tal sequência de aminoácidos ainda mantém a capacidade de se ligar a IL-13. Em certos exemplos de realização, um total de 1 a 10 aminoácidos foi(foram) substituído(s), inserido(s) ou deletado(s) na SEQ ID NO: 9. Em certos exemplos de realização, as substituições, inserções ou deleções ocorrem fora das CDRs (ou seja, nas FRs). Opcionalmente, o anticorpo anti-IL-13 compreende a sequência VL na SEQ ID NO: 9, incluindo modificações pós-traducionais da referida sequência.

[0114] Em outro exemplo de realização, o anticorpo anti-IL-13 compreende uma região VL possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, e uma região VH possuindo pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

ALGUNS BIOMARCADORES MOLECULARES

[0115] Em certos casos, os biomarcadores, por exemplo, biomarcadores séricos, são quantificados em uma amostra biológica obtida de um paciente como um meio para selecionar pacientes para o tratamento com um determinado agente terapêutico. Os Pedidos US

61/459760, US 61/465425, US 61/484650 e US 61/574485 (“*Diagnosis and Treatments Related to TH2 Inhibition*”) descrevem um ensaio de periostatina e métodos de seleção de pacientes para tratamento com as formulações de anticorpos anti-IL13 descritas no presente.

TÉCNICAS GERAIS PARA FORMULAÇÕES

[0116] As formulações compreendendo anticorpos anti-IL13 podem ser preparadas e analisadas utilizando determinados excipientes e técnicas conhecidas na arte e adicionalmente descritas no presente. Em determinados exemplos de realização, o anticorpo a ser formulado, não foi submetido à liofilização prévia e a formulação de interesse é uma formulação aquosa. Em determinadas realizações, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total. Em um exemplo de realização, o anticorpo na formulação é um fragmento de anticorpo, tal como um F(ab')₂, no caso de surgir problemas em que não seja possível a ocorrência do anticorpo de comprimento total (por exemplo, *clipping* do anticorpo para Fab), que talvez precise ser abordado. A quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo presente na formulação é determinada levando-se em conta, por exemplo, os volumes de dosagem desejada e o(s) modo(s) de administração. A partir de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 250 mg/mL, ou cerca de 10 mg/mL a cerca de 200 mg/mL; ou cerca de 50 mg/mL a cerca de 175 mg/mL é uma concentração de anticorpos exemplar na formulação. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é formulado a uma concentração de 125 mg/mL. Em um exemplo de realização, o anticorpo anti-IL13 é formulado a uma concentração de 150 mg/mL.

[0117] Uma formulação aquosa é preparada compreendendo o anticorpo em uma solução de pH tamponado. Em determinados exemplos de realização, o tampão da presente invenção tem um pH no intervalo de aproximadamente 4,5 a 6,5. Em determinados exemplos de realização, o pH está no intervalo de pH de 5,0 a 6,0, ou o pH está no

intervalo de 5,25 a 5,75, ou no intervalo de pH 5,3 a 5,6. Em certos exemplos de realização da presente invenção, a formulação tem um pH 5,6 ou próximo de 5,6. Em certos exemplos de realização da presente invenção, a formulação tem um pH 5,7 ou próximo de 5,7. Em certos exemplos de realização da presente invenção, a formulação tem um pH 5,8 ou próximo de 5,8. Exemplos de tampões que irão controlar o pH dentro desta faixa incluem tampões acetato (por exemplo, acetato de histidina, acetato de arginina, acetato de sódio), succinato (por exemplo, succinato de histidina, succinato de arginina, succinato de sódio), gluconato, citrato e de outros ácidos orgânicos e suas combinações. A concentração do tampão pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 600 mM, dependendo, por exemplo, do tampão e a isotonicidade desejada da formulação. Em alguns exemplos de realização, o conteúdo de histidina está na concentração de cerca de 5 mM a 40 mM. Em um exemplo de realização, o tampão é acetato de histidina a 20 mM, pH 5,7. Em alguns exemplos de realização, o tampão é acetato de histidina a 20 mM, pH 5,7.

[0118] Um tensoativo pode, opcionalmente, ser adicionado à formulação de anticorpo. Tensoativos exemplares incluem tensoativos não iônicos como polissorbatos (por exemplo, polissorbato 20, 80 etc) ou poloxameros (por exemplo, poloxamer 188). A quantidade de tensoativo adicionado é tal que reduz a agregação do anticorpo formulado e/ou minimiza a formação de partículas na formulação e/ou reduz a adsorção. Por exemplo, o tensoativo pode estar presente na formulação em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 0,5%, ou cerca de 0,005% a cerca de 0,2%, ou cerca de 0,01% a cerca de 0,1%. Em um exemplo de realização, o tensoativo é polissorbato 20 presente na formulação em uma quantidade de 0,03%.

[0119] Em um exemplo de realização, a formulação contém os agentes identificados acima (por exemplo, anticorpos, tampões, e

tensoativo) e é essencialmente livre de um ou mais conservantes, tal como álcool benzílico, fenol, m-cresol clorobutanol e cloreto de benzetônio. Em um exemplo de realização, a formulação não contém um conservante. Em outro exemplo de realização, um conservante pode ser incluído na formulação, especialmente quando a formulação é uma formulação multidoses. A concentração do conservante pode estar na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 2%, ou cerca de 0,5% a cerca de 1%. Um ou mais veículos farmacologicamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes diferentes, tais como aqueles descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª edição, Osol, A. Ed. (1980) podem ser incluídos na formulação fornecida contanto que eles não afetem as características desejadas da formulação. Veículos, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são atóxicos para aqueles que os recebem nas dosagens e concentrações empregadas e incluem; agentes de tamponamento adicionais, co-solventes; antioxidantes, incluindo o ácido ascórbico e metionina; agentes quelantes como o EDTA; complexos metálicos (por exemplo, complexos zinco-proteína); polímeros biodegradáveis tais como poliésteres; e/ou contra-íons formadores de sal.

[0120] Embora as diversas descrições de quelantes na presente invenção se concentram frequentemente no EDTA, será apreciado que outros quelantes de íons metálicos também sejam abrangidos pela invenção. Quelantes de íons metálicos são bem conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto e incluem, mas não se limitam necessariamente ao, aminopolicarboxilato, EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), EGTA ácido (etilenoglicol-bis(beta-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético), NTA (ácido nitrilotriacético), EDDS (etileno diamina disuccinato), PDTA (ácido 1,3-propilenodiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilenotriaminotetraacético), ADA (ácido beta-alaninadiacético),

MGCA (ácido metilglicinodiacético), e etc. Além disso, alguns exemplos de realização da presente invenção compreendem quelantes ácidos fosfonatos/fosfônico. Em determinados exemplos de realização, a formulação contém metionina.

[0121] Agentes de tonicidade, por vezes conhecidos como “estabilizantes” estão presentes para ajustar ou manter a tonicidade de uma composição líquida. Quando utilizado com grandes biomoléculas carregadas, tais como proteínas e anticorpos, eles são muitas vezes designados de “estabilizadores”, pois podem interagir com os grupos carregados das cadeias laterais dos aminoácidos, diminuindo desse modo o potencial para interações inter- e intra-moleculares. Os agentes de tonicidade podem estar presentes em qualquer quantidade entre 0,1% e 25%, em peso, ou 1 a 5%, levando-se em consideração as quantidades relativas dos outros ingredientes. Agentes de tonicidade incluem alcoóis de açúcar poli-hídricos, tri-hídricos ou alcoóis de açúcar superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol.

[0122] Estabilizantes adicionais incluem uma ampla variedade de excipientes, que variam em função desde agentes de volume, intensificadores de solubilidade, até agentes para a prevenção da desnaturação ou da aderência às paredes do recipiente. Os estabilizantes podem estar presentes no intervalo de 0,1 a 10.000 partes em peso por parte de massa ativa de proteína ou anticorpo. Os estabilizantes típicos incluem: alcoóis de açúcar poli-hídricos (enumerados acima); aminoácidos tais como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc; açúcares orgânicos ou açúcar de alcoóis, tais como sacarose, lactose, lactitol, trealose, estaquiase, manose, sorbose, xilose, ribose, ribitol, mioiniositol, mioiniositol, galactose, galactitol, glicerol, ciclitol (por exemplo, inositol), polietileno-glicol; enxofre contendo agentes redutores, tais como ureia, glutathione, ácido

tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, α -monotioglicerol e tiosulfato de sódio; proteínas de baixo peso molecular, tais como albumina do soro humano, albumina de soro bovino, gelatina ou imunoglobulinas; outros polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos (por exemplo, xilose, manose, glucose, frutose, dissacarídeos (por exemplo, lactose, maltose, sacarose); trissacarídeos tais como a rafinose, e polissacarídeos tais como dextrano ou dextrina.

[0123] Tensoativos não iônicos ou detergentes (também conhecidos como “agentes umectantes”) estão presentes para auxiliar a solubilizar o agente terapêutico, bem como para proteger a proteína terapêutica contra a agregação induzida pela agitação, que também permite que a formulação seja exposta ao estresse de cisalhamento de superfície sem causar a desnaturação da proteína ou anticorpo terapêutico. Tensoativos não iônicos podem estar presentes em um intervalo de cerca de 0,05 mg/mL a cerca de 1,0 mg/mL, preferencialmente cerca de 0,07 mg/mL a cerca de 0,2 mg/mL.

[0124] Tensoativos não iônicos adequados incluem polissorbitatos (20, 40, 60, 65, 80, etc), polioxameros (184, 188, etc), polióis Pluronic[®], Triton[®], monoéteres de polioxietileno sorbitano (Tween[®] -20, Tween[®] -80, etc), lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, óleo de rícino hidrogenado polioxietileno 10, 50 e 60, monoestearato de glicerol, éster de ácido graxo de sacarose, metil celulose e carboximetil celulose. Detergentes aniônicos que podem ser utilizados incluem lauril sulfato de sódio, sulfossuccinato de sódio dioctila e sulfonato de sódio dioctila. Detergentes catiônicos incluem o cloreto de benzalcônio ou cloreto de benzetônio.

[0125] Várias técnicas analíticas para medição de estabilidade da proteína estão disponíveis no estado da técnica e são revistas em, por exemplo: *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Nova Iorque, Pubs. (1991) e Jones,

A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). A estabilidade pode ser mensurada em uma temperatura selecionada por um período de tempo selecionado. Em determinados exemplos de realização, a formulação é estável a aproximadamente 40 °C por cerca de pelo menos 2-4 semanas, e/ou estável a aproximadamente 5 °C por cerca de pelo menos 3 meses, e/ou estável a aproximadamente 5 °C por cerca de pelo menos seis meses, e/ou estável a aproximadamente 5 °C por cerca de pelo menos 12 meses, e/ou estável a aproximadamente -20 °C por cerca de pelo menos 3 meses ou pelo menos 1 ano. Em determinados exemplos de realização, a formulação é estável a aproximadamente 25 °C por pelo menos 6 meses e/ou estável a aproximadamente 25 °C por 12 meses, e/ou estável a aproximadamente 5 °C por 6 meses, e/ou estável a aproximadamente 5 °C por 12 meses, e/ou estável a aproximadamente -20 °C por pelo menos 6 meses, e/ou estável a aproximadamente -20 °C por pelo menos 12 meses, e/ou estável a 5 °C ou -20 °C por pelo menos dois anos. Em determinados exemplos de realização, a formulação é estável após o congelamento (a, por exemplo, -70 °C) e descongelamento da formulação, por exemplo, após 1, 2 ou 3 ciclos de congelamento e descongelamento. A estabilidade pode ser avaliada qualitativamente e/ou quantitativamente de diversas maneiras, incluindo a avaliação da formação de agregados (utilizando, por exemplo, a cromatografia de exclusão por tamanho, pela medição da turbidez, e/ou por inspeção visual); avaliação da heterogeneidade de carga utilizando a cromatografia de troca catiônica ou eletroforese capilar por focalização isoelétrica (icEF) ou eletroforese de zona capilar; análise de sequência de amino-terminal ou carboxi-terminal; análise por espectrometria de massa; análise por SDS-PAGE para comparação entre o anticorpo reduzido e intacto; mapa peptídico (por exemplo, tríptico ou LYS-C); avaliação da atividade biológica ou função de ligação do anticorpo ao antígeno; etc. A instabilidade pode envolver uma ou

mais dentre: A agregação, desamidação (por exemplo, desamidação da Asn), oxidação (por exemplo, oxidação da Met), isomerização (por exemplo, isomerização da Asp), *clipping*/hidrólise/fragmentação (por exemplo, fragmentação da região de dobradiça), formação de succinimida, cisteína(s) não pareada(s), extensão N-terminal, processamento C-terminal, diferenças na glicosilação, etc.

[0126] As formulações a serem utilizadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente realizada por meio da filtração através de membranas de filtração estéril, antes, ou após a preparação da formulação.

[0127] Um agente terapêutico pode ser administrado de acordo com métodos conhecidos, como a administração intravenosa em *bolus* ou por infusão contínua durante um período de tempo, por via intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutânea, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, via oral, tópica, ou por inalação. Opcionalmente, a administração pode ser efetuada pela infusão como mini-bombas utilizando diversos dispositivos comercialmente disponíveis.

[0128] A presente formulação também pode conter mais de um composto ativo de acordo com a necessidade para a indicação específica sendo tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não sejam prejudiciais entre si. Alternativamente, ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente citotóxico, citocina ou agente inibidor do crescimento. Tais moléculas estão adequadamente presentes na combinação em quantidades que são eficazes para o propósito pretendido.

[0129] Os ingredientes ativos podem também ser armazenados em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de

poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas de fornecimento de drogas coloidais (por exemplo, lipossomos, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas estão descritas em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edição. *supra*.

[0130] Podem ser fabricadas preparações de liberação controlada. Exemplos apropriados de preparações de liberação prolongada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos que contenham o anticorpo, que se encontram na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação prolongada incluem poliésteres, hidrogéis (tais como poli-(metacrilato de 2-hidroxietila) ou álcool poli-(vinílico)), poli-lactídeos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e L-glutamato de g etila, acetato de etilenovinila não-degradável, copolímeros degradáveis de ácido láctico e ácido glicólico, tal como LUPRON DEPOT® (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico e ácido glicólico e acetato de leuprolide) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. A microencapsulação de proteínas recombinantes para a liberação controlada tem sido realizada com sucesso com hormônio do crescimento humano (rhGH), interferon-(rhIFN-), interleucina-2, e MN rpg 120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2: 795-799 (1996); Yasuda *et al.*, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems" Em: *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell & Newman, eds., (Plenum Press: Nova Iorque, 1995), págs. 439-462; WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; e Patente US 5.654.010.

[0131] As formulações de liberação controlada destas proteínas podem ser desenvolvidas utilizando ácido poli láctico coglicólico (PLGA)

devido à sua biocompatibilidade e vasta gama de propriedades biodegradáveis. Os produtos da degradação do PLGA, ácidos láctico e glicólico, podem ser depurados rapidamente do corpo humano. Além disso, a degradabilidade deste polímero pode ser ajustada de meses a anos dependendo do seu peso molecular e composição. Lewis, “*Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer*”, Em: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker; Nova Iorque, 1990), M. Chasin & R. Langer (Eds.) págs. 1-41.

[0132] Embora polímeros tais como etilenoacetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos. Quando encapsulados, os anticorpos permanecem no corpo por um longo período, eles podem desnaturar ou se agregarem como resultado da exposição à umidade a 37 °C, resultando na perda da atividade biológica e possíveis mudanças na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para a estabilização, dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se é verificado que mecanismo de agregação é a formação de pontes S-S intermoleculares através do intercâmbio tio-dissulfeto, a estabilização pode ser obtida pela modificação de resíduos sulfidrílica, liofilização de soluções ácidas, controlando o conteúdo de umidade, utilizando aditivos adequados e desenvolvendo composições de matriz polimérica específicas.

[0133] As composições lipossomais ou proteinóides também podem ser usadas para formular as proteínas ou anticorpos descritos na presente invenção. Ver as Patentes US 4.925.673 e US 5.013.556.

[0134] A estabilidade das proteínas e anticorpos descritos na presente invenção pode ser aumentada por meio da utilização de “sais de metais polivalentes solúveis em água” atóxicos. Exemplos incluem Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} e Al^{3+} . Exemplo ânions que podem formar sais solúveis em água com os cátions metálicos

polivalentes acima incluem aqueles que são formados a partir de ácidos inorgânicos e/ou ácidos orgânicos. Tais sais solúveis em água tem uma solubilidade em água (a 20 °C) de cerca de pelo menos 20 mg/mL, alternativamente pelo menos cerca de 100 mg/mL, alternativamente pelo menos cerca de 200 mg/mL.

[0135] Os ácidos inorgânicos adequados que podem ser utilizados para formar os “sais de metais polivalentes solúveis em água” incluem o ácido clorídrico, acético, sulfúrico, tiociânico, nítrico e ácido fosfórico. Ácidos orgânicos adequados que podem ser usados incluem o ácido carboxílico alifático e ácidos aromáticos. Os ácidos alifáticos dentro desta definição podem ser definidos como ácidos carboxílicos alifáticos C₂₋₉ saturados ou insaturados (por exemplo, mono-, di- e tri-carboxílicos). Por exemplo, exemplos de ácidos monocarboxílicos dentro desta definição incluem os ácidos monocarboxílicos C₂₋₉ saturados acético, propiônico, butírico, valérico, capríco, pelargônico, enântico caprílico e capriônico, e os ácidos monocarboxílicos C₂₋₉ insaturados acrílico, propiólico metacrílico, crotônico e isocrotônico. Exemplos de ácidos dicarboxílicos incluem os ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ saturados malônico, succínico, glutárico, adípico e pimélico, enquanto os ácidos dicarboxílicos C₂₋₉ insaturados incluem os ácidos maléico, fumárico, citracônico e mesacônico. Exemplos de ácidos tricarboxílicos incluem os ácidos tricarboxílicos C₂₋₉ saturados tricarbálico e 1,2,3-butanotricarboxílico. Além disso, os ácidos carboxílicos da presente definição também podem conter um ou dois grupos hidroxila para formar ácidos hidroxí carboxílicos. Exemplos de ácidos hidroxí-carboxílicos incluem os ácidos glicólico, láctico, glicérico, tartrônico, málico tartárico e cítrico. Ácidos aromáticos dentro desta definição incluem ácido benzóico e ácido salicílico.

[0136] Os sais de metais polivalentes solúveis em água comumente empregados que podem ser utilizados para ajudar a estabilizar os

polipeptídeos encapsulados da presente invenção incluem, por exemplo: (1) os sais metálicos de ácidos inorgânicos de halogenetos (por exemplo, cloreto de zinco, cloreto de cálcio), sulfatos, nitratos, fosfatos e tiocianatos, (2) os sais metálicos de ácidos carboxílicos alifáticos (por exemplo, acetato de cálcio, acetato de zinco, cálcio, glicolato, propionato de zinco, lactato de cálcio, lactato de zinco e tartarato de zinco), e (3) os sais metálicos de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (por exemplo, benzoato de zinco) e salicilatos.

[0137] Em certos exemplos de realização, um anticorpo anti-IL13 é administrado utilizando, por exemplo, um dispositivo de autoinjeção, dispositivo autoinjetor ou outro dispositivo concebido para a autoadministração. Em determinados exemplos de realização, um anticorpo anti-IL13 é administrado utilizando, por exemplo, um dispositivo de autoinjeção, dispositivo autoinjetor, ou outro dispositivo concebido para a autoadministração. Vários dispositivos de autoinjeção e administração subcutânea, incluindo dispositivos autoinjetores, são conhecidos no estado da técnica e estão disponíveis comercialmente. Exemplos de dispositivos incluem, mas não estão limitados a, seringas pré-carregadas (por exemplo, BD HYPAK SCF[®], READYFILL[®] e STERIFILL SCF[®] da Becton Dickinson; seringas pré-carregadas de copolímeros CLEARSHOT[®] da Baxter; e seringas pré-carregadas Daikyo Seiko CRISTAL ZENITH[®] disponível pela West Pharmaceutical Services); dispositivos de injeção descartáveis, tais como Pen BD da Becton Dickinson, dispositivos ultra-afiados e com microagulhas (como o INJECT-EASE[®] e dispositivos de microinfusão da Becton Dickinson, e o H-PATCH[®] disponível pela *Valeritas*), bem como dispositivos de injeção sem agulha (tal como o BIOJECTOR[®] e IJECT[®] disponível a partir da Bioject; e dispositivos SOF-SERTER[®] e adesivos disponíveis pela Medtronic). Alguns exemplos de realização de dispositivos de administração subcutânea estão descritos adicionalmente no presente.

São previstas coformulações ou a coadministração de um anticorpo anti-IL13 com pelo menos um segundo composto terapêutico com esses dispositivos de autoinjeção ou dispositivos de administração subcutânea.

MÉTODOS RECOMBINANTES

[0138] Os anticorpos podem ser produzidos utilizando métodos e composições recombinantes, por exemplo, conforme descrito na Patente US 4.816.567. Em um exemplo de realização, é fornecido o ácido nucleico isolado que codifica um anticorpo anti-IL13 descrito na presente invenção. Tal ácido nucleico pode codificar uma sequência de aminoácidos compreendendo VL e/ou a sequência de aminoácidos compreendendo VH do anticorpo (por exemplo, cadeias leves e/ou pesadas do anticorpo). Em um exemplo de realização adicional, um ou mais vetores (por exemplo, vetores de expressão) compreendendo tal ácido nucleico é(são) fornecido(s). Em um exemplo de realização adicional, é fornecida uma célula hospedeira compreendendo o referido ácido nucleico. Em tal exemplo de realização, uma célula hospedeira compreende (por exemplo, foi transformada com): (1) um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos que compreende a VL do anticorpo e uma sequência de aminoácidos que compreende a VH do anticorpo, ou (2) um primeiro vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos que compreende a VL do anticorpo e um segundo vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácidos que compreende a VH do anticorpo. Em um exemplo de realização, a célula hospedeira é eucariótica, por exemplo, uma célula de ovário de hamster chinês (CHO) ou célula linfóide (por exemplo, célula Y0, NS0, SP20). Em um exemplo de realização, é fornecido um método de produzir um anticorpo anti-IL13, em que o método compreende a cultura de uma célula hospedeira compreendendo um

ácido nucleico que codifica o anticorpo, tal como estabelecido acima, sob condições adequadas para a expressão do anticorpo, e, opcionalmente, a recuperação do anticorpo a partir da célula hospedeira (ou meio de cultura das células hospedeiras).

[0139] Para a produção recombinante de um anticorpo anti-IL13, o ácido nucleico codificante de um anticorpo, por exemplo, conforme descrito acima, é isolado e inserido em um ou mais vetores para clonagem adicional e/ou para a expressão em uma célula hospedeira. O dito ácido nucleico pode ser facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (utilizando, por exemplo, sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve do anticorpo).

[0140] As células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão de vetores codificantes de anticorpos incluem células procarióticas ou eucarióticas descritas na presente invenção. Por exemplo, os anticorpos podem ser produzidos em bactérias, particularmente quando a glicosilação e a função efetora de Fc não são necessárias. Para a expressão de fragmentos de anticorpos e polipeptídeos em bactérias, vide, por exemplo, as Patentes US 5.648.237, US 5.789.199 e US 5.840.523. (Vide também Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, Ed., Humana Press, Fairfield, NJ, 2003), págs 245-254, descrevendo a expressão de fragmentos de anticorpos em *E. coli*). Após a expressão, o anticorpo pode ser isolado a partir da pasta celular de bactérias em uma fração solúvel e pode ser adicionalmente purificado.

[0141] Além dos procariotos, os micróbios eucariotos como fungos filamentosos ou leveduras são hospedeiros adequados para clonagem ou expressão de vetores codificantes de anticorpos, incluindo as cepas de fungos e leveduras cujas vias de glicosilação foram “humanizadas”,

resultando na produção de um anticorpo com um padrão de glicosilação parcial ou totalmente humano. Vide, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), e Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0142] Células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos glicosilados podem ser derivadas de organismos multicelulares (invertebrados e vertebrados). Exemplos de células de invertebrados incluem células de vegetais e de insetos. Foram identificadas numerosas cepas de *baculovirus* que podem ser utilizadas em conjunto com células de insetos, particularmente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0143] Culturas de células vegetais podem também ser utilizadas como hospedeiros. Vide, por exemplo, as Patentes US 5.959.177, US 6.040.498, US 6.420.548, US 7.125.978 e US 6.417.429 (descrevendo a tecnologia PLANTIBODIES® para produção de anticorpos em plantas transgênicas).

[0144] Células de vertebrados também podem ser utilizadas como hospedeiros. Por exemplo, a linhagem de células de mamíferos que são adaptadas para crescerem em suspensão pode ser útil. Exemplos de linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis são; linhagem CV1 de rim de macaco transformadas por SV40 (COS-7); linhagem de rim embriônico humano (293 ou células 293 conforme descrito em Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células rim de hamster neonato (BHK), células de Sertoli de camundongo (células TM4 conforme descrito, por exemplo, em Mather, *Biol. Reprod* 23:243-251 (1980)); células de rim de macaco (CV1); células de rim de macaco verde africano (VERO-76); células humanas de carcinoma cervical (HeLa); células de rim de cão (MDCK); células do fígado de rato búfalo (BRL 3A); células pulmonares humanas (W138); células de fígado humano (Hep G2); tumor mamário de camundongo (MMT 060562); células TRI, conforme descrito, por exemplo, em Mather *et al*, *Annals*

NY Acad.Sci. 383:44-68 (1982); células MRC 5; e células FS4. Outras linhagens de células hospedeiras de mamíferos úteis incluem a célula de ovário de hamster chinês (CHO), incluindo células CHO⁻ - DHFR (Urlaub *et al*, *Proc Acad Nat. Sci USA* 77:4216 (1980)) e linhagem de células de mieloma, como NS0 e Sp2/0. Para uma revisão de certas linhagens de células hospedeiras de mamíferos adequadas para a produção de anticorpos, vide, por exemplo, Yazaki e Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, Ed., *Humana Press*, Fairfield, NJ, págs 255-268 (2003).

ENSAIOS

[0145] Os anticorpos anti-IL13 fornecidos na presente invenção podem ser identificados, rastreados, ou caracterizados por suas propriedades físicas/químicas e/ou atividades biológicas por vários ensaios conhecidos no estado da técnica.

ENSAIOS DE LIGAÇÃO E OUTROS ENSAIOS

[0146] Em um aspecto, um anticorpo anti-IL13 é testado quanto à sua atividade de ligação ao antígeno, por exemplo, por métodos conhecidos, como o ELISA, *Western blot*, e *etc.*

[0147] Em outro aspecto, podem ser utilizados ensaios de competição para identificar um anticorpo que compete com o anticorpo anti-IL13 para a ligação a IL13. Em determinados exemplos de realização, tal anticorpo competidor se liga ao mesmo epítopo (por exemplo, uma cadeia linear ou um epítopo conformacional) ao qual o anticorpo lebrizumab ou outro anticorpo anti-IL13 especificado no presente se liga. Métodos exemplares detalhados para o mapeamento de um epítopo ao qual um anticorpo se liga são fornecidos em Morris (1996) "*Epitope Mapping Protocols*," Em *Methods in Molecular Biology*, vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

[0148] Em um ensaio de competição exemplar, a IL13 imobilizada é incubada com uma solução compreendendo um primeiro anticorpo

marcado que se liga à IL13 (por exemplo, o lebrizumab) e um segundo anticorpo não marcado que está sendo testado quanto à sua capacidade de competir com o primeiro anticorpo para se ligar à IL13. O segundo anticorpo pode estar presente em um sobrenadante de hibridoma. Como controle, a IL13 imobilizada é incubada com uma solução compreendendo o primeiro anticorpo marcado, mas não o segundo anticorpo não marcado. Após a incubação sob condições permissivas para a ligação do primeiro anticorpo à IL13, o excesso de anticorpo não ligado é removido, e a quantidade de marcador associado com a IL13 imobilizada é mensurada. Se a quantidade de marcador associado com a IL13 imobilizada for substancialmente reduzida na amostra teste em relação à amostra controle, então isso indica que o segundo anticorpo compete com o primeiro anticorpo pela ligação a IL13. Vide Harlow e Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

ENSAIOS DE ATIVIDADE

[0149] Em outro aspecto, os ensaios são fornecidos para a identificação de anticorpos anti-IL13 possuindo atividade biológica. A atividade biológica pode incluir, por exemplo, atividade sobre a asma. Anticorpos possuindo tal atividade biológica, *in vivo* e/ou *in vitro* também são fornecidos. Em alguns exemplos de realização, um anticorpo da invenção é testado para verificar tal atividade biológica.

ARTIGOS MANUFATURADOS E KITS

[0150] É fornecido um artigo de manufatura que contém a formulação e fornece instruções para a sua utilização. Este artigo de manufatura compreende um recipiente. Os recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos (por exemplo, frascos de câmara dupla), seringas (tal como seringas de câmara única ou de duas câmaras) e tubos de ensaio. O recipiente pode ser formado a partir de uma série de materiais como o vidro ou plástico. O recipiente armazena

a formulação e um rótulo sobre o recipiente, ou associado ao recipiente, pode indicar as instruções para reconstituição e/ou uso. A etiqueta pode ainda indicar que a formulação é útil ou destinada a administração subcutânea. O recipiente que armazena a formulação pode ser um frasco multiuso, que permite administrações repetidas (por exemplo, de 2 a 6 administrações) da formulação reconstituída. O artigo de manufatura pode compreender ainda um segundo recipiente compreendendo um diluente adequado (por exemplo, BWFI). Após a mistura do diluente e da formulação liofilizada, a concentração de proteína final na formulação reconstituída será geralmente de pelo menos 50 mg/mL. O artigo manufaturado pode incluir adicionalmente outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas e bulas com instruções para uso.

[0151] Em determinados exemplos de realização, é fornecido um artigo manufaturado que compreende um dispositivo de administração subcutânea que proporciona a um paciente uma dose fixa de um anticorpo anti-IL13, em que a dose fixa é de, por exemplo, mas não se limitando a, 37,5 mg, 75 mg, ou 125 mg, ou 150 mg. Em determinados exemplos de realização, o anticorpo anti-IL13 é o lebrikizumab. O anticorpo anti-IL 13 no dispositivo de administração subcutânea é formulado em um tampão, por exemplo, histidina em pH 5,7, e outros excipientes, por exemplo, sacarose e polisorbato, de modo que ele é fornecido em uma formulação farmacêutica estável. Em alguns exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea é uma seringa pré-carregada, que compreende um tubo de vidro com uma agulha e, opcionalmente, um protetor da agulha e também, opcionalmente, um dispositivo que protege a agulha. Em certos exemplos de realização, o volume contido na seringa é de 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL ou 2,0 mL ou aproximadamente 0,5 mL, aproximadamente 1 mL,

aproximadamente 1,5 mL, ou aproximadamente 2,0 mL. Em certos exemplos de realização, a agulha é uma agulha incorporada que compreende uma ponta com bisel trifacetado ou uma ponta com bisel de 5 facetas. Em certos exemplos de realização, a agulha tem um calibre entre 25 *gauge* (G) e 30G. Em alguns exemplos de realização, a agulha possui entre 1/2 polegada de comprimento e 5/8 de polegada de comprimento. Em um exemplo de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende uma seringa de 1,0 mL de vidro borossilicato com baixo teor de tungstênio (tipo I) pré-carregada e uma agulha incorporada de aço inoxidável com bisel de 5 facetas 27G com 1/2 polegada de comprimento de parede fina. Em alguns exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende um protetor de agulha rígido. Em alguns exemplos de realização, o protetor da agulha rígido compreende uma formulação de borracha com baixo teor de zinco, por exemplo, FM27/0 (Daetwyler) e compreende um protetor rígido de polipropileno. Em certos exemplos de realização, a haste do êmbolo compreende um êmbolo de borracha. Em alguns exemplos de realização, o êmbolo de borracha compreende borracha 4023/50 e revestimento de FluroTec® etileno-tetrafluoroetileno (ETFE) (West Pharmaceutical Services, Inc.). Em certos exemplos de realização, o dispositivo de administração subcutânea compreende um dispositivo de segurança para a agulha. Dispositivos de segurança para a agulha exemplares incluem, mas não estão limitados a, *Ultrasafe Passive® Needle Guard X100L* (Safety Syringes, Inc.) e *Rexam Safe n Sound®* (Rexam).

[0152] Dispositivos adicionais apropriados para entrega subcutânea incluem, por exemplo, mas não se limitando a, um dispositivo de injeção tal como o dispositivo INJECT-EASE® e GENJECT®; uma bomba de infusão tal como ACCU-CHECK®; uma caneta de injeção, tal como a GENPEN®, um dispositivo sem agulha tal como MEDDCTOR® e

Biojector®; um autoinjeter e um sistema de entrega subcutânea em *pachs*.

[0153] Os kits compreendem normalmente o recipiente descrito acima e um ou mais recipientes adicionais compreendendo materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas com instruções de uso. Um rótulo pode estar presente no recipiente para indicar que a composição é utilizada para uma terapia específica.

EXEMPLOS

[0154] Os seguintes são exemplos das formulações e métodos da presente invenção. Entende-se que diversas outras realizações podem ser praticadas, dada a descrição geral fornecida acima.

EXEMPLO 1

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

[0155] Exceto para o anti-IL13, que é um anticorpo monoclonal IgG₄ humanizado, todos os outros anticorpos utilizados nos experimentos descritas abaixo foram anticorpos monoclonais IgG₁ humanizados. Os anticorpos monoclonais foram expressos na linhagem de células de ovário de hamster chinês (CHO), e purificados por meio de uma série de etapas de cromatografia convencional, incluindo em proteína A e métodos de cromatografia de troca iônica. Os anticorpos purificados foram obtidos como soluções concentradas a partir de filtração de fluxo tangencial com tampões de soluções e estabilizantes adicionados. Estas foram as soluções estoque dos anticorpos utilizados como materiais de partida para os estudos descritos abaixo.

[0156] Estes materiais de partida estoques de anticorpo monoclonal (mAb) foram armazenados a 2-8 °C até à sua utilização. A preparação adicional de soluções de mAb incluiu a diálise contra tampão de baixa força iônica e filtração através de filtros de 0,22 µm de PVDF (fluoreto

de polivinilideno) modificado (Millipore Steriflip, Millipore Corp, MA) para remover grandes partículas. Tipicamente, foram obtidas concentrações de mAb de 140-150 mg/mL após a diálise. Para se obter concentrações mais elevadas de mAb, 10 mL de mAb foi concentrado com concentradores para centrifuga Amicon Centriprep YM30 (Millipore Corp, MA) centrifugados a 2700 rpm. As concentrações finais de mAb nas preparações dialisadas e concentradas por centrifugação foram determinadas usando diluições gravimétricas e absorvidade a 280 nm (A280) e a medição da absorção de UV a 280 nm utilizando um espectrofotômetro de arranjo de diodos *Agilent diode array Spectrophotometer* modelo 8453 com uma cuveta de quartzo com 1 cm de percurso. Os coeficientes de extinção foram determinados pela análise quantitativa de aminoácidos.

[0157] As soluções de anticorpos monoclonais para os experimentos de dispersão de luz foram preparadas em frascos de cintilação de 20 mL sobre 0,5-275 mg/mL por diluição gravimétrica de concentrações conhecidas da solução estoque em uma câmara de fluxo laminar. Todos os frascos de cintilação foram cuidadosamente limpos com água deionizada e secos e uma corrente de gás de nitrogênio comprimido filtrado. Antes da adição das soluções de proteínas, todas as soluções tampão e reagentes foram adicionalmente filtradas através de filtros de 0,10 µm *Whatman Anotop 25*. Após a preparação ou diluição das amostras, as soluções de mAb foram misturadas até à homogeneidade e deixadas atingir o equilíbrio térmico e químico à temperatura ambiente controlada durante 2 horas. As soluções de proteínas foram centrifugadas em temperatura ambiente durante 20-30 minutos, a 3000 rpm para remover poeira e bolhas eventuais a partir das soluções anteriores para usar no ensaio de dispersão de luz. As soluções de concentração mais elevada (mAb > 170 mg/mL) foram centrifugadas durante períodos de tempo maiores até que o sinal de

dispersão de luz mostrasse um mínimo de ruído. As superfícies exteriores dos frascos de cintilação foram ligeiramente revestidas com óleo de silicone para diminuir a dispersão indesejada a partir de defeitos nas superfícies dos frascos. As amostras preparadas conforme descrito acima foram colocadas diretamente no instrumento de dispersão de luz para as medições.

DETERMINAÇÃO DE B₂ POR DISPERSÃO DE LUZ MULTI-ÂNGULO

[0158] A preparação da amostra para o ensaio de dispersão de luz utilizou 20 mL de frascos com tampas em septo revestidas com Teflon[®] que foram limpos com água MilliQ e secos sob uma corrente de gás nitrogênio filtrado. Amostras de várias concentrações foram preparadas tomando um volume adequado da solução de mAb a aproximadamente 80 mg/mL, diluindo primeiro a cerca de 8 mg/mL com o tampão apropriado e, em seguida, realizando uma diluição final com 20 mL de tampão filtrado em filtro de 0,2 µm. Um total de oito concentrações de proteína (0,05-1,1 mg/mL de mAb) para cada uma das condições de tampão foram equilibradas durante 14-18 horas em temperatura ambiente antes de iniciar as medições. Todas as medições foram feitas como uma série de soluções de concentrações crescentes de proteína, com cada ensaio realizado em triplicatas. Um desgaseificador de solvente Agilent e bomba isocrática (Agilent, Palo Alto, CA), com um filtro de 25 mm Millipore (Millipore, Billerica, MA), (PVDF, 0,1 mM), foram utilizados com uma velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min. A injeção da amostra foi automatizada com uma unidade de manuseamento de líquidos GX281 Gilson (Gilson, Inc., Middleton WI) configurada com uma alça de injeção de 2 mL e um micro-filtro *Wyatt Technology Deutschland* em linha com 0,1 µm, com membrana de PVDF 10 mM. As medições da concentração e dispersão de luz foram realizadas em série, com um detector UV Agilent MWD medindo a 280 nm, seguindo pelo uso de um detector EOS MALS de 18 ângulos (Wyatt

Technology Corporation, Santa Barbara, CA) com ganho reduzido a 21x. Os dados foram adquiridos e processados pelo *software* Astra® 4.90.07 (WTC), com uma análise mais aprofundada conduzida pela exportação dos resultados repartidos. Gráficos da K^*c/R ($\theta=0$)/ $K^*c/$ ou $1/M_{Wapp}$ vs concentração com regressão linear de ajuste dos dados para formar um declive = $2B_2$, e uma intercepção de $1/M_{w0}$, o peso molecular médio ponderal na diluição infinita.

DISPERSÃO DE LUZ ESTÁTICA (SLS) MULTI ÂNGULO EM ALTA CONCENTRAÇÃO

[0159] Um detector de dispersão de luz EOS Dawn de 18 ângulos com laser em estado sólido de 30 mW ($\lambda = 690$ nm) da *Wyatt Technology* (Santa Barbara, CA) foi usado para todas as medições de dispersão de luz estática, com um controlador de temperatura Peltier arrefecido a água ajustado a 23 °C. O instrumento foi calibrado com Tolueno 99,9% (grau de cromatografia). Para um experimento em frasco de cintilação típico, um ajuste do ganho do detector de 1x foi usado para todos os fotodiodos, com ângulos fixos de 38° a 148°. Uma vez que o raio de giro (R_g) do anti-CD11a é inferior a 10 nm, uma solução diluída (1-2 mg/mL) de anticorpos anti-CD11a foi usada em cada concentração de sal para normalizar a dependência angular dos fotodiodos em relação ao detector à 90° usando um ajuste do ganho do detector de fotodiodo em 21x no final de cada experimento. A medição da intensidade de dispersão de luz estática foi conduzida como uma função da concentração de mAb de 0,5 mg/mL a 275 mg/mL, e como uma função da concentração de NaCl (0-600 mM). Os dados de dispersão para cada amostra/frasco foram coletados ao longo de um intervalo de 5-10 minutos com uma frequência de coleta de dados de 12 pontos/minuto. O *software* Astra 4.90.07 (*Wyatt Technology Corporation*, Santa Barbara, CA) foi utilizado para adquirir e processar os dados de dispersão de luz estática, com um valor dn/dc de 0,185

aplicado aos cálculos que podem ser exportados como resultados partidos. Uma análise e cálculos adicionais com os resultados exportados foram realizados no Microsoft Excel, Origin v7.5, e MATLAB R14. Para os dados de dispersão de luz em alta concentração, muitas vezes era mais fácil interpretar os resultados no formato M_{Wapp} vs concentração de mAb, em que o aumento do peso molecular correspondia com a presença de autoassociação reversível dependente de concentração. (Vide, por exemplo, Scherer, T. M., *et al. The Journal of Physical Chemistry B* **114**(40): 12948-12957 (2010); Minton, A. P., *J Pharm Sci* **96**(12): 3466-9 (2007); Minton, A. P. *Biophysical Journal* **93**(4): 1321-1328 (2007).

TURBIDEZ POR ESPECTROSCOPIA UV

[0160] As turvações das soluções de proteína avaliadas a partir dos experimentos de dispersão de luz em alta concentração de para as soluções de proteínas a partir do experimento de seleção de pH (como descrito abaixo) foram mensuradas em temperatura ambiente utilizando um Espectrofotômetro Agilent 8453. A turbidez foi calculada como a média da densidade óptica no comprimento de onda de 350 nm, em que a soma dos valores de absorbância durante o intervalo de comprimento de onda de 340 nm a 360 nm em incrementos de 5 nm foi dividido por 5. As medições de soluções de proteína foram realizadas em uma cuveta de quartzo de pequeno volume de 1 cm de comprimento de trajetória. A absorbância a 690 nm também foi registrado.

CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA DE FUSÃO (T_M) POR CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC) CAPILAR

[0161] A estabilidade conformacional térmica da proteína foi avaliada utilizando um Calorímetro de Varredura Diferencial capilar MicroCal. Os mAbs foram diluídos para 1 mg/mL em tampão. Quinhentos microlitros da proteína e seu tampão correspondente foram carregados em uma placa de 96 poços. A capacidade de calor foi

monitorada conforme a medida que a temperatura aumentava de 15 para 95 °C a uma velocidade de varredura de 60 °C/hr. O *VPViewer 2000 Cap DSC* foi utilizado para obter os dados e o programa *MicroCal, LLC DSC* foi utilizado para analisar os dados. Vide Yadav, S. *et al.*, *J Pharm Sci.* 99(3):1152-68 (2010).

NEFELOMETRIA

[0162] As medições nefelométricas foram feitas usando um turbidímetro HACH (Modelo 2100AN IS) com detecção de 90 graus de intensidade de dispersão. O detector foi calibrado com solução estoque de padrão Formazina 4000 NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez), com 0-0,5 concentração padrão de turbidez relativa. As amostras foram colocadas em cuvetas e mensuradas em duplicatas relatando a NTU média da amostra.

REOLOGIA

[0163] As viscosidades de amostras foram mensuradas com um reômetro MCR300 (Anton Paar, Ashland, VA) usando um sistema de medição em cone e placa. As amostras foram carregadas na placa de medição inferior e foram deixadas para entrar em equilíbrio térmico a 25 °C. Um coletor de solvente foi utilizado para prevenir a evaporação do solvente. A amostra passou por dois ciclos de varreduras de taxa de cisalhamento (cada ciclo inclui um aumento de 10 seg^{-1} a 1000 seg^{-1} , segurando a 1000 seg^{-1} por 1 minuto, diminuição de 1000 seg^{-1} para 10 seg^{-1}). Há um tempo de repouso de 1 minuto entre os ciclos. O valor registrado é a média das duas varreduras da taxa de cisalhamento de uma amostra de 1000 seg^{-1} . A barra de erro representa o desvio padrão das duas corridas em unidades de miliPascal/segundos (mPas). A amostra estava sob tensão de cisalhamento por 2 minutos no total para 1000 seg^{-1} . Escolhemos 1000 seg^{-1} , porque a viscosidade é relativamente independente das taxas de cisalhamento neste intervalo (200 seg^{-1} < taxa de cisalhamento < 2000 s^{-1}). A diferença de

viscosidade entre duas alíquotas de uma amostra foi de $\pm 0,5$ mPa a 1000 seg^{-1} . A duração de medição de cada taxa de cisalhamento foi otimizada utilizando o *software* US200 (Anton Paar, Ashland, VA).

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE NUVEM

[0164] Para um sistema que sofre separação de fases líquido-líquido (LLPS), a diminuição da temperatura pode resultar na formação de gotículas de uma fase líquida em outra fase. A temperatura a que essas gotículas são formadas é denominada de temperatura de nuvem, e pode ser determinada experimentalmente ou por microscopia ou pelo monitoramento da transmissibilidade da solução. Para os experimentos descritos aqui, a temperatura de nuvem foi determinada pelo monitoramento da perda de transmissibilidade a 600 nm em função da temperatura em um espectrofotômetro Aviv 14DS (Aviv biomédica, Lakewood, NJ). Uma cuveta quadrada de 5 mm de diâmetro foi preenchida com cerca de 0,6 mL da solução de anticorpo. A temperatura foi diminuída de 25 °C para 0 °C em etapas de 0,5 °C, utilizando um refrigerador termoelétrico. A amostra foi equilibrada durante 10 minutos em cada temperatura antes de gravar a transmissão. A temperatura de nuvem foi designada como a temperatura à qual a % de transmissibilidade diminuiu em 50% do valor de partida (Asherie, 2004). O T_c para separação de fases do anti-IL13 em diferentes concentrações de proteína e em soluções de estudo diferentes foi mensurado usando um espectrômetro *Aviv Biomedical Model 14S UV-Vis*. O percentual de transmitância vs dados de temperatura foram coletados com uma varredura da temperatura de 25 °C a 0 °C em etapas de - 0,5 °C, tempo de equilíbrio de 600 segundos e comprimento de onda de 600 nm. As medições de soluções de proteína foram realizadas em uma cuveta de quartzo com 1 cm de comprimento de trajetória.

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

[0165] A cromatografia por exclusão de tamanho foi utilizada para

quantificar agregados e fragmentos. Este ensaio utilizou uma coluna TSK G3000 SWXLTM, 7.8X300 mm e foi realizado em um sistema HPLC HP1100TM a 25 °C. As amostras foram diluídas a 2 mg/mL com a fase móvel e o volume injetado foi de 25 mL. A fase móvel foi de 0,2 M de K₂HPO₄, 0,25 M de KCl, em pH 6,2 e a proteína foi eluída a uma vazão constante de 0,5 mL/min por 30 minutos. A absorbância do eluente foi monitorada a 280 nm. Integração foi feita usando o software HP CHEMSTATIONMTM.

ELETROFORESE CAPILAR POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA (ICIEF):

[0166] As amostras foram analisadas utilizando a icIEF para quantificar a estabilidade de cargas variantes (ácida e básica) de amostras de anticorpos anti-IL13. Este método utilizou um capilar revestido com fluorcarbono (Convergent Bioscience) em um analisador iCE280 (Convergent Bioscience) com um microinjetor PrinCE. As soluções de anólito e católito foram adquiridas a partir da GE Healthcare Biosciences; soluções de marcadores pl foram adquiridas a Convergent Bioscience.

ELETROFORESE CAPILAR EM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (CE-SDS)

[0167] A CE-SDS foi realizada utilizando um sistema de eletroforese capilar Beckman P/ACE MDQ ou PA800, capaz de controlar a temperatura capilar de 20 a 40 ± 2 °C, com detector LIF a 488 nm de excitação.

ENSAIO DE POTÊNCIA DO ANTICORPO ANTI-IL13

[0168] A atividade biológica ou a potência das soluções de anticorpo anti-IL13 foi avaliada utilizando um ensaio de cultura de células, que mede a capacidade das soluções de anticorpo anti-IL13 em inibir a expressão de luciferase induzida por IL-13 na linhagem de células humana de epitélio brônquico, células L-Beas-2B (disponível pela ATCC, ATCC N° CRL-9609™). Variando as concentrações de anticorpo anti-IL13 padrão, controle e amostras foram misturados com

uma concentração fixa de IL-13 (por exemplo, rhu-IL13, Peprotech, Cat. No. 200-13) e adicionados em uma placa de 96 poços com células L-Beas-2B semeadas em uma concentração de 2×10^5 células/mL. Após a incubação, a expressão da luciferase foi quantificada utilizando um substrato luminescente da luciferase de acordo com as instruções do fabricante (Bright-Glo Luciferase Assay System™, Promega. Catalogo E2620, E2650, ou Brite-Lite Perkin Elmer Cat. Nº. 6016761). As curvas de diluição de cada solução de anticorpo foram geradas e comparadas com o material de referência. Os resultados foram expressos em unidades de luminescência relativa (RLU). Uma potência relativa estimativa foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e um programa de Análise de Linha Paralela. A % de Atividade Específica foi calculada multiplicando a potência Relativa Estimada pela Atividade Específica do Material de Referência.

SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTICORPO ANTI-IL13 (LEBRKIZUMAB)

[0169] A tabela abaixo mostra as sequências de aminoácidos das regiões CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3 do lebrkizumab, juntamente com as sequências VH, VL, de cadeia pesada e cadeia leve. Tal como indicado na Tabela 1 abaixo, VH e a cadeia pesada podem incluir uma glutamina N-terminal e a cadeia pesada pode incluir também uma lisina C-terminal. Como é bem conhecido no estado da técnica, os resíduos de glutamina N-terminais podem formar piroglutamato e resíduos de lisina C-terminais podem ser cortados durante os processos de fabricação.

TABELA 1

SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DO ANTICORPO ANTI-IL13 (LEBRKIZUMAB)

CDR-H1 (SEQ ID NO.: 1)	Ala Tir Ser Val Asn
CDR-H2 (SEQ ID NO.:2)	Met Ile Trp Gli Asp Gli Lis Ile Val Tir Asn Ser Ala Leu Lis Ser
CDR-H3	Asp Gli Tir Tir Pro Tir Ala Met Asp Asn

(SEQ ID NO.: 3)	
CDR-L1 (SEQ ID NO.: 4)	Arg Ala Ser Lis Ser Val Asp Ser Tir Gli Asn Ser Fen Met His
CDR-L2 (SEQ ID NO.: 5)	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
CDR-L3 (SEQ ID NO.: 6)	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Tre
VH (SEQ ID NO.: 7)	Val Tre Leu Arg Glu Ser Gli Pro Ala Leu Val Lis Pro Tre Gln Tre Leu Tre Leu Tre Cis Tre Val Ser Gli Fen Ser Leu Ser Ala Tir Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gli Lis Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gli Asp Gli Lis Ile Val Tir Asn Ser Ala Leu Lis Ser Arg Leu Tre Ile Ser Lis Asp Tre Ser Lis Asn Gln Val Val Leu Tre Met Tre Asn Met Asp Pro Val Asp Tre Ala Tre Tir Tir Cis Ala Gli Asp Gli Tir Tir Pro Tir Ala Met Asp Asn Trp Gli Gln Gli Ser Leu Val Tre Val Ser Ser
VH (SEQ ID NO.: 8)	Gln Val Tre Leu Arg Glu Ser Gli Pro Ala Leu Val Lis Pro Tre Gln Tre Leu Tre Leu Tre Cis Tre Val Ser Gli Fen Ser Leu Ser Ala Tir Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gli Lis Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gli Asp Gli Lis Ile Val Tir Asn Ser Ala Leu Lis Ser Arg Leu Tre Ile Ser Lis Asp Tre Ser Lis Asn Gln Val Val Leu Tre Met Tre Asn Met Asp Pro Val Asp Tre Ala Tre Tir Tir Cis Ala Gli Asp Gli Tir Tir Pro Tir Ala Met Asp Asn Trp Gli Gln Gli Ser Leu Val Tre Val Ser Ser
VL (SEQ ID NO.: 9)	Asp Ile Val Met Tre Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gli Glu Arg Ala Tre Ile Asn Cis Arg Ala Ser Lis Ser Val Asp Ser Tir Gli Asn Ser Fen Met His Trp Tir Gln Gln Lis Pro Gli Gln Pro Pro Lis Leu Leu Ile Tir Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gli Val Pro Asp Arg Fen Ser Gli Ser Gli Ser Gli Tre Asp Fen Tre Leu Tre Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tir Tir Cis Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Tre Fen Gli Gli Gli Tre Lis Val Glu Ile Lis Arg
Cadeia H (SEQ ID NO.: 10)	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQWL TMTNMDPVD ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT

	<p>CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTIRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLISRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLG</p>
Cadeia H (SEQ ID NO.: 11)	<p>QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVWL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTIRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLISRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLG</p>
Cadeia H (SEQ ID NO.: 12)	<p>VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLS AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVWL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTIRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ</p>

	PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLISRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK
Cadeia H (SEQ ID NO.: 13)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVWL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTIRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLISRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLGK
Cadeia L (SEQ ID NO.: 14)	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNNEDPR TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

RESULTADOS**ESTABILIDADE FÍSICA E QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES DE ANTICORPO ANTI-IL13 EM VÁRIOS PH**

[0170] Tampões com diferentes pH foram feitos usando 20 mM de acetato de histidina ou 20 mM de fosfato de sódio para cobrir o intervalo de pH 5,4 - 7,8. Os tampões acetato de histidina cobriram o intervalo de pH 5,4 - 6,0 e os tampões fosfato de sódio cobriram o intervalo de pH

6,6 - 7,8. Por cada pH de tampão foram mantidas as seguintes constantes: concentração do anticorpo anti-IL13 a 150 mg/mL, 175 mM de sacarose e 0,3 mg/mL de polissorbato 20 (0,03%).

[0171] As soluções de anticorpos foram armazenadas em tubos de ensaio por períodos de tempo e nas temperaturas indicadas na Tabela 2 abaixo. Por diversas vezes, indicado por “X” na Tabela 2, as amostras foram analisadas pelos vários métodos para avaliar a estabilidade física, incluindo SEC, turbidez A350 e SDS-CE não redutora, e a estabilidade química, incluindo icIEF.

TABELA 2

PONTOS NO TEMPO DE ESTABILIDADE E AS CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA DETERMINAR A ESTABILIDADE FÍSICA E QUÍMICA DE SOLUÇÕES DE ANTICORPOS ANTI-IL13.

Temperatura	Semanas na Condição de Armazenamento						
	0	1	2	4	6	8	12
Semana							
-70°C	X						
2-8°C					X		X
30°C		X	X	X	X	X	X

[0172] A Figura 1 mostra a percentagem de perda de monômeros por semana em tampões no pH indicado, conforme determinado por SEC. Conforme mostrado na Fig. 1, a % de perda de monômeros foi inferior no intervalo de pH mais baixo do que no intervalo de pH mais elevado, com a % de perda de monômeros menor em pH 5,7, que exibiu uma % de perda de monômero/semana de 0,056.

[0173] Outro ensaio de estabilidade física mensurou as mudanças na turbidez (conforme determinado pela A350) ao longo do tempo a 30 °C em função do pH. Conforme mostrado na Fig. 2, a turbidez inicial e as alterações são mais elevados para os tampões entre pH 5,4 - 6,0 do que para os intervalos de pH mais elevados. Na Fig. 2, a turbidez límpida é $A_{350} = 1/T$, em que T é a intensidade da luz transmitida a 350 nm com um comprimento do percurso especificado de 1 cm.

[0174] Um terceiro ensaio de estabilidade física mensurou aumentos de fragmentos solúveis de baixo peso molecular (LMW) e agregados de alto peso molecular (HMW) em soluções de anticorpo anti-IL13 durante seis semanas de armazenamento a 30 °C em função do pH. Conforme mostrado na Fig. 3, as taxas de fragmentação e as taxas de agregação foram menores no intervalo de pH mais baixo, pH 5,4 - 6,6.

[0175] Também avaliamos a estabilidade química usando icIEF para determinar as alterações na taxa de formação de variantes ácido e básico ao longo do tempo a 30 °C em função do pH (Fig. 4) e alterações na taxa de variante básico e a perda do pico principal ao longo do tempo a 30 °C em função do pH (Fig. 5). Conforme mostrado na Fig. 4, a taxa de variante ácido foi menor no intervalo de pH baixo e mais alta no intervalo de pH elevado, enquanto a taxa de variação básica (pico BV1) foi menor no intervalo de pH alto e maior no intervalo de pH baixo. Os resultados mostrados na Figura. 5 indicam que a perda do pico principal foi minimizada entre pH 5,4 - 6,0.

[0176] Para determinar se o pH afetou a viscosidade da solução, foi realizada a caracterização reológica das diferentes concentrações de anticorpo anti-IL13 (variando de 0 a 200 mg/mL de anticorpo) em diferentes pHs (variando entre pH 5,5 - 7,2). Cada solução tinha 175 mM de sacarose e 0,3 mg/mL de polissorbato 20. Os resultados são exibidos na Fig. 6. Estes resultados indicam que um perfil de viscosidade consistente foi mantido, independentemente do pH da solução para uma dada concentração de anticorpo. Em particular, os resultados mostraram que a viscosidade em concentrações mais elevadas de anticorpo não foi influenciada pelo pH.

[0177] Em conjunto, os dados apresentados nas Figs. 1 - 6 mostram que houve um gradiente superficial para a maioria das alterações físicas e químicas em pH 5,4 - 6,0. O tampão acetato de histidina 20 mM em

pH 5,7 foi, portanto, escolhido para estudos posteriores e avaliação da formulação.

CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DE SOLUÇÕES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS EM ALTA CONCENTRAÇÃO

[0178] Para investigar se a viscosidade observada (<15 cP a 25 °C) para o anticorpo anti-IL13 formulado a 150 mg/mL em 20 mM de acetato de histidina, pH 5,7, 175 mM de sacarose, 0,3 mg/mL de polissorbato 20 seria observado para vários anticorpos diferentes, testou-se a viscosidade de três anticorpos adicionais em formulações semelhantes na concentração de 150 mg/mL. Tal perfil de viscosidade conforme observado para o anticorpo anti-IL13 é desejável para a fabricação em elevada concentração de anticorpos e para certas vias de administração de drogas, por exemplo, injeção subcutânea. Conforme mostrado na Fig. 7, o anticorpo anti-IL13 manteve um perfil de viscosidade semelhante ao anticorpo anti-CD11a, com viscosidade < 15 cP a 25 °C. Em contraste, o anticorpo anti-CD 20 e o anticorpo mAb-1 mostraram perfis de viscosidade bastante diferentes. A viscosidade do anticorpo anti-CD20, a 150 mg/mL foi > 15 cP a 25 °C, enquanto que a viscosidade do anticorpo mAb-1 não pode ser formulada a 150 mg/mL nesta formulação de tampão devido a problemas significativos com a viscosidade, como pode ser observado na Fig. 7. A Fig. 7 mostra que a viscosidade do mAb-1 a 125 mg/mL foi > 45 cP a 25 °C. Deste modo, fica evidente a partir destes dados que os diferentes anticorpos têm diferentes características reológicas quando formulados a 150 mg/mL em 20 mM de acetato de histidina, pH 5,7, 175 mM de sacarose, e 0,3 mg/mL de polissorbato 20.

CARACTERIZAÇÃO DA APARÊNCIA VISUAL E OPALESCÊNCIA

[0179] Nós caracterizamos a aparência visual e a opalescência da formulação de anticorpos anti-IL13 em comparação com uma formulação de anticorpos anti-CD20 utilizando a nefelometria de 90

graus e medições de turbidez a A350. A Figura 8 mostra a quantificação da aparência visual das duas formulações de anticorpo diferentes em unidades nefelométrica de turbidez (NTU). Na Fig. 8, R1, R2, R3 e R4 referem-se a padrões de referência com R4 possuindo o grau mais alto de opalescência visual e R1 possuindo o menor. As medições de turbidez A350 para os anticorpos anti-IL13 e anti-CD20 são mostradas na Fig. 9. Conforme mostrado na Fig. 9, para cada uma das formulações de anticorpo, a turbidez aumenta com o aumento da concentração de proteína. Os resultados mostrados nestas figuras demonstram que duas medições diferentes da aparência visual para dois anticorpos têm diferentes tendências, especialmente as concentrações mais elevadas de proteínas devido às diferenças que são intrinsecamente mensuradas. Os dados também mostram que as tendências das medições são consistentes entre estes dois anticorpos que parecem ter opalescência de solução elevada.

[0180] Nós examinados também a concentração de anticorpos anti-IL13 como uma função de concentração e pH. Os resultados são mostrados na Fig. 10. As soluções que mostram a maior turbidez estavam próximas do ponto isoelétrico (pI) do mAb.

[0181] Embora não sendo limitado pela teoria, nós interpretamos que estes resultados indicam que a absorvância a 350 nm de comprimento de onda (turbidez) aumentou com o aumento da concentração de proteína devido à absorção de luz pela faixa de absorção da proteína, com valores máximos em torno de 280 nm devido a ampla cauda deste pico. Um segundo fator que contribui para o aumento da A350 *versus* a concentração de mAb foi o aumento não linear na dispersão da luz, reduzindo a luz transmitida total.

[0182] Além disso, avaliou-se a contagem de partículas subvisíveis em uma função da concentração de mAb e esses resultados são apresentados na Fig. 11. Não foi observado aumento significativo de

partículas subvisíveis > 2 μm de tamanho pela análise de obscurecimento HIAC indicando que as partículas > 2 μm não contribuem para a opalescência ou turvação das soluções de anticorpos anti-IL13. A Figura 12 exibe as medições nefelométrica, turbidimétrica e de dispersão de luz estática de uma solução de anticorpo anti-IL13 a 125 mg/mL, quando as soluções de anticorpos foram filtradas com tamanhos de poros cada vez menores (até 0,1 μm ou 100 nm). Estes resultados apresentados nas Figs. 11 e 12 indicam coletivamente que a solução de anticorpos anti-IL13 e a aparência da formulação do produto farmacêutico não são determinadas pela matéria particulada subvisível ou no intervalo de submicrons que induz a dispersão de luz dependente de concentração.

[0183] Em seguida, investigou-se a dependência da aparência da solução em função do pH da solução a 125 mg/mL e 204 mg/mL. A aparência da solução foi avaliada usando um mapeamento da temperatura da intensidade de luz transmitida em 600 nm. Os resultados são mostrados na Figura. 13 e indicam que a opalescência da solução de anticorpo anti-IL13, que se manteve constante em função da diminuição da temperatura, não foi devido a fenômenos críticos como a separação de fases líquido-líquido, em que os componentes da solução possuem solubilidade divergente e formam duas fases separadas de composição distinta. Isto sugere que a homogeneidade da solução (separação de fases) em uma ampla faixa de armazenamento e/ou temperaturas de exposição não é influenciada pela temperatura, apesar da opalescência / aparência visual da solução inicial (em temperatura ambiente).

ESTUDOS DA ESTABILIDADE TÉRMICA ($T_{\text{FUSÃO}}$)

[0184] Nós mensuramos os picos de transição de fusão térmica para os dois picos parcialmente resolvidos no calorímetro de varredura diferencial capilar em função da composição da formulação e do pH da

solução. Os resultados são mostrados na Fig. 14. Conforme mostrado na Fig. 14, observou-se um máximo no comportamento da transição de fusão para o anti-IL13 em função do pH entre pH 6,0 -7,5. A opinião científica que prevalece é que quanto mais baixa a transição de fusão ocorre, mais baixa é a estabilidade física esperada do sistema durante o armazenamento para qualquer duração. Vide, por exemplo, Chi *et al.*, *Protein Science* 12(5):903-913 (2003); Chi *et al.*, *Pharmaceutical Research* 20(9): 1325-1336 (2003); Goldberg *et al.*, *J. Pharm. Sciences* 100(4):1306-1315 (2011). Assim, os dados de estabilidade física aqui demonstrados para a formulação de anticorpos anti-IL13 (pH 5,7) foi surpreendente e inesperado.

ESTABILIDADE COLOIDAL

[0185] A estabilidade coloidal foi mensurada pela dispersão de luz estática utilizando soluções diluídas de anticorpo (entre 0,10 -1 mg/mL), assim como a dispersão da luz com concentrações de anticorpos que excediam 200 mg/mL. A estabilidade coloidal refere-se ao comportamento da solução de macromoléculas suspensas em solução, e permite investigar o equilíbrio, a média de tempo de interações entre as macromoléculas, como os anticorpos monoclonais. Sem se limitar pela teoria, quando as interações são repulsivas, pode-se esperar então que a composição da solução se mantenha estável. Entretanto, interações atrativas entre as moléculas de soluto ocorrem, e são geralmente associadas com transições de fase e problemas de solubilidade de proteína.

[0186] Foram feitas medições do segundo coeficiente virial osmótico (B_2) para o anticorpo anti-IL13 (em concentrações que variam de 0,1 a 1,0 mg/mL) em função do pH da solução com amostras em tampões simples. Observe que nas Figs. 15 e 16 os valores acima de 0 são valores positivos do segundo coeficiente virial osmótico que indicam interações líquidas repulsivas; e os valores abaixo de 0 são valores

negativos do segundo coeficiente virial osmótico que indicam interações intermoleculares atrativas. Os dados na Fig. 15 mostram que o anticorpo anti-IL13 possuía interações atrativas em todo o intervalo de pH, mas que as mais fortes interações atrativas ocorreram entre pH 5,5 - 6,5. Para os resultados apresentados na Fig. 16, formulações aditivas foram adicionadas às soluções em diferentes valores de pH. Como pode ser visto na Fig. 16, o segundo coeficiente virial osmótico mensurado em pH 5,5 - 6,5 manteve-se negativo e, portanto, atrativo. As medições da dispersão de luz com um detector de dispersão de luz multi-ângulo em todos os intervalos de concentrações (1 - 200 mg/mL) extrapolando as intensidades para ângulo de dispersão de 0 são mostradas na Fig. 17. Estes dados revelaram que o perfil de intensidade dispersa era muito semelhante ao observado para o nefelômetro HACH (comparar a Fig. 8 com a Fig. 17). Ambos os instrumentos medem a intensidade de luz dispersa, e, conseqüentemente, a dispersão de Rayleigh. Essa dispersão domina em soluções livres de partículas e é causada pela pequena densidade e flutuações de concentração da solução que também são dependentes das interações entre a dispersão das moléculas. A diminuição da intensidade de luz dispersa ocorre quando as moléculas estão em contato cada vez mais próximo entre si e as suas posições no tempo/espço tornam-se correlatas, resultando na interferência destrutiva da luz dispersa (vide, por exemplo, Bettelheim *et al.*, *Biophysical Journal* 41(1): 29-33 (1983); Xia *et al.*, *Biophysical Journal* 66(3_Pt_1): 861-872 (1994); e Xia *et al.*, *Biophysical Journal* 41(1): 29-33 (1996). A Figura 18 exibe os dados da dispersão de luz estática para o anticorpo anti-IL13 em função do pH da formulação. Os dados na Fig. 18 são representados como pesos moleculares aparentes observados nas concentrações de anticorpo de até 200 mg/mL. Os dados mostrados na Figura. 18 indicam interações coloidais atraentes fracas (pH 7,2) a moderadas (pH 6,5) e a autoassociação de anticorpos

anti-IL13 em todo o intervalo de concentração em relação à dispersão teórica para um modelo de espécies em esfera simples de mAb (linha a tracejada na Fig. 18).

[0187] Tanto o anti-IL13 quanto o anti-CD20 demonstraram níveis comparáveis de turvação causada por interações coloidais atrativas e autoassociação de mAb conforme demonstrado na Fig. 19. Surpreendentemente, tais interações coloidais atrativas não se manifestam como alta viscosidade (por exemplo, > 15 cP a 150 mg/mL) ou como problemas reológicos com a formulação de anticorpos anti-IL13, conforme mostrado na Fig. 20. As interações coloidais para o anticorpo anti-CD20, no entanto, tiveram um efeito sobre a reologia da solução, resultando não apenas na opalescência da solução (Fig. 8), como também em alta viscosidade > 15 cP a 25 °C e 150 mg/mL (Fig. 20).

ESTABILIDADE FÍSICA, QUÍMICA, E POTÊNCIA A LONGO PRAZO

[0188] Para testar a estabilidade e a potência a longo prazo, o anticorpo anti-IL13 foi formulado a 125 mg/mL em 20 mM de acetato de histidina, pH 5,7, 175 mM de sacarose e 0,3 mg/mL de polissorbato 20 e, em seguida, submetido a diversas condições de armazenamento. Os frascos foram armazenados a 5 °C ou 25 °C durante o número de semanas exibido na Tabela 3 (até 156 semanas a 5 °C e até 26 semanas a 25 °C). Em cada ponto de tempo, tal como indicado na Tabela 3, as amostras foram analisadas quanto a aparência de cor e clareza (CAC), pH, e medição da estabilidade física ou química indicada. Além disso, a atividade biológica (potência) também foi avaliada em cada ponto de tempo. Conforme indicado pelos dados apresentados na Tabela 3, o anticorpo anti-IL13 formulado a 125 mg/mL em 20 mM de acetato de histidina, pH 5,7, 175 mM de sacarose e 0,3 mg/mL de polissorbato 20, manteve a potência e demonstrou boa estabilidade química e física quando armazenado a 5 °C durante as 156

semanas (três anos) e a 25 °C durante todas as 26 semanas. Estes dados confirmam que esta formulação mantém a atributos químicos, físicos e potência desejados do anticorpo anti-IL13 por um período prolongado de tempo.

TABELA 3

ESTABILIDADE E CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA DETERMINAR A ESTABILIDADE FÍSICA, QUÍMICA E DE POTÊNCIA A LONGO PRAZO DO ANTICORPO ANTI-IL13.

Armazenamento		Visual	pH	SEC	icIEF	CE-SDS	Força	Osmolaridade	Potência
Temp (°C)	Tempo (Semanas)								
		CAC	% Monômero		% Pico Princ.	% Pico Princ.	(mg/mL)	(mOsm/kg)	(% Ativ. Específica)
-70 T= 0	0	SY, LIQ, SOPL	5,6	99,5	72	98	119	267	101
5	4	SY, LIQ, SOPL	5,6	99,5	74	98	128	268	98
	8	SY, LIQ, SOPL	5,6	99,5	74	98	124	270	NT
	12	SY, LIQ, SOPL	5,6	99,5	74	98	125	265	98
	26	SY, LIQ, SOPL	5,8	99,3	73	98	125	264	99
	39	SY, LIQ, SOPL	5,8	99,4	74	98	123	265	95
	52	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,3	72	98	122	269	102
	78	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,2	72	98	125	266	95
	104	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,1	73	98	124	275	100
	130	SY, LIQ, SOPL	5,8	99,3	72	98	124	273	93*
	156	SY, LIQ, SOPL	5,8	99,1	71	98	125	268	94
	1	SY, LIQ, SOPL	5,6	99,5	71	98	125	264	NT
	2	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,4	72	98	124	265	NT

Armazenamento		Visual	pH	SEC	icIEF	CE-SDS	Força	Osmolaridade	Potência
Temp	Tempo								
(°C)	(Semanas)	CAC	% Monômero	% Pico	% Pico	(mg/mL)	(mOsm/kg)	(% Ativ. Específica)	
25	4	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,2	71	97	123	264	102
	8	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,1	68	97	125	268	98
	12	SY, LIQ, SOPL	5,7	99,0	62	97	123	270	94
	26	SY, LIQ, SOPL	5,8	98,7	57	96	129	268	91

CAC: Aparência de Cor e Clareza

SY = Ligeiramente Amarelo

LIQ = Líquido

SOPL = Ligeiramente Opalescente

CONCLUSÕES

[0189] Nós mostramos que o anticorpo anti-IL13 foi formulado com êxito em condições de pH e solução com excipientes que promovem tanto a estabilidade química como física a longo prazo e mantêm a potência. Especificamente, tal formulação compreendia anticorpo em concentrações de 100 mg/mL e acima, incluindo 125 mg/mL e 150 mg/mL, em 20 mM de acetato de histidina pH 5,7, 175 mM de sacarose e 0,3 mg/mL de polissorbato 20. Surpreendentemente, verificou-se que a formulação teve um perfil de viscosidade desejável < 15 cP a 25 °C. Tal perfil de viscosidade é desejável para a fabricação e também para facilitar a administração, por exemplo, por injeção subcutânea, onde uma elevada concentração de medicamento em um volume pequeno é ideal por diversas razões, incluindo o conforto a aceitação do paciente. Nós observamos que outros anticorpos na mesma formulação ou em formulações similares tiveram um perfil de viscosidade indesejável > 15 cP a 25 °C, o que evidencia a imprevisibilidade do perfil de viscosidade para as formulações de anticorpos anti-IL13.

[0190] Além disso, dois critérios utilizados muitas vezes para a seleção da formulação de proteína incluem a estabilidade térmica e a estabilidade coloidal (vide, Chi *et al*, *Protein Science* 12 (5) :903-913 (2003); Chi *et al*, *Pharmaceutical Research* 20 (9):1325-1336 (2003)). A análise térmica da temperatura de desenovelamento de soluções de anticorpo anti-IL13 sugere que a estabilidade física nas condições de pH 5,4 - 6,0 não são ótimas para a estabilidade física da formulação de anticorpo. A análise da estabilidade coloidal de soluções de anticorpo anti-IL13 também sugeriu que as condições de formulação no intervalo de pH 5,5 - 6,5 seriam menos desejáveis para manter baixas as taxas de agregação. No entanto, surpreendentemente, conforme mostrado pelos dados apresentados na presente invenção, o anticorpo anti-IL13 formulado em pH 5,7 demonstrou boa estabilidade física durante um período prolongado de tempo a 5 °C, e também sob condições aceleradas. Foi também surpreendente que a estabilidade do produto sob estas condições foi superior ao observado em pHs mais elevados, tanto física como quimicamente, embora houvesse baixas transições de fusão térmica e estabilidade coloidal. Embora a aparência da solução de anticorpo anti-IL13 formulada (e turbidez) tenha sido mais opalescente nas condições de formulação selecionadas do que em certas condições não selecionadas, as propriedades moleculares e a composição da formulação mantiveram a estabilidade ótima em termos de condições de armazenamento em tempo real condições de armazenamento acelerado, mantiveram a potência e forneceram soluções com propriedades reológicas desejadas para a entrega de altas concentrações de medicamento em um volume pequeno.

DISPOSITIVO DE ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA

[0191] Um dispositivo de administração subcutânea compreendendo uma seringa pré-carregada com agulha, um êmbolo com uma tampão de êmbolo, um protetor de agulha e um dispositivo de

proteção de agulha para a administração da formulação de anti-IL13 descrita acima foi selecionado pela avaliação de uma variedade de componentes comercialmente disponíveis. Por exemplo, os componentes avaliados incluem tubo de vidro, seringas moldadas com agulhas incorporadas, êmbolo e tampão de êmbolo, protetores rígidos de agulhas e dispositivos de segurança para a agulha.

[0192] Os vários componentes foram avaliados em diversas combinações de acordo com métodos conhecidos por um perito no assunto para os efeitos sobre as propriedades da formulação, incluindo, mas não se limitando a, estabilidade, e outras considerações tais como o conforto e a conveniência para o paciente, que inclui fatores, tais como o impacto do calibre e diâmetro interno da agulha da injeção e o tempo e força de deslizamento quando a formulação tem certa viscosidade, tal como descritos no presente. Esses estudos nos levaram a escolher como dispositivo de administração subcutânea ideal para a administração do lebrizumab formulado em alta concentração conforme descrito no presente uma seringa de 1,0 mL de vidro borossilicato com baixo teor de tungstênio (tipo I) pré-carregada e uma agulha incorporada de aço inoxidável com bisel de 5 facetas, calibre 27G com parede de 1/2 polegada de parede fina com uma proteção da agulha rígida compreendendo FM27/0 (Daetwyler) e um protetor de segurança rígido de polipropileno. Além disso, a haste de êmbolo compreende o tampão de êmbolo de borracha que compreende borracha 4023/50 e revestimento de FluroTec® etileno-tetrafluoroetileno (ETFE) (West Pharmaceutical Services, Inc.). O dispositivo de administração subcutânea também compreende um dispositivo de segurança da agulha, *Passive® Needle Guard X100L* (Safety Syringes, Inc.). O dispositivo de administração subcutânea detalhado acima é referido abaixo como seringa pré-carregada de agulha incorporada ou “SIN PFS”.

[0193] Para demonstrar estabilidade comparável do medicamento lebrizumab em um frasco em relação a SIN PFS selecionada, avaliamos a GMP da substância em frascos de 2 cc preenchidos manualmente ou SIN PFS 1 mL a 40 °C / umidade relativa do ambiente. Foram avaliadas as taxas de degradação, caracterizada por alterações no monômero por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), bem como alterações em percentagem do pico principal com focalização isoelétrica (icIEF) e eletroforese capilar em dodecil sulfato de sódio (CE-SDS).

[0194] Estes estudos revelaram que, após o armazenamento a 40 °C durante 4 semanas, não houve diferenças significativas na redução de monômero, conforme mensurado por SEC entre os frascos e as SIN PFS (cada um exibindo 0,6% -0,9% de diminuição), ou na diminuição da percentagem do pico principal (cada mostrando redução de 18 - 21%, conforme mensurado pela icIEF e redução de 0,9% -1,5% conforme mensurado por SDS-CE). Além disso, os perfis cromatográficos foram comparáveis entre si e não foram observados novos picos nas amostras em SIN PFS em comparação com as amostras dos frascos.

[0195] Houveram pequenas diferenças nas taxas de degradação (0,5% -0,6% de aumento de espécies de alto peso molecular para o frasco vs. 0,8% de espécies de alto peso molecular para as SIN PFS após 4 semanas a 40 °C). Essa pequena diferença foi considerada improvável de afetar a qualidade do produto durante o armazenamento em tempo real.

[0196] Consequentemente, conclui-se que os dados descritos acima mostram que a estabilidade do medicamento lebrizumab formulado em alta concentração conforme descrito acima em frascos é comparável ao formulado na SIN PFS selecionada descrita acima.

ALGUMAS REFERÊNCIAS

[0197] Akers, M.J. et al. (2002) "Formulation Development of Protein

Dosage Forms”, Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, págs. 47-127.

[0198] Bettelheim, F. A. e E. L. Siew (1983). “Effect of change in concentration upon lens turbidity as predicted by the random fluctuation theory.” *Biophysical Journal* 41(1): 29-33.

[0199] Burckbuchler, V.; Mekhloufi, G.; Giteau, A. P.; Grossiord, J. L.; Huille, S.; Agnely, F. *Eur J Pharm Biopharm* 2010, 76, 351.

[0200] Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). “Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor.” *Protein Science* 12(5): 903-913.

[0201] Chi, E. Y., S. Krishnan, et al. (2003). “Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation.” *Pharmaceutical Research* 20(9): 1325-1336.

[0202] Development and Optimization of Protein Formulation DSC Application Note, disponível na página da web: [www\(dot\)microcalorimetry\(dot\)com](http://www.microcalorimetry.com) (31 de outubro de 2011).

[0203] Goldberg, D.S. et al. (Abril de 2011). “Formulation Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using High-Throughput Fluorescence and Static Light Scattering Techniques: Roll of Conformational and Colloidal Stability”, *Journal of Pharm. Sciences*, 100, (4): págs. 1306-1315.

[0204] Jezek, J.; Rides, M.; Derham, B.; Moore, J.; Cerasoli, E.; Simler, R.; Perez-Ramirez, B. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011, 63, 1107.

[0205] Le Brun, V. et al. (2010): “A critical evaluation of self-interaction chromatography as a predictive tool for the assessment of protein-protein interactions in protein formulation development: A case study of a therapeutic monoclonal antibody”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75, págs. 16-25.

[0206] Mason, B.D. et al. (2011). “Opalescence of an IgG2

Monoclonal Antibody Solution as it Relates to Liquid-Liquid Phase Separation”, *Journal of Pharm. Sciences*, 100, págs. 4587-4596.

[0207] Minton, A. P. (2007). “The effective hard particle model provides a simple, robust, and broadly applicable description of nonideal behavior in concentrated solutions of bovine serum albumin and other nonassociating proteins.” *J Pharm Sci* 96(12): 3466-9.

[0208] Minton, A. P. (2007). “Static Light Scattering from Concentrated Protein Solutions, I: General Theory for Protein Mixtures and Application to Self-Associating Proteins.” *Biophysical Journal* 93(4): 1321-1328.

[0209] Nishi, H.; Miyajima, M.; Wakiyama, N.; Kubota, K.; Hasegawa, J.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *J Biosci Bioeng* 2011, 112, 326.

[0210] Nishi, H.; Miyajima, M.; Nakagami, H.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *Pharmaceutical Research* 2010, 27, 1348.

[0211] Saito, S.; Hasegawa, J.; Kobayashi, N.; Kishi, N.; Uchiyama, S.; Fukui, K. *Pharm Res* 2012, 29, 397.

[0212] Salinas, B.A. et al. (Jan. 2010). “Understanding and Modulating Opalescence and Viscosity in a Monoclonal Antibody Formulation”, *Journal of Pharm. Sciences*, 99 (1): págs. 82-93.

[0213] Saluja, A.; Badkar, A. V.; Zeng, D. L.; Nema, S.; Kalonia, D. S. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 95, 1967.

[0214] Scherer, T. M., J. Liu, et al. (2010). “Intermolecular Interactions of IgG1 Monoclonal Antibodies at High Concentrations Characterized by Light Scattering.” *The Journal of Physical Chemistry B* 114(40): 12948-12957.

[0215] Sukumar, M. et al. (Julho de 2004): “Opalescent Appearance of an IgG1 Antibody at High Concentrations and Its Relationship to Noncovalent Association”, *Pharm. Research*, 21 (7) págs. 1087-1093.

[0216] Volkin, D.B. et al. (2002) “Preformulation Studies as an Essential Guide to Formulation Development and Manufacture of

Protein Pharmaceuticals”, Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals, 14, 1-46.

[0217] Xia, J. Z., T. Aerts, et al. (1994). “Light scattering by bovine alpha-crystallin proteins in solution: hydrodynamic structure and interparticle interaction.” Biophysical Journal 66(3_Pt_1): 861-872.

[0218] Xia, J. Z., Q. Wang, S. Tatarkova, T. Aerts, J. Clauwaert (1996). “Structural basis of eye lens transparency: light scattering by concentrated solutions of bovine alpha-crystallin proteins “ Biophysical Journal 71(5): 2815-2822.

[0219] Yadav, S., J. Liu, et al. (2009). “Specific interactions in high concentration antibody solutions resulting in high viscosity.” J Pharm Sci.

[0220] Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. Journal of Pharmaceutical Sciences 2010, 99, 4812.

[0221] Yadav, S.; Sreedhara, A.; Kanai, S.; Liu, J.; Lien, S.; Lowman, H.; Kalonia, D. S.; Shire, S. J. Pharmaceutical Research 2011, 28, 1750.

[0222] Yadav, S.; Liu, J.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. Journal of Pharmaceutical Sciences 2010, 99, 1152.

[0223] Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. Journal of Pharmaceutical Sciences 2012, 101, 998.

[0224] Yadav, S.; Shire, S. J.; Kalonia, D. S. Pharmaceutical Research 2011, 28, 1973.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo anti-IL13, um tampão acetato de histidina, pH 5.4 a 6.0, um poliol, e um tensoativo, em que a concentração de anticorpo na formulação é de pelo menos 100 mg/mL, a concentração de acetato de histidina no tampão está entre 5 mM e 40 mM, e a viscosidade da formulação é inferior a 15 centipoise (cP) a 25 °C, a concentração do poliol na formulação está entre 100 mM e 200 mM, e a concentração do tensoativo na formulação está entre 0,01% e 0,1%, e em que o anticorpo anti-IL13 compreende três CDRs de cadeia pesada; CDR-H1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, CDR-H2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e CDR-H3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e três CDRs de cadeia leve; CDR-L1 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, CDR-L2 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e CDR-L3 possuindo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

2. Formulação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-IL13 compreende uma região variável de cadeia pesada apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

3. Formulação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o anticorpo anti-IL13 compreende uma cadeia pesada apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, e uma cadeia leve apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

4. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é de 125 mg/mL.

5. Formulação, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é de 150 mg/mL.

6. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que o poliol é sacarose e o tensoativo é polisorbato 20.

7. Formulação, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a concentração de sacarose na formulação é de 175 mM e a concentração de polissorbato 20 é de 0,03%.

8. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o tampão acetato de histidina é pH 5,7 e a concentração de acetato de histidina no tampão é de 20 mM.

9. Artigo de manufatura, caracterizado pelo fato de que compreende a formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e um dispositivo de administração subcutânea.

10. Artigo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dispositivo de administração subcutânea compreende uma seringa pré-carregada.

11. Artigo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a seringa pré-carregada compreende um cilindro de vidro, uma agulha, e um protetor de agulha.

12. Artigo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma haste de êmbolo e um êmbolo-rolha.

13. Artigo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um dispositivo de segurança para a agulha.

14. Artigo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizado pelo fato de que o cilindro de vidro compreende

vidro de borosilicato e contém 0,3 mL, 1,0 mL, ou 2,0 mL da formulação.

15. Artigo, de acordo com uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que o êmbolo-rolha compreende revestimento de borracha e de etileno-tetrafluoroetileno.

16. Artigo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, caracterizado pelo fato de que a agulha é incorporada, de aço inoxidável, 27G com parede fina, e 1/2 polegada de comprimento, e com bisel de 5 facetas.

17. Artigo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, caracterizado pelo fato de que a proteção da agulha é rígida e compreende um componente elastomérico, e um protetor rígido de polipropileno.

18. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de asma.

19. Formulação, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a referida formulação é administrada em uma quantidade de 0,3 mL, um mL ou dois mL.

20. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento da fibrose pulmonar idiopática.

21. Formulação para uso, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida formulação é administrada em uma quantidade de 0,3 mL, um mL ou dois mL.

22. Formulação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de dermatite atópica.

23. Formulação, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a referida formulação é administrada a uma quantidade de 0,3 mL, um mL ou dois mL.

24. Uso de uma Formulação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para o tratamento de asma, fibrose pulmonar idiopática, ou dermatite atópica.

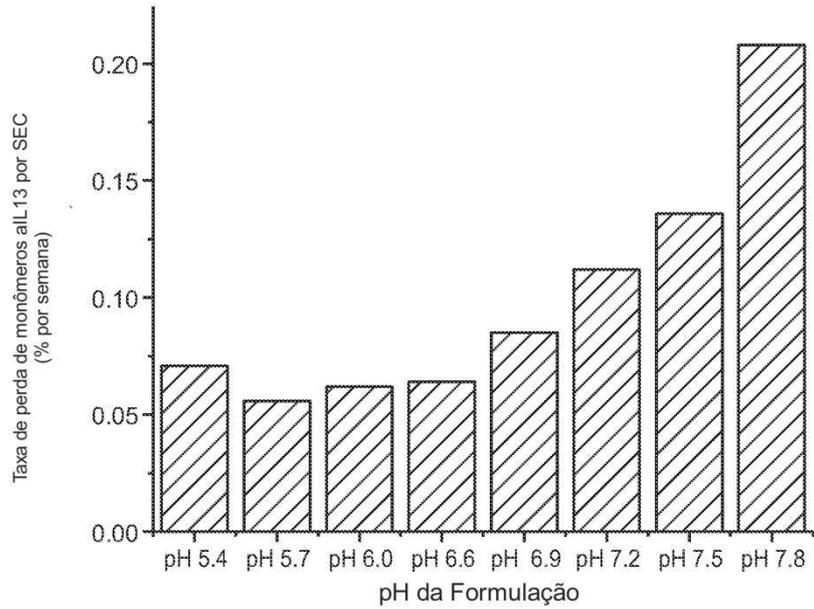


Fig. 1

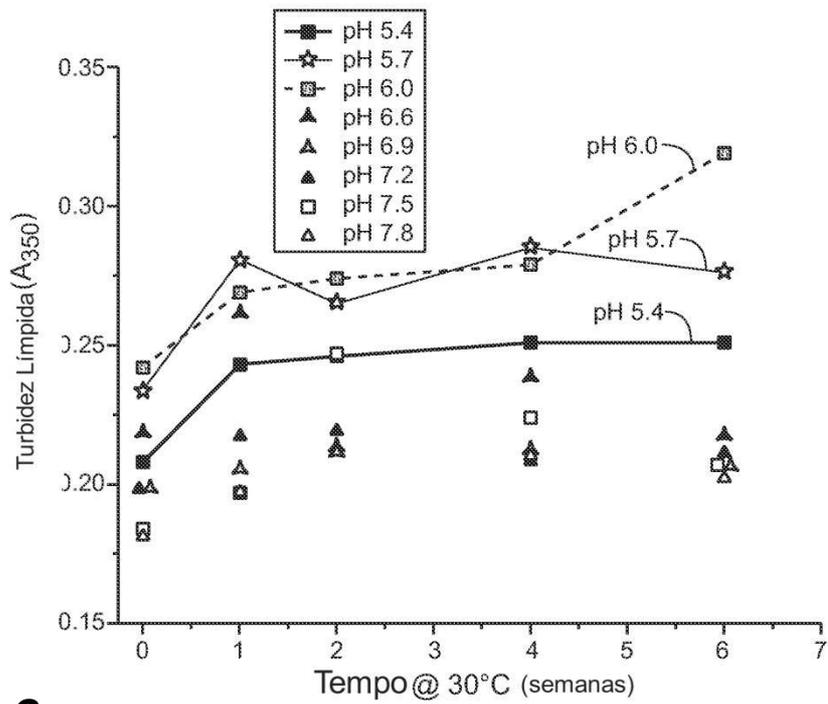


Fig. 2

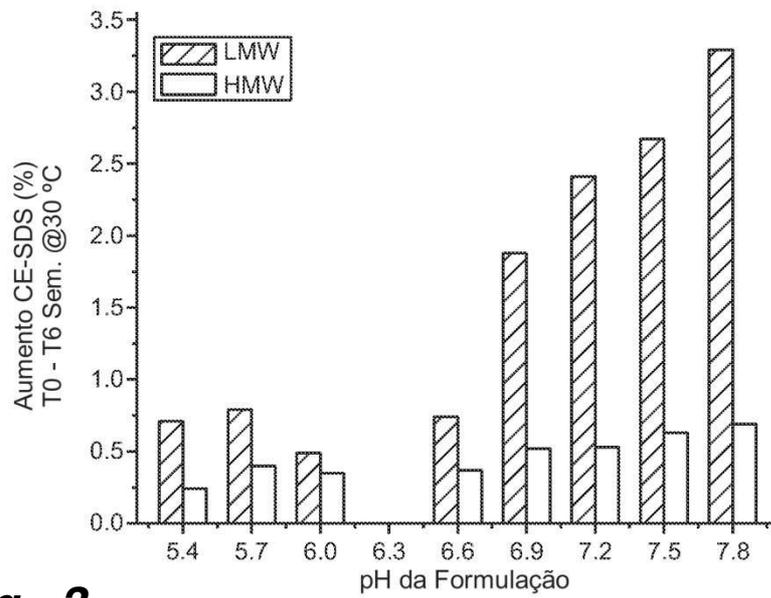


Fig. 3

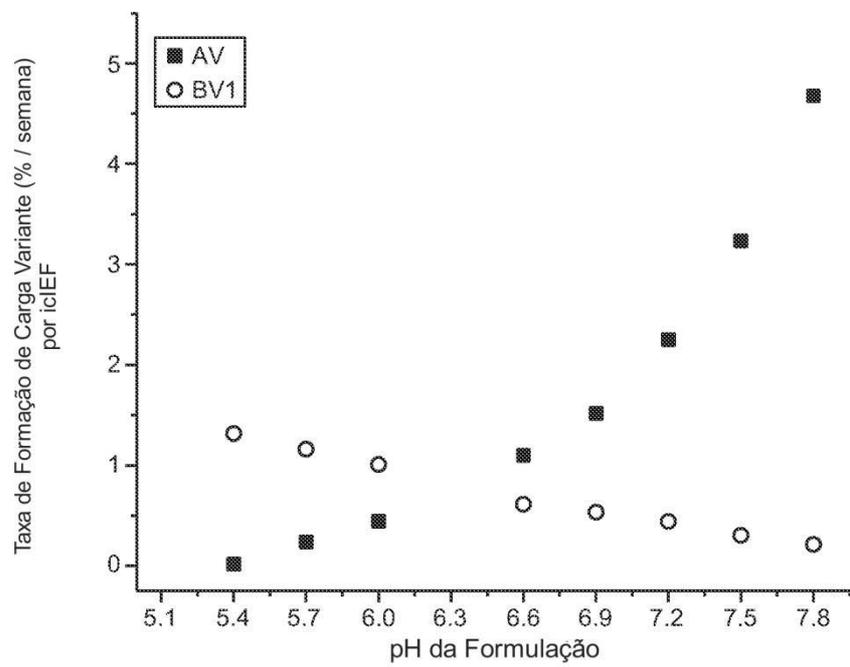
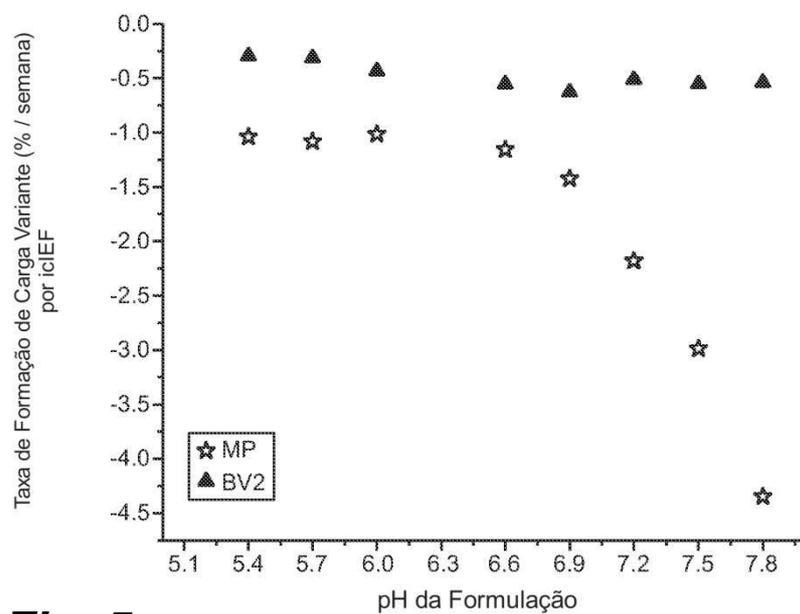
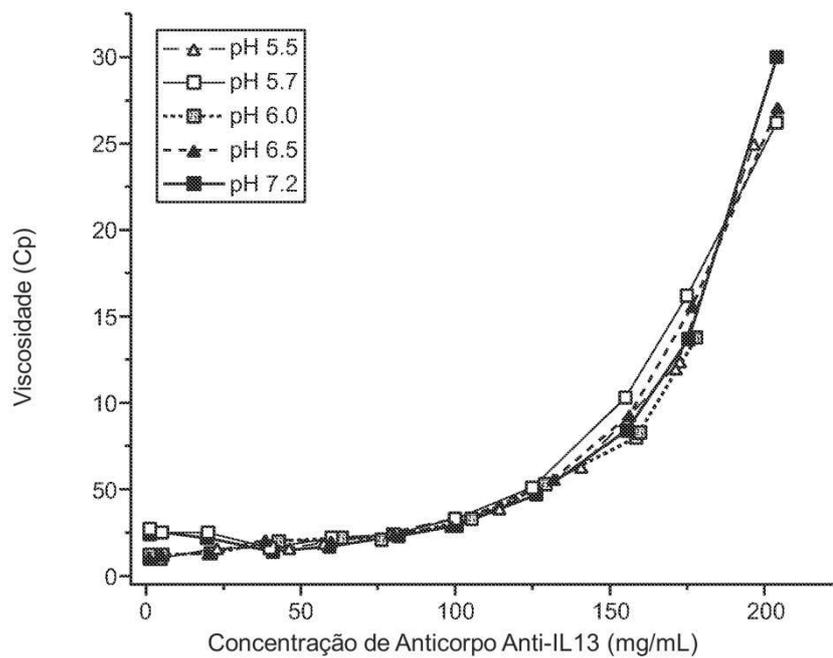
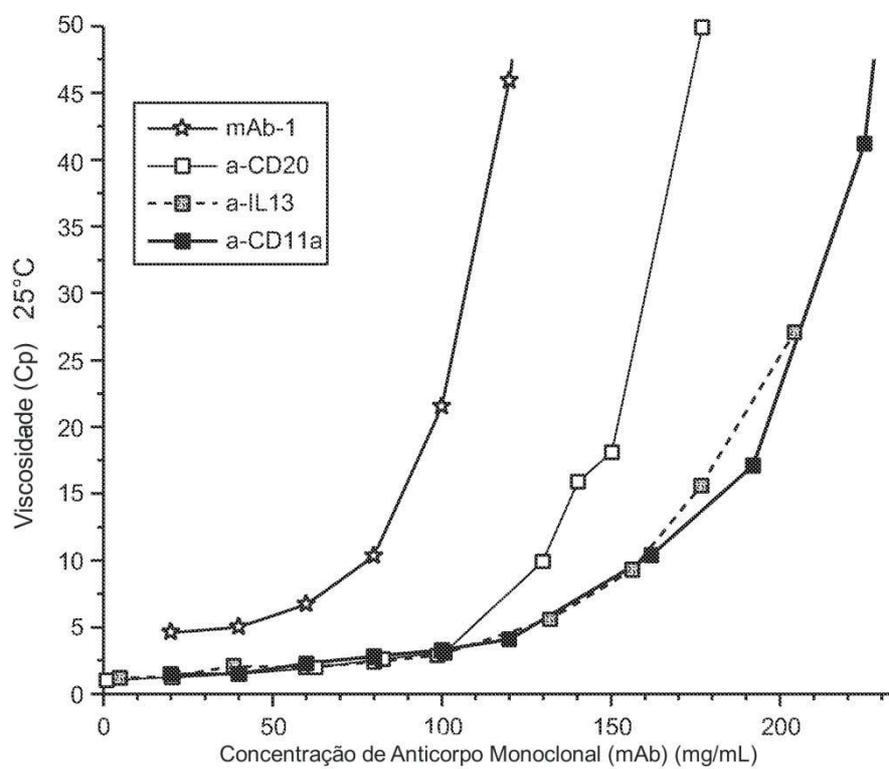
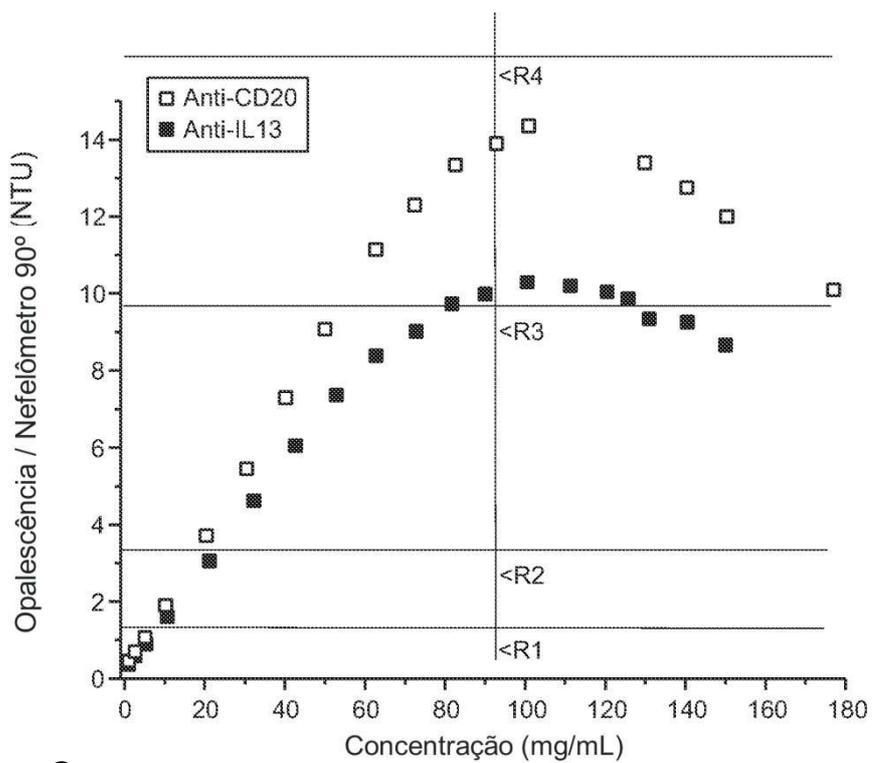
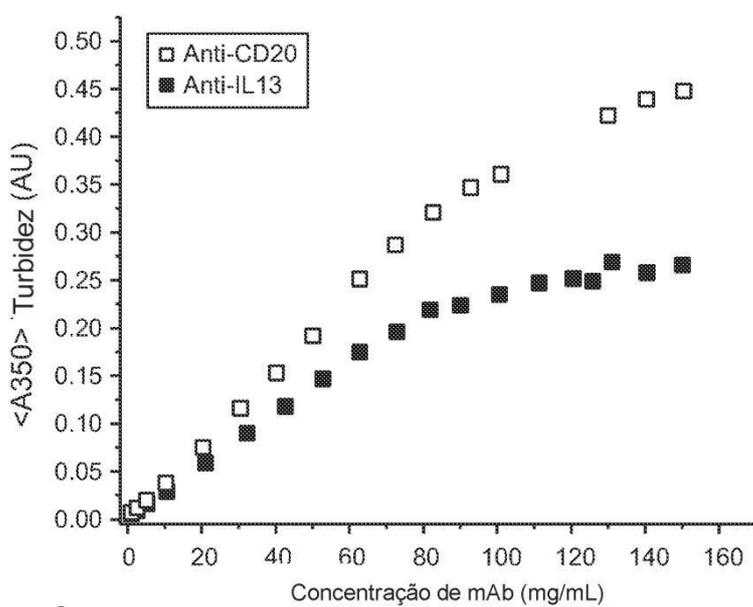
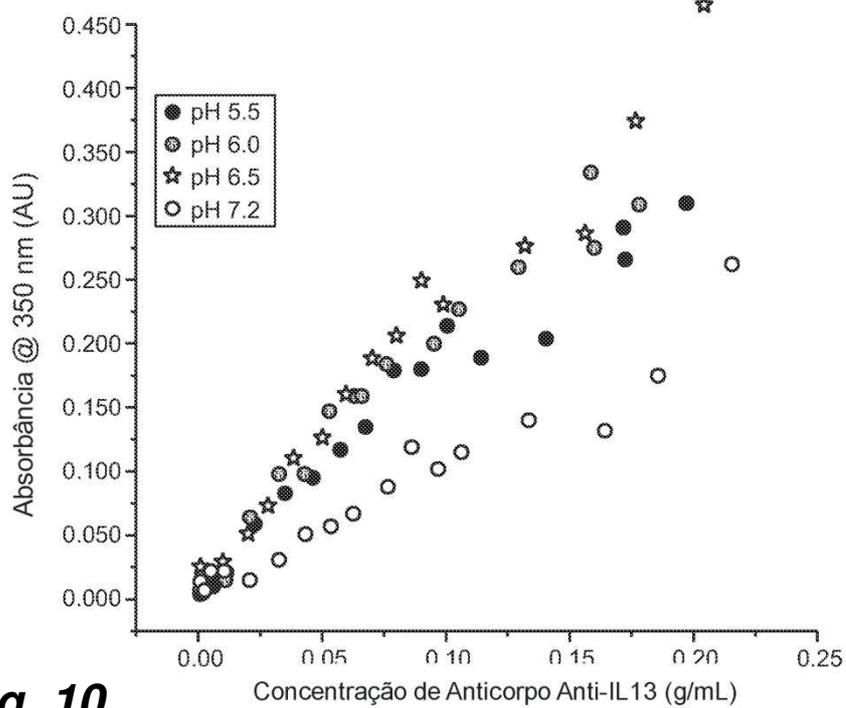
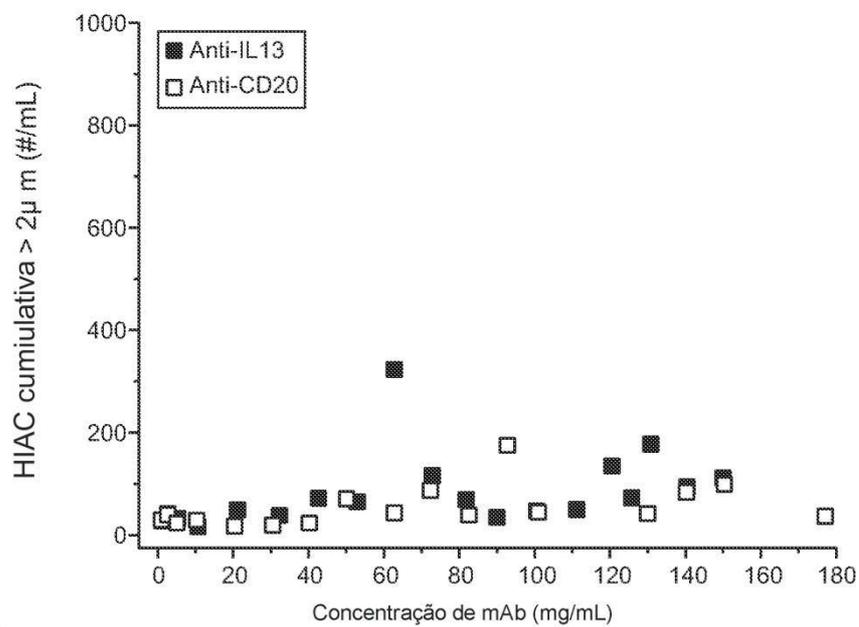


Fig. 4

**Fig. 5****Fig. 6**

**Fig. 7**

**Fig. 8****Fig. 9**

**Fig. 10****Fig. 11**

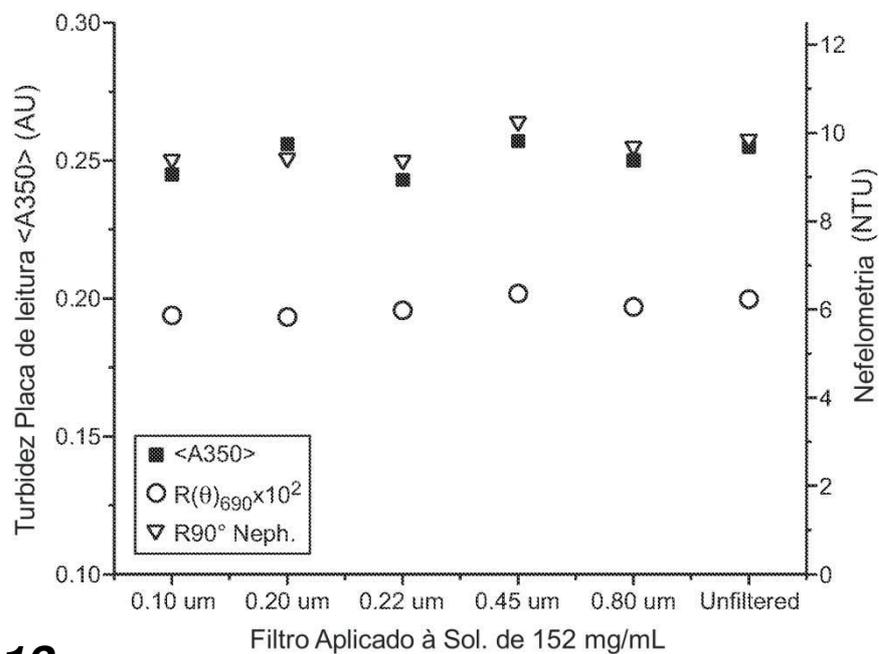


Fig. 12

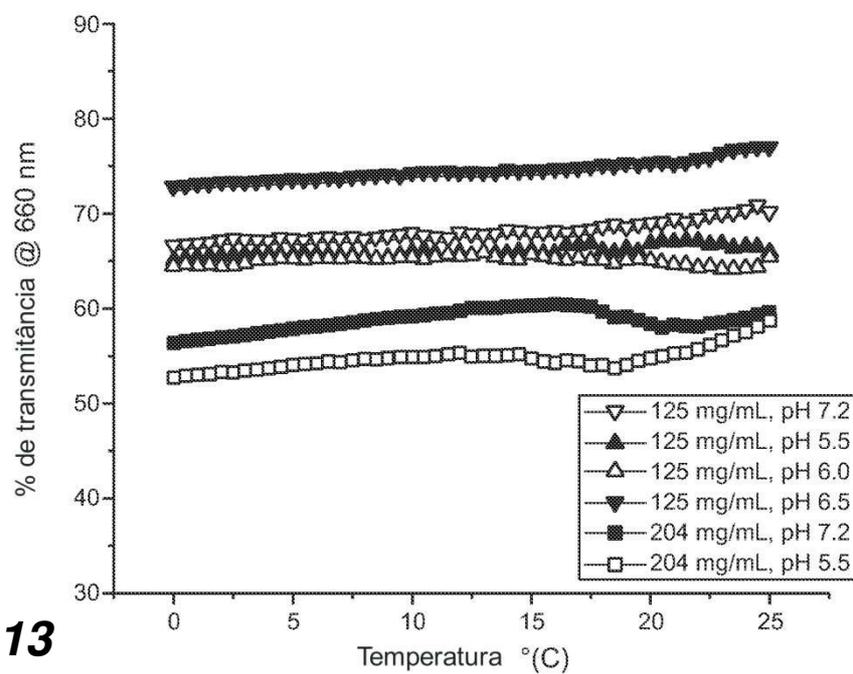


Fig. 13

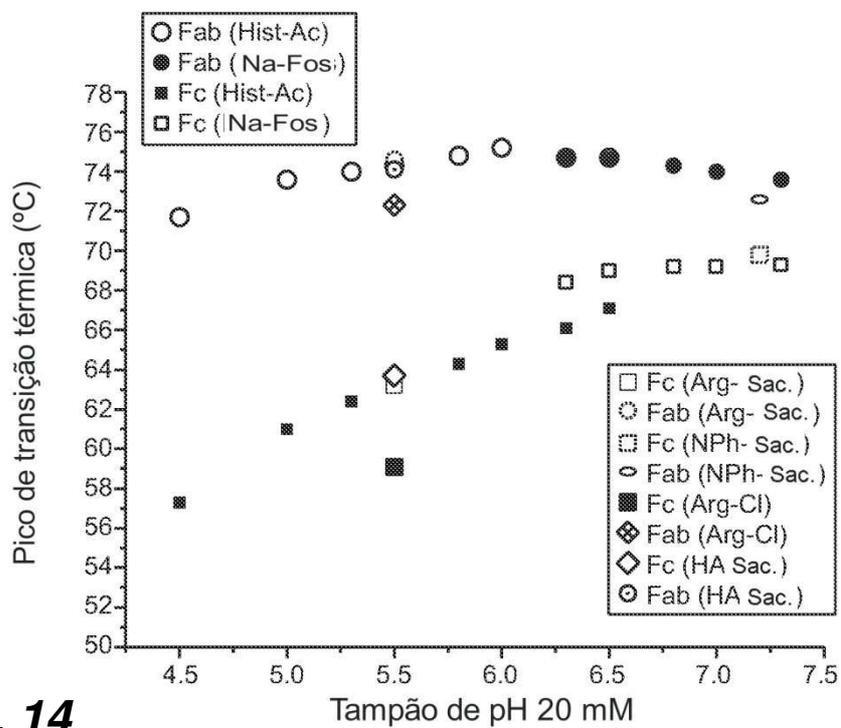


Fig. 14

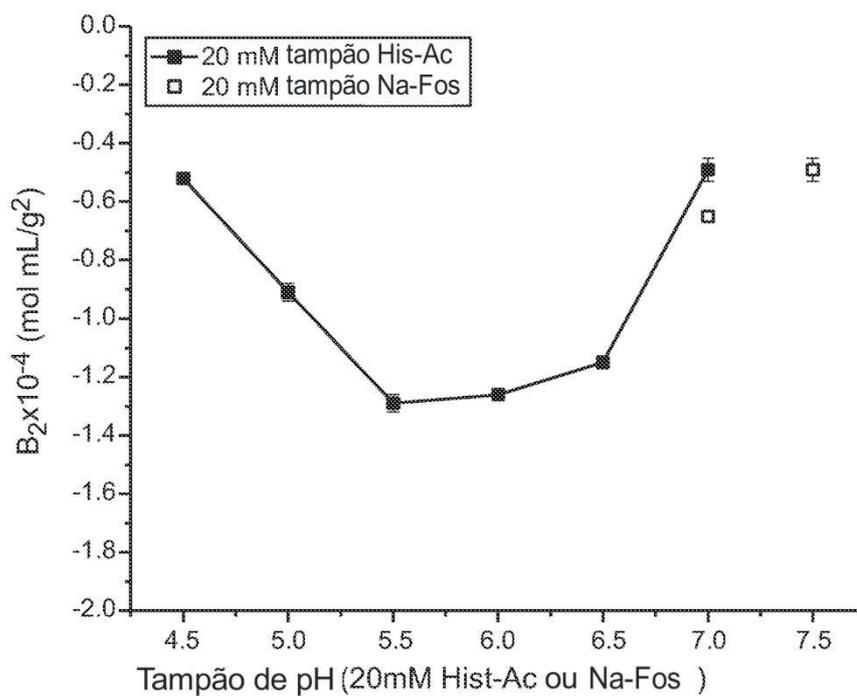


Fig. 15

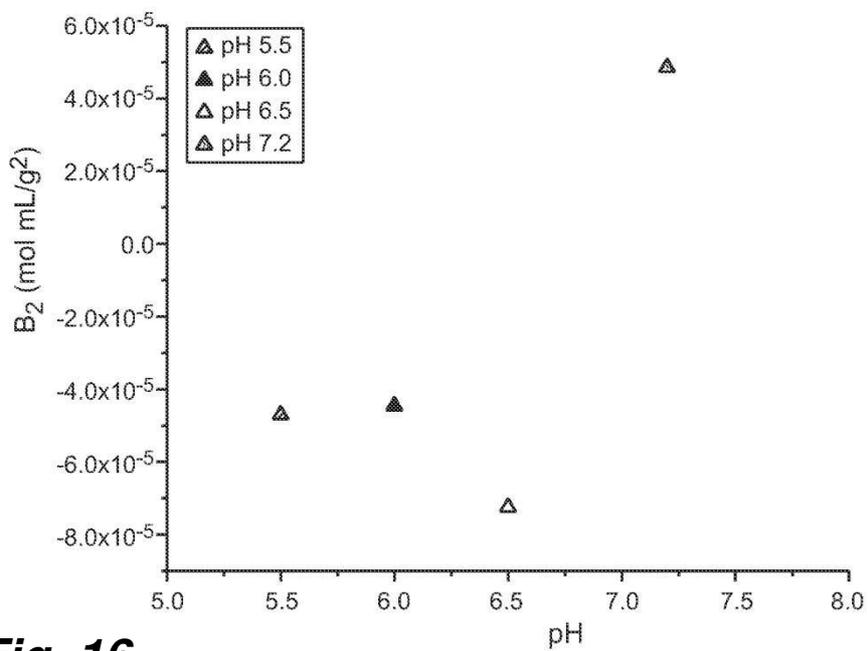


Fig. 16

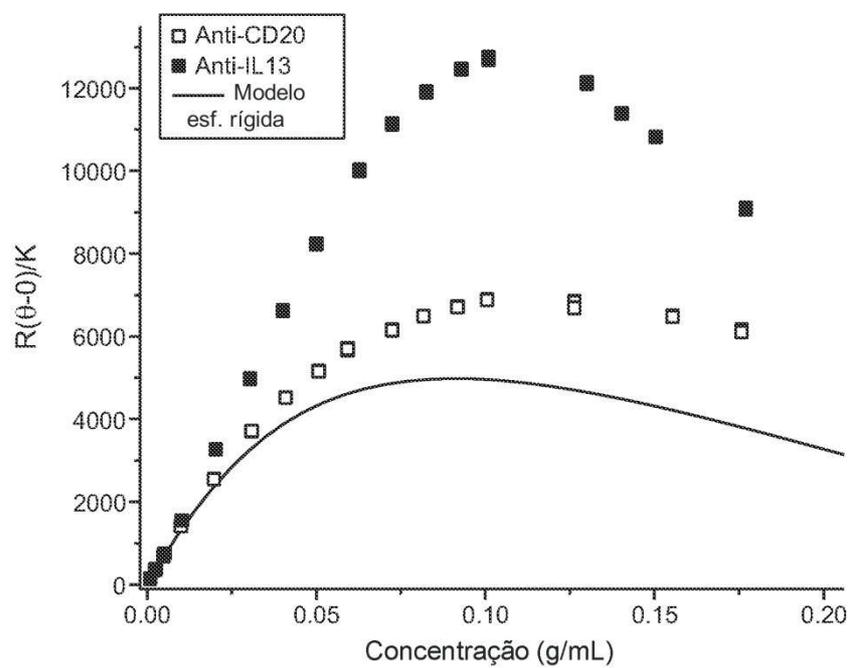
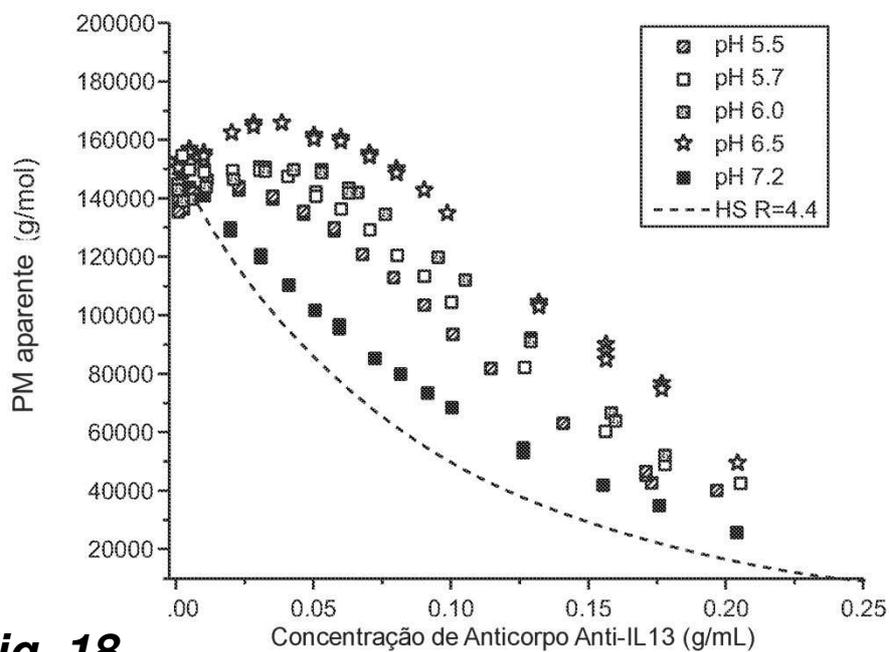
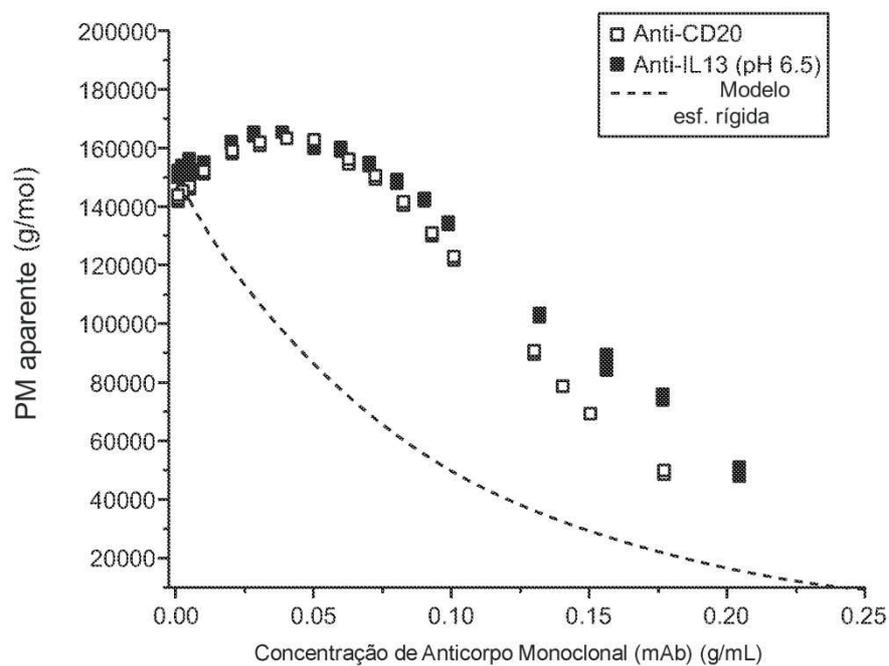


Fig. 17

**Fig. 18****Fig. 19**

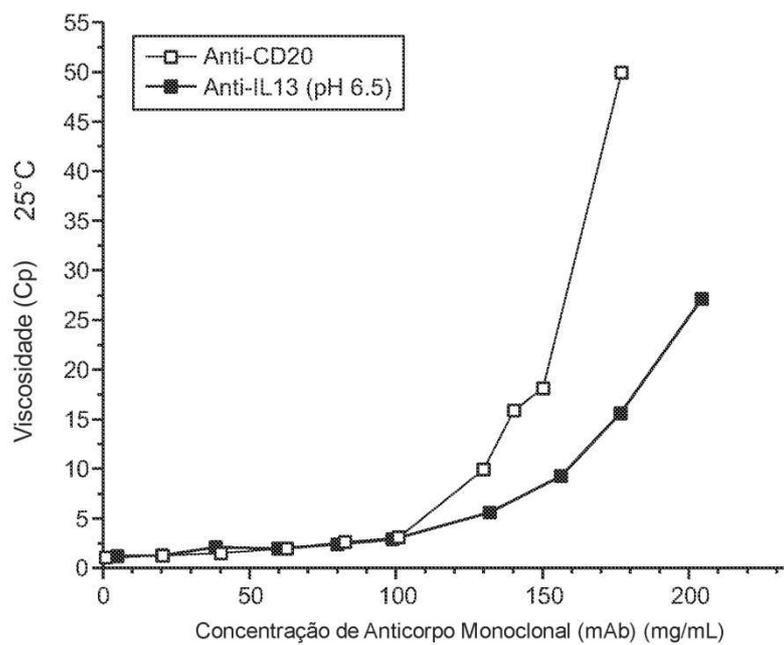


Fig. 20