

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 4 403 579

Domanda di Brevetto Europeo n°24167554.5

Depositata in data 02 maggio 2012

- 5 Titolo: **“FORMULAZIONE PER ANTICORPO ANTI-ALFA4BETA7”**
Titolare: **Millennium Pharmaceuticals, Inc.**, con sede in 40 Landsdowne Street, Cambridge,
MA 02139 / STATI UNITI

DESCRIZIONE

10 **APPLICAZIONI CORRELATE**

La presente domanda richiede priorità alla Richiesta provvisoria americana 61/544,054 depositata il 6 ottobre, 2011 e alla Richiesta provvisoria americana 61/481,522 depositata il 2 maggio, 2011.

LISTA DI SEQUENZA

- 15 La domanda immediata contiene una lista di sequenza.

ANTEFATTO DELL'INVENZIONE

- I progressi nelle biotecnologie hanno reso possibile la produzione di molteplici proteine per le applicazioni farmaceutiche che utilizzano tecniche di DNA ricombinante. Poiché le proteine sono più grandi e più complesse rispetto ai farmaci organici e inorganici tradizionali (cioè
20 possiedono diversi gruppi funzionali oltre a strutture tridimensionali complesse), la formulazione di tali proteine pone particolari problemi. Una formulazione deve preservare l'integrità di conformazione di almeno una sequenza primaria degli aminoacidi della proteina e allo stesso tempo proteggere i gruppi funzionali multipli della proteina da degrado affinché la proteina
25 anticorpi policlonali e monoclonali, in particolare, possono essere relativamente instabili (Vedere

ad esempio, Wang, et al., J. Pharm Sci. 96:1-26 (2007)). Sono disponibili numerose formulazioni e un singolo approccio o sistema non è adatto per tutte le proteine. Sono stati riferiti diversi fattori da considerare (Vedere ad es. Wang et al.).

5 Molteplici caratteristiche possono influenzare la stabilità di una proteina. Infatti, persino in caso di anticorpi purificati, le strutture anticorpali possono essere eterogenee, e complicando quindi ulteriormente la formulazione di tali sistemi. Inoltre, gli eccipienti inclusi nelle formulazioni anticorpali riducono prevalentemente qualsiasi potenziale reazione immunitaria.

10 Nel caso degli anticorpi, è ancora più importante preservare l'integrità della conformazione. Le modalità di degrado per le proteine possono prevedere instabilità chimica (cioè qualsiasi processo che preveda la modifica della proteina con formazione del legame o il clivaggio che sfocia in una nuova entità chimica) o instabilità fisica (cioè, modifiche nella struttura di ordine maggiore della proteina). L'instabilità chimica si manifesta, ad esempio, con deamidazione, isomerizzazione, idrolisi, ossidazione, frammentazione, eliminazione del beta glucano o scambio di disulfide. L'instabilità fisica può derivare da denaturazione, aggregazione, precipitazione o assorbimento, ad esempio. Le quattro vie di degrado più comuni delle proteine sono frammentazione, aggregazione, deamidazione e ossidazione della proteina. Le conseguenze dell'instabilità chimica o fisica della proteina terapeutica includono diminuzione della dose effettiva somministrata, minore sicurezza della terapia dovuta, ad esempio, a irritazione o reattività immunologica e maggiore produzione dovuta ad una durata minore.

20 Molte pubblicazioni hanno presentato, in generale, vari metodi di trattamento dei disturbi infiammatorie intestinali e hanno precisato regimi posologici per la somministrazione di agenti designati a trattare le malattie infiammatorie intestinali. Ad esempio, WO 96/24673 presenta addressine vascolari e il trattamento di malattie associate al reclutamento leucocitario del tratto gastrointestinale come risultato di un leucocita che lega le cellule che esprimono MAdCAM. U.S. 25 2005/0095238 descrive metodi per trattare una malattia associata all'infiltrazione leucocitaria del

tessuto mucoso e la somministrazione negli esseri umani di una quantità efficace di un'immunoglobulina umana o umanizzata o frammento legante l'antigene che ha la specificità di legare l'integrina $\alpha 4\beta 7$. U.S. 2005/0095238 descrive ulteriormente le varie dosi (ad es. 0,15, circa 0,5, circa 1,0, circa 1,5 o circa 2.0 mg di immunoglobulina o frammento per kg) e vari intervalli
5 tra le dosi (7, 14, 21, 28, o 30 giorni). Ad ogni modo, i brevetti e le pubblicazioni summenzionate non rivelano formulazioni specifiche per l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o le dosi specifiche e i regimi posologici descritti e rivendicati nel documento. Suddetti brevetti non rivelano formulazioni, dosi e i regimi posologici che forniscono i metodi di trattamento (coadiuvati dai dati del trial clinico) descritto e rivendicato nel documento.

10 Le formulazioni anticorpali della presente invenzione possono essere utili per inibire i leucociti che si legano alle cellule che esprimono MAdCAM e quindi supportano il trattamento dei disturbi intestinali infiammatori nei pazienti. Ad ogni modo, vi è una necessità impellente di scoprire dosaggi adatti e i regimi posologici di tali composti e di sviluppare formulazioni, preferibilmente sottocutanee, che permettano di ottenere livelli ematici terapeuticamente efficaci
15 e stabili delle formulazioni dell'anticorpo per un periodo di tempo esteso in una forma stabile e conveniente.

SINTESI DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda l'identificazione di un antiossidante o chelante e almeno un aminoacido, quale eccipiente utile per realizzare le formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ la cui
20 instabilità li rende suscettibili a deamidazione, ossidazione, isomerizzazione e/o aggregazione. La formulazione migliora la stabilità, riduce la formazione di aggregati e ritarda il degrado dell'anticorpo. L'invenzione è definita nelle rivendicazioni allegate.

Quindi, in primo luogo, l'invenzione riguarda la formulazione farmaceutica liquida stabile come definito nelle rivendicazioni.

25 In alcune realizzazioni, la formulazione farmaceutica liquida stabile possiede meno

dell'1,0 % di formazione dell'aggregato dopo 12 mesi a temperatura ambiente. La formulazione farmaceutica liquida stabile può avere meno dello 0,2% di formazione dell'aggregato dopo 12 mesi a temperatura ambiente. L'antiossidante o chelante è il citrato.

In alcune realizzazioni, l'aminoacido libero della formulazione è istidina, da sola o in
5 associazione ad alanina, arginina, glicina, acido glutammico. La formulazione può comprendere tra 50 mM e 175 mM di aminoacidi liberi. La formulazione può comprendere tra 100 mM e 175 mM di aminoacidi liberi. Il rapporto dell'aminoacido libero al rapporto molare dell'anticorpo può essere di almeno 250:1.

La formulazione può anche contenere un tensioattivo. Il tensioattivo può essere
10 polisorbato 20, polisorbato 80, un polossamero o qualsiasi loro combinazione.

In alcune realizzazioni, il rapporto molare dell'antiossidante verso il tensioattivo varia da circa 3:1 a circa 156:1.

La formulazione può avere un pH tra 6,3 e 7,0 circa. Il pH della formulazione può aggirarsi tra 6,5 e i 6,8. La formulazione può aggirarsi tra un pH di 6,1 e 7,0 o tra 6,2 e 6,8.

15 In alcune realizzazioni, la formulazione farmaceutica liquida stabile contiene almeno da 60 mg/ml a 160 mg/ml di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La formulazione può contenere almeno circa 160mg/ml di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$. La formulazione può contenere da 150 a 180 mg/ml circa di anticorpi o 165 mg/ml circa di anticorpi.

In un altro caso, l'invenzione riguarda una formulazione farmaceutica liquida stabile che
20 comprende almeno da 60 mg/ml circa a 160 mg/ml dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tampone e almeno 10 mM di citrato. L'agente tampone può essere un tampone di istidina e la formulazione è inoltre definita nelle rivendicazioni.

In un altro caso, l'invenzione riguarda una formulazione farmaceutica liquida stabile che
25 e almeno 5 mM di citrato. L'agente tampone può essere un tampone di istidina.

In un altro caso, l'invenzione riguarda una formulazione farmaceutica liquida stabile che comprende almeno 160 mg/ml dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ e almeno 10 mM circa di citrato come ulteriormente definito nelle rivendicazioni. La formulazione può inoltre contenere polisorbato 80.

In un altro caso, l'invenzione riguarda una formulazione farmaceutica liquida stabile che
5 comprende 160 mg/ml circa dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ e almeno 5 mM circa di citrato come ulteriormente definito nelle rivendicazioni. La formulazione può inoltre contenere polisorbato 80.

In un altro caso, l'invenzione riguarda una formulazione farmaceutica liquida stabile che comprende una miscela dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, istidina, arginina e polisorbato 80. La formulazione può essere presente in un contenitore quale una fiala, cartuccia, siringa o
10 autoiniettore.

L'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ nella formulazione farmaceutica liquida stabile dell'invenzione può essere il vedolizumab. La formulazione dell'invenzione può una somministrazione sottocutanea, per endovena o intramuscolo.

In alcuni casi, la formulazione può ridurre l'immunogenicità dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo di
15 trattamento della malattia infiammatoria intestinale che prevede la somministrazione ad un paziente che necessita della formulazione farmaceutica liquida stabile qui descritta. La somministrazione può avvenire per via sottocutanea. La somministrazione può essere autonoma.

In un altro caso ancora, l'invenzione riguarda un articolo di produzione che comprende
20 un contenitore, una formulazione farmaceutica liquida stabile qui descritta e le istruzioni d'uso.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo per trattare un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale in cui il metodo preveda una fase di somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene che abbia una specificità di
25 legame dell'integrina umana in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante

l'antigene sia somministrato al paziente secondo il seguente regime posologico: (a) le dosi iniziali, ad es. in un regime di trattamento della fase di induzione, di 165 mg di immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene con iniezione sottocutanea ogni giorno per sei dosi; (b) seguito in sesta settimana da una settima e successive dosi, ad es. in un regime di trattamento della fase di mantenimento, di 165 mg di immunoglobulina immunizzata o frammento legante l'antigene tramite iniezione sottocutanea ogni due settimane e ogni quattro settimane come richiesto; in cui il regime posologico induca una reazione chimica e remissione clinica della malattia infiammatoria intestinale del paziente; e ulteriormente in cui l'immunoglobulina o frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$ in cui la regione legante l'antigene preveda tre regioni che determinano complementarità (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena leggera e di tre regioni che determinano complementarità (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena pesante della sequenza aminoacidica di seguito specificata: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è definito nelle rivendicazioni.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo per trattare un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale in cui il metodo preveda una fase di somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene che abbia una specificità di legame dell'integrina umana $\alpha 4\beta 7$ in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene preveda la regione legante l'antigene di origine non umana e almeno una parte di un anticorpo di origine umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene venga somministrato al paziente secondo il seguente regime posologico che comprende una fase di induzione delle dosi endovenose e una fase di mantenimento delle dosi sottocutanea: (a) la dose endovenosa iniziale di 300 mg di immunoglobulina umanizzata o frammento legante

l'antigene come infusione endovenosa; (b) seguita da una successiva dose endovenosa di 300 mg di immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene come infusione endovenosa a circa due settimane dopo la dose iniziale; (c) seguita all'inizio in sesta settimana da una terza e successiva dosi di 165 mg di immunoglobulina immunizzata o frammento legante l'antigene
5 tramite iniezione sottocutanea ogni settimana, ogni due settimane, ogni tre settimane e ogni quattro settimane come richiesto; in cui il regime posologico induca una reazione clinica e remissione clinica della malattia infiammatoria intestinale del paziente; e ulteriormente in cui l'immunoglobulina o frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$ in cui la regione legante l'antigene preveda tre regioni che determinano la
10 complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena leggera e tre regioni che determinano la complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena pesante della sequenza aminoacidica definita in seguito: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è definito nelle rivendicazioni.

15 In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un regime posologico per il trattamento terapeutico del malattia infiammatoria intestinale, mentre il regime posologico prevede la fase di: somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene che abbia specificità legante per l'integrina $\alpha 4\beta 7$ umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o
20 frammento legante l'antigene preveda una regione legante l'antigene di origine non umana e almeno una parte di un anticorpo di origine umana, mentre l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene sia somministrato al paziente secondo un regime posologico sottocutaneo o intramuscolo che mantenga uno steady state medio attraverso la concentrazione di siero dell'immunoglobulina o frammento legante l'antigene da circa 9 a 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; in cui il regime
25 posologico induca una reazione clinica e remissione clinica nella malattia infiammatoria

intestinale del paziente e ulteriormente in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$, in cui la regione legante l'antigene preveda tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a catena leggera variabile e tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a catena pesante variabile della sequenza aminoacidica definita in seguito:
5 catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è definito nelle rivendicazioni.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un regime
10 posologico per il trattamento terapeutico della malattia infiammatoria intestinale, mentre il regime posologico comprende la fase di: somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene che abbia specificità legante per l'integrina $\alpha 4\beta 7$ umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene preveda una regione legante l'antigene di origine non umana e
15 almeno una parte di un anticorpo di origine umana, mentre l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene sia somministrato al paziente secondo un regime posologico sottocutaneo o intramuscolo che mantenga uno steady state medio attraverso le concentrazioni sierose dell'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene da 35 a 40 $\mu\text{g/mL}$ circa; in cui il regime posologico induca una reazione clinica e remissione clinica nella malattia
20 infiammatoria intestinale del paziente e ulteriormente in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$, in cui la regione legante l'antigene preveda tre regioni determinanti la complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a catena leggera variabile e tre regioni determinanti la complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a catena pesante variabile della sequenza aminoacidica
25 definita in seguito: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID

N.:11; catena pesante:: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è definito nelle rivendicazioni.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo per trattare un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale in cui il metodo preveda una fase di: somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene che abbia una specificità di legame dell'integrina umana $\alpha 4\beta 7$ in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene preveda la regione legante l'antigene di origine non umana e almeno una parte di un anticorpo di origine umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante sia somministrato al paziente secondo il seguente regime posologico: (a) una pluralità delle dosi della fase di induzione dell'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene sufficiente a raggiungere una media attraverso la concentrazione sierosa di 20 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ circa dell'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene di circa sei settimane della dose iniziale; (b) seguito da una pluralità di dosi della fase di mantenimento dell'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene come necessario per mantenere uno stady state medio attraverso la concentrazione di siero di 9 a 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ circa o 35 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dell'immunoglobulina o frammento legante l'antigene; in cui il regime posologico induce una reazione chimica e remissione clinica della malattia infiammatoria intestinale del paziente; e ulteriormente in cui l'immunoglobulina o frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$ in cui la regione legante l'antigene preveda tre regioni che determinano la complementarità (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena leggera e tre regioni che determinano la complementarità (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena pesante della sequenza definita in seguito: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è definito nelle

rivendicazioni.

In alcuni casi, la formulazione, o il suo uso in un metodo di trattamento, la dose e/o il regime posologico assicura la probabilità minima che un paziente sviluppi anticorpi reattivi all'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

5 Il paziente può aver sofferto di una carenza di risposta adeguata con, perdita di risposta a, o era intollerante al trattamento con almeno un immunomodulatore, antagonista del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) o una loro combinazione..

La malattia infiammatoria intestinale può essere il morbo di Crohn o la colite ulcerosa. La malattia infiammatoria intestinale può essere una colite ulcerosa da moderatamente a
10 gravemente attiva.

Il regime posologico può favorire la guarigione della mucosa in pazienti che soffrono di colite ulcerosa da moderatamente a gravemente attiva.

Il paziente può essere precedentemente stato sottoposto a terapia con almeno un corticosteroide per la malattia infiammatoria intestinale. Il paziente può essere sottoposto in
15 concomitanza al trattamento con almeno un corticosteroide per il malattia infiammatoria intestinale. Il regime posologico può risultare in riduzione, eliminazione o riduzione e eliminazione della somministrazione del corticosteroide da parte del paziente.

In alcuni casi, l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene viene somministrato in una forma di dosaggio finale ad una concentrazione di circa 1,0 mg/ml fino a
20 circa 1,4 mg/ml. L'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante un antigene può essere somministrato in una forma di dosaggio finale di circa 1,2 mg/ml.

In alcuni casi, l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene viene somministrato in una forma di dosaggio finale avente una quantità di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tra
circa 70 a 250 mg, tra circa 90 a 200 mg, tra circa 150 a circa 180 mg o almeno 160 mg.

25 In alcuni casi, il regime posologico non altera il rapporto da CD4 a CD8 nel fluido

cerebrospinale in pazienti a cui è somministrato suddetto trattamento.

Il paziente può essere una persona di 65 anni o più anziana e che non richieda alcuna modifica del regime posologico.

In alcuni casi la formulazione dell'invenzione per l'uso nel metodo di trattamento con la
5 formulazione di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, la dose, o il regime posologico possono ridurre l'immunogenicità dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1 è un'illustrazione di una sequenza nucleotidica (SEQ ID N.:1) che codifica la
catena pesante di un'immunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzata e la sequenza aminoacidica dedotta
10 della catena pesante (SEQ ID N.:2). La sequenza nucleotidica contiene siti di clonazione (minuscolo), sequenza di Kozak (maiuscolo, nucleotidi 18-23 di SEQ ID N.:1) e sequenza leader (minuscolo, nucleotidi 24-86 di SEQ ID N.:1) alla 5* estremità della catena pesante. La struttura della lettura aperta della sequenza nucleotidica è rappresentata da nucleotidi 24-1433 di SEQ ID N.:1.

15 FIG. 2 è un'illustrazione di una sequenza nucleotidica (SEQ ID N.:3) che codifica la catena leggera di una immunoglobulina umanizzata indicata qui come vedolizumab e la sequenza di aminoacidi dedotti (SEQ ID N.: 4) della catena leggera. La sequenza nucleotidica contiene siti di clonazione (caso minuscolo), sequenza di Kozak (caso superiore, nucleotidi 18-23 di SEQ ID N.:3) e sequenza leader (maiuscolo, nucleotidi 24-80 di SEQ ID N.:3) alla 5* estremità della
20 catena pesante. La struttura della lettura aperta della sequenza nucleotidica sono i nucleotidi 24-737 di SEQ ID N.: 3.

FIG. 3 è un allineamento delle sequenze aminoacidiche della (A) catena leggera umanizzata matura (aminoacidi 20-238 di SEQ ID N.:4) dell'immunoglobulina umanizzata indicata qui come vedolizumab e (B) della catena leggera umanizzata matura
25 dell'immunoglobulina umanizzata indicata come LDP-02 (SEQ ID N.:5). (Riguardo LDP-02,

vedere, WO 98/06248 e Feagan et al., N. Eng. J. Med. 352:2499-2507 (2005)). Feagan et al. descrivono uno studio clinico di LDP-02, ma nell'articolo si riferiscono a LDP-02 come MLN02.) L'allineamento illustra che le sequenze aminoacidiche delle catene leggere di vedolizumab e LDP-02 differiscono nelle posizioni 114 e 115 delle catene leggere mature.

5 FIG. 4 è un allineamento delle sequenze aminoacidiche di (A) una regione costante della catena leggera kappa umana generica (SEQ ID N.:6) e (B) una regione costante della catena leggera kappa murina generica (SEQ ID N.:7). I residui di aminoacido Thr e Val (in cui sono presenti alle posizioni 114 e 115 della catena leggera di vedolizumab maturo (aminoacidi di 133 e 134 della SEQ ID N. 4) sono presenti nella regione costante della catena leggera kappa umana
10 mentre i residui di aminoacidi Ala e Asp (che sono presenti alle posizioni 114 e 115 della catena leggera LPD-02 matura (SED ID N. 5)) sono presenti nella regione costante della catena leggera kappa murina.

 FIG. 5 è una mappa del vettore pLKTOK38D (anche indicato come pTOK38MLN02-TV), che codifica la catena pesante umanizzata e la catena leggera umanizzata di MLN02 ed è
15 adatto alla produzione di vedolizumab nelle cellule CHO. (Vedere, U.S. Patent Application Publication No. 2004/0033561 A1 che rivela che pLKTOK38. pLKTOK38D è una variante di pLKTOK38 in cui i siti di limite indicati sulla mappa supportano la sequenza codificando la regione variabile della catena leggera.)

 FIG. 6 mostra la formazione di aggregati SEC (% per giorno) come risultato di modifiche
20 alla concentrazione proteica, a pH ed al rapporto molare tensioattivo: proteina. All'intervallo del pH da 6,0 a 6,5, la formazione di aggregati era simile per la formulazione con rapporto molare polisorbato 80: proteina nel range da 0,7 a 1,5.

 FIG. 7 è un grafico che mostra il polisorbato 80; rapporti molari della proteina maggiori di 1,5, la velocità di formazione dell'aggregato aumenta man mano che il pH aumenta.

25 FIG. 8 è un grafico che mostra l'effetto degli eccipienti sulla formazione di aggregati.

25mM di citrato, 5 mM di citrato, 5 mM di EDTA, 25 mM di cisteina, o 5 mM di cisteina sono stati aggiunti alle formulazioni. Tutti e tre gli eccipienti hanno ridotto la formazione di aggregati.

FIG. 9 è una serie di grafici che mostra la riduzione della formazione dell'aggregato con la presenza di 25 mM di citrato nella formulazione e una correlazione tra la concentrazione della proteina aumentata e il tasso di formazione di aggregati.

FIG. 10 è un grafico che mostra i risultati del degrado delle specie CEX a 40°C. I dati mostrano l'influenza del cambio di pH sul degrado di CEX.

FIG. 11 è un grafico che mostra l'effetto della temperatura sul pH delle formulazioni. Il pH delle formulazioni a base di istidina diminuisce con la temperatura mentre il pH delle formulazioni di citrato non è influenzato dalla temperatura.

FIG. 12 è un grafico che mostra la percentuale dell'isoforma maggiore CEX per un periodo di dodici mesi. Le formulazioni che hanno un pH di 6,0-6,2 hanno mostrato circa l'1-2% in meno di isoforma maggiore rispetto alle formulazioni che hanno un pH di 6,3-6,4.

FIG. 13 mostra una serie di grafici che confermano che la viscosità è influenzata dalla concentrazione proteica e dal pH. Le aggiunte di saccarosio, istidina e arginina hanno dimostrato di avere un'influenza minore sulla viscosità della formulazione.

FIG. 14 mostra le sequenze aminoacidiche della regione variabile della catena leggera kappa (A) anticorpo GM607'CL umano maturo e (B) la regione variabile della catena pesante 21/28'CL umana.

FIG. 15 mostra componenti di un prodotto proteico in una siringa pre-riempita.

FIG. 16A-B mostra l'effetto (A) di una concentrazione proteica e (B) viscosità sulla forza di iniezione di varie siringhe testate.

FIG. 17 (A) mostra la forza di spinta iniziale come una funzione della concentrazione proteica e la dimensione dell'ago. FIG. 17 (B) mostra la forza di spinta iniziale per ogni produttore di siringhe e dimensione dell'ago.

FIG. 18 mostra il profilo di assorbimento del vedolizumab. Il grafico mostra che le concentrazioni delle dosi intramuscolo e sottocutanee generalmente si sovrappongono. Non esistono differenze evidenti nei profili di assorbimento tra queste vie di somministrazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

5 L'invenzione si riferisce ad una formulazione farmaceutica che comprende anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ come ulteriormente definito nelle rivendicazioni. La formulazione farmaceutica è in forma liquida.

Definizioni

10 Il termine "formulazione farmaceutica" si riferisce alla preparazione che contiene un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in una forma tale da permettere all'attività biologica dell'anticorpo di essere efficace e che non contiene componenti aggiuntivi che sono eccessivamente tossici per un soggetto al quale la formulazione andrebbe somministrata.

Una formulazione "stabile" è una formulazione in cui l'anticorpo mantiene sostanzialmente la sua stabilità fisica e/o la sua stabilità chimica e/o attività biologica dopo la
15 conservazione. In un caso, la formulazione mantiene sostanzialmente la sua stabilità fisica e chimica e la sua attività biologica dopo la conservazione. Il periodo di conservazione viene selezionato generalmente secondo la durata prevista della formulazione. Sono disponibili varie tecniche analitiche per la misurazione della stabilità della proteina e sono riviste, ad esempio, in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York,
20 N.Y., Pubs. (1991) e Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La stabilità può essere misurata ad una temperatura selezionata per un periodo di tempo selezionato. Ad esempio, la formulazione liquida è stabile a circa 40°C per almeno 3 giorni, 5 giorni, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, 4 settimane, 5 settimane o 6 settimane. In un altro caso, la formulazione liofilizzata è stabile a circa 40°C per almeno 2-4 settimane, almeno 3 mesi, almeno 6 mesi, almeno 9 mesi,
25 almeno 12 mesi o almeno 18 mesi circa. Il liquido e/o formulazione liofilizzata in un altro caso è

stabile a circa 5°C e/o 25°C per almeno 1 mese, almeno 3 mesi, almeno 6 mesi, almeno 9 mesi, almeno 12 mesi, almeno 18 mesi, almeno 24 mesi, almeno 30 mesi o almeno 36 mesi circa; e/o stabile a circa -20°C e/o -70°C per almeno 1 mese, almeno 3 mesi, almeno 6 mesi, almeno 9 mesi, almeno 12 mesi, almeno 18 mesi, almeno 24 mesi, almeno 30 mesi, almeno 36 mesi, almeno 42 mesi, almeno 48 mesi circa. Inoltre la formulazione liquida può, in alcune realizzazioni, essere stabile dopo il congelamento (ad es. -80°C) e scongelamento, ad esempio dopo 1, 2 o 3 cicli di congelamento e scongelamento.

La stabilità di una formulazione liquida può essere valutata qualitativamente e (o quantitativamente in molti modi diversi, inclusa la valutazione del dimero, multimerico e/o formazione di aggregato (ad esempio utilizzando la cromatografia ad esclusione di formato (SEC), spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF, ultra-centrifugazione analitica, diffusione della luce (spettroscopia a correlazione di fotoni (DLS), diffusione della luce dinamica (DLS), diffusione della luce statica, diffusione della luce laser multiangolo (MALLS)), immagine microscopica basata su flusso, contatore ad impedenza elettronica (coulter), sistema contatore di particella liquida o oscuramento della luce, misurando la torbidità, e/o l'ispezione visiva); valutando l'eterogeneità di carica utilizzando la cromatografia a scambio cationico (CEX), focus isoelettrico (IEF), ad esempio tecnica capillare (cIEF) o elettroforesi della zona capillare; analisi della sequenza amino-terminale o carbossi-terminale; analisi della spettrometria di massa; analisi SEC o SDS PAGE per confrontare gli anticorpi frammentati, intatti e multimerici (cioè dimerici, trimerici, ecc); mappa peptidica (ad esempio triptica o LYS-C); valutazione dell'attività biologica o funzione di legame dell'antigene dell'anticorpo e simili. La stabilità di una formulazione a stato solido può anche essere valutata qualitativamente e/o quantitativamente in molti modi diversi, inclusi test diretti, quali identificare la struttura di cristallo attraverso la Diffrazione della polvere a raggi X (XRPD) valutando la struttura dell'anticorpo in steady state con spettroscopia a infrarossi di Fourier (FTRI); misurando le transizioni termiche nel solido liofilizzato (fusione,

transizione di vetro, ecc.) con Calorimetria differenziale a scansione (DSC) e i test indiretti ad esempio misurando il contenuto di umidità di Karl Fisher, ad es. per estrapolare la probabilità di un'instabilità chimica attraverso l'idrolisi. L'instabilità può comprendere uno o più: aggregazioni (ad es. aggregazioni solubili non covalenti, aggregazioni solubili covalenti (ad es. 5 risistemazione/mescolamento del legame di disulfide), aggregazione insolubile), deamidazione, (ad es. deamidazione Asn), ossidazione (ad es. ossidazione a umido, isomerizzazione (ad es. isomerizzazione Asp), clippaggio/idrolisi/frammentazione (ad es. frammentazione della regione cardine) formazione di succinimide, estensione N-terminale, elaborazione C-terminale, differenze di glicosilazione e simili.

10 Un anticorpo monoclonale "deamidato" è un anticorpo in cui uno o più residui di asparagina o glutammina sono stati derivatizzati, ad es. ad un acido aspartico a un acido iso-aspartico.

Un anticorpo "suscettibile alla deamidazione" è un anticorpo che comprende uno o più residui che sono hanno la tendenza a deamidarsi.

15 Un anticorpo "suscettibile all'ossidazione" è un anticorpo che comprende uno o più residui che hanno la tendenza a ossidarsi.

Un anticorpo "suscettibile all'aggregazione" è un anticorpo che ha dimostrato di aggregarsi con altre molecole anticorpali, in particolare al congelamento, riscaldamento, essiccazione, ricostruzione e/o agitazione.

20 Un anticorpo "suscettibile alla frammentazione" è un anticorpo che è stato scoperto diviso in due o più frammenti, ad esempio in una regione cardine.

Con "Riduzione di deamidazione, ossidazione, aggregazione o frammentazione" si intende prevenire o diminuire (ad es., all'80%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10%) la quantità di deamidazione, aggregazione o frammentazione relativa all'anticorpo monoclonale formulato a 25 diverso pH in un diverso tampone.

Un “aggregato”, “aggregato SEC” o “aggregato solubile” è più di una o meno di una o pari a 10 proteine anticorpali e/o frammenti associati attraverso le interazioni covalenti, ioniche o idrofobiche per formare un corpo proteico più grande.

Un “aggregato insolubile” o una “particella” è maggiore di 10 proteine anticorpali e/o frammenti associati attraverso le interazioni covalenti, ioniche o idrofobiche per formare un corpo proteico più grande.

Secondo l'uso in questo documento, l'“attività biologica” di un anticorpo monoclonale si riferisce alla capacità dell'anticorpo di legarsi all'antigene con conseguente reazione biologica misurabile che può essere misurata *in vitro* o *in vivo*. Tale attività può essere agonistica o antagonistica.

La molecola della superficie cellulare, “integrina $\alpha_4\beta_7$,” o “ $\alpha_4\beta_7$,” è un eterodimero di una catena α_4 (CD49D, ITGA4) e una catena β_7 (ITGB7). Ogni catena può formare un eterodimero con una catena di integrina alternativa per formare ad esempio $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_E\beta_7$. I geni umani α_4 e β_7 (GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) numeri di accesso Ref Seq NM_000885 e NM_000889, rispettivamente) sono espressi dai linfociti T e B, particolarmente i linfociti CD4+ della memoria. Com'è tipico di molte integrine, l' $\alpha_4\beta_7$ può esistere in uno stato a riposo o attivo. I ligandi per l' $\alpha_4\beta_7$ includono la molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM), la fibronectina e l'addressina muscolare (MAdCAM, ad es., MAdCAM-1).

Secondo l'uso in questo documento, un'immunoglobulina umana o un frammento legante l'antigene che ha una “specificità legante il complesso $\alpha_4\beta_7$ ” si lega a $\alpha_4\beta_7$, ma non a $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_E\beta_7$.

Secondo l'uso in questo documento, una formulazione isotonica ha sostanzialmente la stessa pressione osmotica del sangue umano. Le formulazioni isotoniche generalmente avranno una pressione da 250 a 350 mOsm circa. L'isotonicità può essere misurata usando un osmometro

a pressione di vapore o di tipo a congelamento, ad esempio.

Secondo l'uso in questo documento, "agente tampone" si riferisce al tampone che resiste ai cambiamenti nel pH attraverso l'azione dei suoi componenti acido-base coniugati. L'agente tampone può essere presente in una formulazione liquida dell'invenzione. In alcune realizzazioni, l'agente tampone di questa invenzione regola il pH della formulazione da 5,0 a 7,5 circa a un pH di 5,5 a 7,5 circa, a un pH di 6,0 a circa 7,0 circa o un pH di 6,3 a 6,5 circa. In un caso, gli esempi degli agenti tampone che da soli o in combinazione, controllano il pH nell'intervallo da 5,0 a 7,5 includono acetato, succinato, gluconato, istidina, citrato, fosfato, maleato, cacodilato, 2-[acido N-morfolino]etanesulfonico (MES), bis(2-idrossietil)iminotris[idrossimetil]metano (Bis-Tris), N-[2-acetamido]-2-acido iminodiacetico (ADA), glicilclicina e altri tamponi di acidi organici. In un altro caso, l'agente tampone nel documento è l'istidina o il citrato.

Un "tampone di istidina" è un tampone che contiene ioni di istidina. Esempi di tamponi di istidina includono soluzioni di cloruro di istidina, acetato di istidina, fosfato di istidina, zolfo di istidina. Il tampone di istidina o il tampone di istidina-HCl ha un pH tra 5,5 a 7,00 circa, tra un pH di 6,1 a 6,9 circa, o un pH di 6,5 circa.

Un "tampone di citrato" è un tampone che contiene ioni di citrato. Esempi di tamponi di citrato includono soluzioni di citrato di sodio, citrato di ammonio, citrato di calcio e citrato di potassio. Il tampone di citrato ha un pH da circa 3,0 a 6,2, pH da 5,5 a 6,5 circa, pH da 6,1 a 6,5 circa, pH 6,1, pH 6,2 circa o pH 6,5 circa.

Un "saccaride" è un composto che ha una formula generale $(CH_2O)_n$ e derivati, inclusi monosaccaridi, disaccaridi, trisaccaridi, polisaccaridi, zuccheri dell'alcol, zuccheri riducenti, zuccheri non riducenti e simili. Esempi di saccaridi nel documento includono glucosio, saccarosio, trealosio, lattosio, fruttosio, maltosio, destrano, eritritolo, glicerolo, arabitolo, xilitolo, sorbitolo, mannitolo, melibiosio, melezitose, raffinosio, mannotriosio, stachiosio, maltosio, lactulosio, maltulosio, glucitolo, maltilolo, lactitolo, iso-maltulosio e simili. Un saccaride è un

lipoprotettore. In un caso, un saccaride nel documento è un disaccaride non riducente come il saccarosio.

Nel documento “tensioattivo” si riferisce ad un agente che diminuisce la tensione sulla superficie di un liquido. In un caso, il tensioattivo è un tensioattivo non ionico. Esempi di
5 tensioattivi includono polisorbato (monolaurato di poliossietilene sorbitano, ad esempio polisorbato 20 e polisorbato 80); TRITON (t-Octilfenossipolietoddietanolo, detergente non ionico, , Union Carbide subsidiary of Dow Chemical Co., Midland MI); sodio dodecil solfato (SDS); sodio lauril solfato; sodio octil glucoside; lauril-, miristil-, linoleil-, o stearyl-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o stearyl-sarcosina; linoleil-, miristil-, or cetil-betaina; lauroamidopropil-
10 , cocamidopropil-, linoleamidopropil-, myristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaina (ad es. lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-dimetilamina; sodio methyl cocoil-, o disodio methyl oleil-taurato; sorbitan monopalmitato; e serie MONAQUAT (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); glicole polietilene (PEG), glicole polipropilene (PPG), e copolimeri di glicole di polossietilene e polossipropilene
15 (ad es. Pluronic/Ploxamer, PF68 ecc.); ecc. In un altro caso il tensionattivo è il polisorbato 80.

Il termine “chelante” si riferisce ad un agente che si lega ad un atomo attraverso uno o più legami. In un caso, esempi di chelanti nel documento includono citrato, acido etilendiaminotetraacetico, acido etilenglicoltetra acetico(EGTA), dimercapolo, acido dietilenti-amino-pentacetico, e N,N-bis(carbossimetil)glicina. In un altro caso, il chelante è il citrato o
20 EDTA.

Il termine “antiossidante” si riferisce ad un agente che inibisce l’ossidazione delle altre molecole. Esempi di antiossidanti nel documento includono composti di citrato, acido lipoico, acido urico, glutatione, tocoferolo, carotene, licopene, cisteina, fosfonati, ad es. acido etidronico, deferoxamina e malato.

25 Il termine “anticorpo” nel documento è utilizzato nel senso più ampio e riguarda

specificatamente anticorpi monoclonali a lunghezza completa, immunoglobuline, anticorpi policlonali, anticorpi multi-specifici (ad.es. anticorpi bispecifici) formati da almeno due anticorpi a lunghezza completa, ad es ognuno ad un antigene o epitopo diverso e frammenti leganti l'antigene singolo inclusi dAbs, scFv, Fab, F(ab)'₂, Fab', inclusi anticorpi umani, umanizzati e
5 anticorpi da specie non umane e forme leganti l'antigene ricombinanti come i monocorpi e i diacorpi.

Le quantità molari e i rapporti di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ con gli altri eccipienti descritti nel documento sono calcolati secondo l'assunzione di un peso molecolare approssimativo di circa 150.000 dalton per l'anticorpo. Il reale peso molecolare dell'anticorpo può differire da 150.000
10 dalton secondo la composizione dell'aminoacido o la modifica post-translazionale, ad es. secondo la dipendenza dalla linea cellulare usata per esprimere l'anticorpo. Il reale peso molecolare dell'anticorpo può essere +/- 5% of 150,000 dalton.

Il termine "anticorpo" umano include un anticorpo che possiede una sequenza che deriva da una sequenza immunoglobulinica della linea germinale umana, quale un anticorpo derivato dal
15 topo transgenico con geni immunoglobulinici umani (ad, es., XENOMOUSE topo geneticamente modificato (Abgenix, Fremont, CA), HUMAB-MOUSE[®], KIRIN TC MOUSE[™] topo transcromosomico, KMMOUSE[®] (MEDAREX, Princeton, NJ)), biblioteche di batteriofago, cellule mieloma umano o cellule umane B.

Il termine "anticorpo monoclonale" secondo l'uso in questo documento si riferisce ad un
20 anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, cioè, gli anticorpi individuali che comprendono la popolazione sono identici e/o legano lo stesso epitopo, tranne per possibili varianti che possono sorgere durante la produzione dell'anticorpo monoclonale, come le varianti generalmente presenti in quantità minori. In contrasto alle preparazioni di anticorpi policlonali che includono generalmente diversi anticorpi diretti contro diversi determinanti
25 (epitopi), ogni anticorpo monoclonale è diretto verso un singolo determinante sull'antigene. Il

modificatore “monoclonale” indica il carattere dell’anticorpo ottenuto da una popolazione sostanzialmente omogenea di anticorpi e non va costruito come richiedente la produzione dell’anticorpo attraverso un metodo particolare. Ad esempio, gli anticorpi monoclonali da usare secondo la presente invenzione possono essere prodotti con il metodo ibridoma prima descritto
5 da Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o possono essere creati dai metodi di DNA ricombinante (vedere, ad. es., U.S. Pat. Nr. 4,816,567). Gli “anticorpi monoclonali” possono anche essere isolati dalle librerie di anticorpi fago utilizzando le tecniche descritte in Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) e Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), ad esempio.

Gli anticorpi monoclonali nel testo includono specificatamente anticorpi “chimerici” in
10 cui una parte della catena leggera e/o pesante è identica o omologa alle sequenze corrispondenti di anticorpi derivati da una specie particolare o appartenente ad una classe o sottoclasse anticorpale particolare, mentre il resto delle catene è identico o omologo alle sequenze corrispondenti di anticorpi derivati da altre specie o appartenenti ad altre classi o sottoclassi di anticorpi e a frammenti di tali anticorpi tanto a lungo da mostrare l’attività biologica desiderata
15 (Brevetto americano N. 4,816,567; e Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Gli anticorpi chimerici di interesse includono anticorpi “primatizzati” che comprendono sequenze di legame dell’antigene variabili derivati da una primato non umano (ad es. scimmia del vecchio modo, primate, ecc) e sequenze di regione costante umana.

“Gli antigeni che legano frammenti” delle immunoglobuline umanizzate preparate nella
20 formulazione dell’invenzione comprendono almeno le regioni variabili delle catene leggere e/o pesanti di un anticorpo anti- $\alpha\beta 7$. Ad esempio, un frammento legante l’antigene di vedolizumab comprende residui degli aminoacidi 20-131 della sequenza della catena leggera umanizzata di SEQ ID N.:4. Esempi di tali frammenti leganti l’antigene includono i frammenti Fab, Fab’, scFv e F(ab’)₂ di immunoglobulina umanizzata nota. I frammenti leganti l’antigene delle
25 immunoglobuline umanizzate dell’invenzione possono essere prodotte con clivaggio enzimatico

o con tecniche ricombinanti. Ad esempio, il clivaggio di papaina o pepsina può essere usato per generare frammenti Fab o F(ab')₂ rispettivamente. Gli anticorpi possono anche essere prodotti in molte forme troncate utilizzando geni di anticorpi in cui uno o più codoni di interruzione sono stati introdotti verso il sito di interruzione naturale. Ad esempio, una costruzione ricombinante
5 che codifica la catena pesante di un frammento F(a')₂ può essere indicata per includere sequenze di DNA che codificano il dominio CH₁, regione cardine della catena pesante. In un caso, i frammenti leganti l'antigene inibiscono il legame dell'integrina α4β7 a uno o più dei suoi ligandi (ad es. l'addressina della mucosa MAdCAM (ad es MAdCAM-1), fibronectina).

La digestione papaina di anticorpi produce due frammenti leganti l'antigene identici,
10 chiamati frammenti "Fab", ognuno con un singolo sito di legame dell'antigene e un "Fc" residuo il cui nome riflette la sua capacità di cristallizzare. Il trattamento di pepsina produce un frammento an F(ab')₂ che ha due antigeni leganti l'antigene ed è ancora capace di creare un cross-link con l'antigene.

"Fv" è un frammento di anticorpo che è composto da un dimero di un dominio variabile
15 della catena pesante e un dominio variabile della catena leggera in associazione non covalente.

Il frammento Fab contiene anche il dominio costante della catena leggera e il primo dominio costante (CH1) della catena pesante. I frammenti Fab' differiscono dai frammenti Fab per l'aggiunta di alcuni residui nel terminale carbossilico del dominio della catena pesante CH1 incluse una o più cisteine dalla regione cardine dell'anticorpo. Fab'SH è l'indicazione nel
20 documento del Fab' in cui il residuo di cisteina, dei domini costanti portano almeno un gruppo di tiolo libero. I frammenti di anticorpo (ab')₂ originariamente erano prodotti come coppie di frammenti Fab' che hanno cisteine cardine tra di loro. Altre coppie chimiche di frammenti di anticorpi sono noti.

I frammenti di anticorpo a "catena singola Fv" o "scFv" comprendono i domini
25 dell'anticorpo V_H e V_L mentre questi domini sono presenti in una catena polipeptidica singola. In

un caso, il polipeptide Fv comprende anche un linker polipeptide tra i domini V_H and V_L che consentono all'scFv di formare la struttura desiderata per il legame dell'antigene. Per una revisione dell'scFv vedere Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

5 Il termine "diacorpi" si riferisce a piccoli frammenti dell'anticorpo con due siti leganti l'antigene i cui frammenti comprendono un dominio pesante variabile (V_H) collegato ad un dominio leggero variabile (V_L) nella stessa catena polipeptidica (V_H - V_L). Utilizzando un linker che è troppo corto per consentire l'accoppiamento tra i due domini sulla stessa catena, i domini sono forzati ad accoppiarsi con i domini complementari di 'un'altra catena e creare due siti leganti
10 l'antigene. I diacorpi sono descritti nel dettaglio, EP 404,097; WO 93/11161; e Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticorpo full-length" comprende una regione variabile legante l'antigene così come un dominio costante di catena leggera (C_L) e domini costanti di catena pesante, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . I domini costanti possono essere domini costanti della sequenza nativa (ad es domini costanti delle
15 sequenze native umane) o varianti della sequenza dell'aminoacido. In un caso, l'anticorpo full-length che ha una o più funzioni effettori.

Un anticorpo della "variante della sequenza aminoacidica" è un anticorpo con una sequenza aminoacidica che differisce da un anticorpo di specie principale. Normalmente, le varianti della sequenza aminoacidica presentano un'omologia di almeno il 70% circa, l'80% circa,
20 l'85% circa, il 90% circa o il 95% circa con l'anticorpo di specie principale. Le varianti della sequenza aminoacidica presentano sostituti, cancellazioni e/o aggiunte in certe posizioni entro o adiacenti alla sequenza aminoacidica dell'anticorpo della specie principale ma ritengono l'attività legante l'antigene. Le variazioni della sequenza delle regioni costanti dell'anticorpo avranno meno effetto sull'attività legante l'antigene rispetto alle variazioni nelle regioni variabili. Nelle
25 regioni variabili, le varianti della sequenza aminoacidica sono omologhe al 90% circa, al 95%

circa, al 97% circa, al 98% circa o al 99% circa con l'anticorpo di specie principale.

"Omologia" è definita quale percentuale di residui nella variante della sequenza aminoacidica che sono identici dopo aver allineato le sequenze e introducendo i divari, se necessario, per raggiungere l'omologia di percentuale massima. I metodi e i programmi per i
5 computer per l'allineamento sono noti nell'art.

Un "anticorpo monoclonale terapeutico" è un anticorpo usato per la terapia di un soggetto umano. Gli anticorpi monoclonali terapeutici divulgati nel documento includono anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

Un anticorpo con "varianti di glicosilazione" è un anticorpo con uno o più parti di
10 carboidrati attaccate che differiscono da uno o più parti di carboidrati attaccate a un anticorpo di specie principale. Esempi di varianti di glicosilazione includono anticorpi con una struttura oligosaccaride G1 o G2, invece di una struttura oligosaccaride G0, attaccata ad una regione Fc, anticorpo con una o due parti di carboidrati attaccate a una o "due catene leggere, anticorpo con nessun carboidrato attaccato a una o due catene pesanti dell'anticorpo, ecc., e combinazioni di
15 alterazioni di glicosilazione.

"Funzioni effettrici" dell'anticorpo indicano quelle attività biologiche attribuibili alla regione Fc (una regione Fc di sequenza nativa o regione Fc variante della sequenza di aminoacidi) di un anticorpo. Esempi di funzioni effettrici dell'anticorpo includono il legame C1q; citotossicità dipendente dal complemento; legame del recettore Fc; citotossicità mediata della cellula
20 dipendente dell'anticorpo (ADCC); fagocitosi, regolazione dei recettori della superficie cellulare (ad es. recettore cellula B; BCR) e simili.

Secondo la sequenza aminoacidica del dominio costante delle catene pesanti, gli anticorpi full length possono essere assegnati a diverse "classi". Esistono cinque classi principali di anticorpi full-length: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e molti altri possono essere divisi ulteriormente
25 in "sottoclassi" (isotipi) ad es IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. I domini costanti della catena

pesante che corrispondono alle diverse classi di anticorpi sono chiamate α , δ , ϵ , γ , e μ , rispettivamente. Le strutture sotto-unitarie e le configurazioni tridimensionali di diverse classi di immunoglobuline sono ben note.

Le “catene leggere” di anticorpi derivanti da qualsiasi specie vertebrata possono essere
5 assegnate a uno dei due tipi chiaramente distinti, chiamati kappa (κ) e lambda (λ), secondo la sequenza aminoacidica dei domini costanti.

“Citotossicità mediata dalla cellula dipendente dall’anticorpo” e “ADCC” si riferiscono ad una reazione mediata dalla cellula in cui le cellule citotossiche non specifiche che esprimono i recettori Fc (FcRs) (ad es. cellule killer naturali (NK), neutrofili, e macrofagi) riconoscono gli
10 anticorpi legati su una cellula bersaglio e causano successivamente la lisi delle cellule bersaglio. Le cellule primarie per mediare l’ADCC, le cellule NK, esprimono solo Fc γ RIII, mentre i monociti esprimono Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. L’espressione FcR sulle cellule ematopoietiche è riassunta nella Tabella 3 a pagina 464 di Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Per valutare l’attività ADCC di una molecola di interesse, può essere eseguito un esame
15 *in vitro* ADCC, quale quello descritto in U.S. Pat. Nos. 5,500,362 o 5,821,337. Le cellule effettrici utili per tali analisi includono le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) e le cellule killer naturali (NK). In alternativa, o in aggiunta, l’attività ADCC della molecola di interesse può essere valutata *in vivo*, ad es., in un modello animale quale quello divulgato in Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

20 I termini “recettore Fc” o “FcR” sono usati per descrivere un recettore che si lega alla regione Fc di un anticorpo. In un caso, l’FcR è un FcR umano di sequenza nativa. In un altro caso, l’FcR è uno che lega un anticorpo IgG (un recettore gamma) e include recettori delle sottoclassi Fc γ RI, Fc γ RII, e Fc γ RIII incluse variante alleliche e forme di questi recettori. I recettori Fc γ RII includono Fc γ RIIA (un “recettore attivante”) e Fc γ RIIB (un “recettore inibitore”) che ha sequenze
25 aminoacidiche simile che differiscono primariamente nel dominio citoplasmatico. Il recettore

attivante FcγRIIA contiene un motivo di attivazione basato sulla tirosina immuno-recettore (ITAM) nel suo dominio citoplasmatico. Il recettore inibitore FcγRIIB contiene un motivo di inibizione basato su tirosina immuno-recettore (ITIM) nel suo dominio citoplasmatico. (Vedere, revisione in M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcRs sono recensiti in Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); e de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:33-41 (1995). Altri FcRs, inclusi quelli da identificare in futuro, sono superati dal termine “FcR”. Il termine include anche il recettore neonatale, FcRn, che è responsabile del trasferimento di IgGs materni al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) e Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

10 Il termine “regione ipervariabile” quando usato nel documento si riferisce ai residui aminoacidici di un anticorpo che sono responsabili del legame dell’antigene. La regione ipervariabile comprende generalmente residui di aminoacidi provenienti da una “regione determinante le complementarità” o CDR” (ad es. residui 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) nel dominio variabile della catena leggera 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) nel dominio variabile della catena pesante; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) e/o quei residui da un “loop ipervariabile” (ad esempio 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) nel dominio variabile della catena leggera e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) nel dominio variabile della catena pesante; Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). I residui della “regione framework” o “FR” sono quei residui di dominio variabili diversi dai residui delle regioni ipervariabili come definito nel documento. La regione ipervariabile del CDR può essere trasferita da una catena anticorpo ad un’altra o un’altra proteina per conferire la specificità legante l’antigene all’anticorpo all’anticorpo (composito) o proteina legante risultanti.

25 Le forme “umanizzate di anticorpi non umani (ad es. roditori) sono anticorpi chimerici che contengono una sequenza minima derivata da immunoglobuline non umane. Per gran parte,

gli anticorpi umanizzati sono immunoglobuline umane (anticorpi destinatari) in cui i residui di una regione ipervariabile del destinatario sono sostituiti da residui derivanti da una regione o specie non umana (anticorpo donatore) quale il topo, ratto, coniglio o primate non umano che possiede la specificità, affinità e capacità desiderata. In alcuni esempi, i residui della regione di riferimento (FR) delle immunoglobuline umane sono sostituiti dai residui non umani corrispondenti. Inoltre, gli anticorpi umanizzati possono comprendere residui che non si trovano nell'anticorpo destinatario o nell'anticorpo donatore. Queste modifiche vengono apportate per rifinire ulteriormente la prestazione dell'anticorpo. In generale, l'anticorpo umanizzato comprenderà sostanzialmente almeno uno, e tipicamente due, domini variabili in cui tutti o sostanzialmente tutti i loop ipervariabili corrispondono a quelli di un'immunoglobulina non umana e tutti o sostanzialmente tutti gli FR sono quelli di una sequenza immunoglobulinica umana. L'anticorpo umanizzato comprende anche, in opzione, almeno una parte di una regione costante immunoglobulinica (Fc), tipicamente quella di un'immunoglobulina umana. Pre ulteriori dettagli, vedere Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); e Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Un anticorpo "maturato per affinità" è un anticorpo con una o più alterazioni in una o più regioni ipervariabili presenti nel documento che risultano in un miglioramento dell'affinità dell'anticorpo per l'antigene a confronto ad un anticorpo parente che non possiede queste alterazioni. In un caso, gli anticorpi maturati per affinità avranno affinità nanomolari o persino picomolari per l'antigene di riferimento. Gli anticorpi maturati per affinità sono prodotti da procedure note nell'art. Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992) descrive il mantenimento dell'affinità dal cambio del dominio VH e VL. La mutagenesi casuale del CDR ed i residui framework è descritto in: Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier 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); and Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

Un anticorpo “isolato” è uno che è stato identificato e separato e/o recuperato da un componente del suo ambiente naturale. In alcune realizzazioni, l’anticorpo sarà purificato (1) ad oltre il 95% del peso della proteina come determinato dal metodo Lowry e in alternativa, più del 99% del peso, (2) ad un grado sufficiente per ottenere almeno 15 residui di sequenza aminoacidica N-terminale o interna tramite l’uso di un sequenziatore a coppa rotante o (3) per omogeneità da SDS-PAGE in condizioni di riduzione o non riduzione utilizzando la tintura argento o blu Coomassie. L’anticorpo isolato include l’anticorpo in situ all’interno di cellule ricombinanti poiché almeno un componente dell’ambiente naturale dell’anticorpo non sarà presente. In genere, comunque, l’anticorpo isolato sarà preparato da almeno una fase di purificazione.

“Trattamento” si riferisce al trattamento terapeutico e alle misure profilattiche o preventive. Coloro che necessitano del trattamento includono già coloro con la malattia e coloro la cui malattia o recidiva deve essere prevenuta. Quindi, al paziente da trattare nel documento può essere stata diagnosticata la malattia o può essere predisposto o suscettibile alla malattia. I termini “paziente” e “soggetto” sono utilizzati in maniera intercambiabile nel documento.

L’anticorpo che è formulato è sostanzialmente puro e auspicabilmente sostanzialmente omogeneo (cioè senza proteine contaminanti, ecc). Anticorpo “sostanzialmente puro” significa una composizione che comprende almeno circa il 90% dell’anticorpo per peso, secondo il peso totale della proteina, in alternativa, almeno il 95% o il 97% del peso. Anticorpo “sostanzialmente eterogeneo” significa una composizione che comprende la proteina in cui almeno il 99% del peso della proteina è anticorpo specifico, ad es. anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ secondo il peso totale della proteina.

“Remissione clinica”, secondo l’uso in questo documento rispetto ai soggetti con colite ulcerosa si riferisce ad un score di Mayo completo pari ai 2 o meno punti e nessun sotto-score singolo superiore a 1 punto. “Remissione clinica” del morbo di Chron si riferisce ad uno score CDAI di 150 punti o inferiore.

Una “reazione clinica”, secondo l’uso in questo documento rispetto ai soggetti con colite ulcerosa si riferisce alla riduzione dello score di Mayo completo pari a 3 punti o oltre 30% rispetto a baseline (o score di Mayo parziale pari a 2 punti o superiore e il 25% o superiore rispetto a baseline se lo score di Mayo completo non è stato eseguito alla visita) con una diminuzione di
5 accompagnamento nel sotto-score del sanguinamento rettale di 1 o superiore o score del sanguinamento rettale assoluto di 1 o meno. Una “reazione clinica” secondo l’uso in questo documento in riferimento ai soggetti con morbo di Chron si riferisce ad un aumento di 70 punti o superiore nello score CDAI dalla linea base (settimana 0).

“Guarigione della mucosa” secondo l’uso in questo documento in riferimento ai soggetti
10 con colite ulcerosa, si riferisce al sotto-score endoscopico di 1 punto o meno.

Secondo l’uso in questo documento, “fallimento del trattamento” si riferisce al peggioramento della patologia, una necessità di recuperare medicazioni o intervento chirurgico per il trattamento di colite ulcerosa o morbo di Crohn. Una medicazione di recupero è qualsiasi nuovo farmaco o un aumento della dose di un farmaco di base necessario per trattare la colite
15 ulcerosa non risolta o nuova o i sintomi del morbo di Crohn (oltre agli antidiarroici per il controllo della diarrea cronica).

Formulazioni

Secondo la descrizione in questo documento, è stato scoperto che gli anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ sono più stabili quando formulati con un antiossidante o chelante. Inoltre, come descritto nel
20 documento, gli anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ possono essere formulati per ridurre la formazione dell’aggregato (ad es. la quantità di polisorbato 80 nella formulazione può essere ridotta). Ad esempio, le formulazioni che comprendono citrato o EDTA e anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ diminuiscono la velocità di formazione dell’aggregato dell’anticorpo durante la conservazione. Le formulazioni possono anche essere conservate senza ossigeno per ridurre la formazione dell’aggregato. In una
25 realizzazione, la formulazione presenta una formazione di aggregato dell'anticorpo pari a meno

del 2,5% circa a 25°C dopo 12 mesi. In una realizzazione, la formulazione presenta una formazione di aggregato dell'anticorpo pari a meno del 2,0% circa a 25°C dopo 12 mesi. In una realizzazione, la formulazione presenta una formazione di aggregato dell'anticorpo pari a meno dell'1,6% circa a 25°C dopo 12 mesi. In una realizzazione, la formulazione presenta una
5 formazione di aggregato dell'anticorpo pari a meno del 1,3% circa a 25°C dopo 12 mesi. In una realizzazione, la formulazione presenta una formazione di aggregato dell'anticorpo pari a meno dell'1,0% circa a 25°C dopo 12 mesi. In un'altra realizzazione, la formulazione ha una formulazione dell'aggregato dell'anticorpo pari a meno dello 0,5% circa a 5°C dopo 12 mesi. In un'altra realizzazione, la formulazione ha una formulazione dell'aggregato dell'anticorpo pari a
10 meno dello 0,3% circa a 5°C dopo 12 mesi.

La presente invenzione fornisce, in un primo caso, una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha\beta 7$ stabile come definito nelle rivendicazioni. La formulazione può comprendere inoltre, in opzione, un tensioattivo. L'anticorpo nella formulazione può essere un anticorpo full-length o un frammento legante l'antigene quale Fab, Fv, scFv, Fab' o F(ab')₂.

15 La formazione dell'aggregato può essere ridotta rimuovendo l'ossigeno dalla formulazione. In alternativa, la formulazione può contenere un antiossidante o chelante. In un altro caso, gli antiossidanti esemplari e i chelanti che possono essere inclusi nella formulazione includono l'acido lipoico, l'acido urico, il glutanione, il tocoferolo, il carotene, il licopene, lacisteina, l'acido etilen-diaminetetracetico (EDTA), l'acido etilenglicole tetracetico (EGTA), il
20 dimercapolo, l'acido dietilene triaminepenta acetico, e i composti delfosfonato N,N-bis(carbossimetil)glicina ad es. l'acido etidronico, la deferoxamina, il malato ed il citrato. Alcuni antiossidanti e chelanti possono diminuire la velocità della formazione dell'aggregato durante la conservazione della formulazione. In un altro caso, il chelante e/o l'antiossidante è il citrato o EDTA. Le concentrazioni del chelante esemplare per le formulazioni liquide rientrano
25 nell'intervallo da superiore a 0 mM a circa 60 mM, da circa 5 mM a circa 50 mM, da circa 5 mM

a circa 15 mM, da circa 10 mM a circa 25 mM, e da circa 20 a circa 30 mM. In un altro caso, le concentrazioni del chelante variano da circa 0 mM a circa 30 mM. In una realizzazione, il chelante e/o antiossidante è il citrato e la concentrazione di citrato varia da 0 mM a circa 15 mM, da circa 0 mM a circa 10 mM, da circa 0 mM a circa 5 mM.

5 La formulazione può contenere qualsiasi aminoacido libero desiderato che può essere nella forma L, D o qualsiasi miscela desiderata di queste forme. In un caso, gli aminoacidi liberi che possono essere inclusi nella formulazione includono, ad esempio, istidina, alanina, arginina, glicina, acido glutammico, serina, lisina, triptofano, valina, cisteina e combinazioni varie. Alcuni aminoacidi possono stabilizzare le proteine contro il degrado durante la produzione, essiccazione, 10 liofilizzazione e/o conservazione, ad es. attraverso legami di idrogeno, ponti di sale, proprietà antiossidanti o interazioni idrofobe o per esclusione dalla superficie proteica. Gli aminoacidi possono agire in qualità di modificatori di tonicità o possono diminuire la viscosità della formulazione. In un altro caso, gli aminoacidi liberi, quali l'istidina e l'arginina, possono agire quali lioprotettori e non cristallizzano quando liofilizzati come componenti della formulazione. 15 Gli aminoacidi liberi, quali l'acido glutammico e istidina, soli o in combinazione, possono agire da agenti tampone in soluzione acquosa nell'intervallo del pH da 5 a 7,5. In un altro caso ancora, la formulazione contiene, istidina, arginina o una combinazione di istidina e arginina. In un altro caso ancora, le concentrazioni di aminoacidi liberi per le formulazioni liquide si trovano nell'intervallo da 9 mM a circa 0,5 M, ad esempio, da circa 10 mM a 90 mM, da circa 10 mM a 20 75 mM, da circa 10 mM a 40 mM, da circa 25 mM a 50 mM, da circa 15 mM a 300 mM, da circa 20 mM a 200 mM, da circa 25 mM a 150 mM, da circa 50 mM a 75 mM, da circa 50 mM a 120 mM, da circa 50 a 150 mM, o da circa 50 mM a 125 mM.

La formulazione può contenere ulteriormente, in opzione, almeno un tensioattivo, ad es. per controllare la formazione di aggregato solubile e insolubile. In un caso, il tensioattivo è un 25 tensioattivo non ionico. In un altro caso, il tensioattivo è un tensioattivo ionico. I tensioattivi

esemplari che possono essere inclusi nella formulazione includono, ad esempio, il polisorbato 20, il polisorbato 80, un polossamero (Pluronic®) e loro combinazioni. Quando presente, il tensioattivo è generalmente incluso in una quantità che riduce la formazione di aggregati insolubili dell'anticorpo, ad es. durante l'imbottigliamento, congelamento, essiccamento, 5 liofilizzazione e/o ricostruzione, in presenza di silicone, fiale, siringhe pre-riempite e/o cartucce. La concentrazione di tensioattivo va solitamente da 0,0001% a circa 1,0%, da 0,01% a circa 0,5%, ad esempio, circa 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,20%, 0,3%, 0,4%, o 0,5% (w/v). Concentrazioni di tensioattivi maggiori, ad es. il polisorbato 80 potrebbe permettere ad una maggiore formazione di aggregato SEC. Riducendo la concentrazione del polisorbato 80 si può 10 ridurre la formazione dell'aggregato SEC nel caso di conservazione. In un caso, il rapporto molare tensioattivo:anticorpo varia da 0,7:1 a circa 2,0:1. In un altro caso, il rapporto molare tensioattivo:anticorpo tensioattivo è 1,5:1.

Una realizzazione di una formulazione con anticorpo anti- α 4 β 7 contiene una concentrazione alta di anticorpo anti- α 4 β 7. Ad esempio, in una realizzazione, le formulazioni 15 liquide possono includere almeno 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, 300 mg/ml, da 60 mg/ml circa a 190 mg/ml, da 60 mg/ml a circa 170 mg/ml di anticorpo anti- α 4 β 7, da circa 150 mg/ml a circa 180 mg/ml, o circa 160 mg/ml o circa 165 mg/ml di anticorpo anti- α 4 β 7. In alternativa, in un altro caso, le formulazioni liquide 20 possono prevedere almeno 154 mg/ml, 176 mg/ml.

La formulazione è un liquido. Le formulazioni liquide sono soluzioni acquose o sospensioni, preparate in un solvente acquoso adatto, quale acqua o una miscela acquosa/organica, quale la miscela di alcol acqua. Le formulazioni liquide hanno un pH tra circa 5,5 e 7,5, 6,0 e 7,3, 6,0 e 7,0, 6,0 e 6,5, 6,0 e 6,3, 6,3 e 7,1, o tra 6,4 e 7,0, o tra 6,3 e 6,8, tipo 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 25 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, o 6,9. Le formulazioni liquide possono essere tenute a temperatura ambiente,

refrigerate (ad es. 2-8°C), o congelate (ad es., -20 °C o -70 °C) per lo stoccaggio. Una formulazione solida può essere sciolta, cioè ricostituita, in un mezzo adatto o solvente per diventare liquido adatto alla somministrazione. I solventi adatti alla ricostituzione della formulazione solida includono acqua, salina isotonica, tampone, ad es salina tamponata con fosfato, soluzione Ringer (lattato o destrosio) mezzo essenziale minimo, soluzioni
5 acquose/alcoliche, soluzione destrosio, ecc. Il quantitativo del solvente può generare una concentrazione proteica terapeutica maggiore, uguale o inferiore alla concentrazione prima di seccarsi. In un altro caso, la concentrazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ricostituita è la stessa concentrazione della formulazione liquida pre essiccamento.

10 La formulazione può essere sterile ed è possibile ottenerlo secondo le procedure note alla persona dotata per generare le formulazioni farmaceutiche sterili adatte alla somministrazioni a soggetti umani, prima, o dopo, la preparazione della formulazione. La formulazione può essere sterilizzata come un liquido, ad es. prima dell'asciugatura e/o dopo la ricostruzione attraverso la filtrazione attraverso i piccoli pori, attraverso l'elaborazione asettica o tramite esposizione alle
15 radiazioni ultraviolette. La dimensione di pori del filtro può essere 0,1 μm o 0,2 μm per filtrare microorganismi o da 10 a 20 nm per filtrare le particelle di virus. In alternativa, o in aggiunta, la formulazione secca può essere sterilizzata, ad es. tramite l'esposizione ai raggi gamma. In un caso, la formulazione liquida dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è sterilizzata tramite filtrazione prima di asciugarsi.

20 In un caso, la formulazione è stabile dopo lo stoccaggio. Vari test di stabilità sono disponibili per il medico capace di confermare la stabilità della formulazione. Ad esempio, l'anticorpo nella formulazione liquida può essere stabile dopo la conservazione a 25°C per almeno 4 settimane, 2 mesi, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi, 12 mesi a circa 2-8°C almeno 3 mesi, almeno 1 anno, almeno 2 anni, almeno 3 anni o oltre. In alternativa, inoltre, l'anticorpo nella formulazione può
25 essere stabile a circa 15°C per almeno 4 settimane, almeno 3 mesi, almeno 6 mesi, almeno 9 mesi,

almeno 1 mesi o oltre. In alternativa o in aggiunta, l'anticorpo nella formulazione può essere stabile dopo la conservazione a circa -20 °C o a -70 °C per almeno 4 settimane, almeno 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi, 1 anno, 2 anni, 3 anni, 4 anni o oltre.

La stabilità può essere testata valutando la stabilità fisica, chimica e/o l'attività biologica dell'anticorpo nella formulazione al momento della formulazione e dopo lo stoccaggio nelle temperature precisate. La stabilità fisica e/o chimica di una formulazione liquida o di una polvere secca ricostituita può essere valutata qualitativamente e/o quantitativamente o in vari diversi tipi (vedere, ad es. tecniche analitiche per lo sviluppo biofarmaceutico, Rodriguez-Diaz et al. eds. Informa Healthcare (2005)), inclusa la valutazione di una formazione dell'aggregato solubile e insolubile (ad esempio utilizzando la cromatografia ad esclusione del formato, ultra-centrifugazione analitica, diffusione della luce MALDI-TOF-MS, diffusione della luce (dinamico (DLS) o MALLS), immagine microscopica basata su flusso o altra particella di liquido misurando la torbidità, gradiente di densità centrifuga e/o ispezione visiva); valutando l'eterogeneità di cambio utilizzando la cromatografia a scambio cationico (vedere anche Vlasak and Ionescu, Curr. Pharm. Biotechnol. 9:468-481 (2008) e Harris et al. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 752:233-245 (2001)), il focus isoelettrico sull'elettroforesi della zona capillare; analisi di sequenza carbossiterminale o amino terminale; analisi della spettrometria di massa; analisi SDS-PAGE per confrontare anticorpi frammentati, intatti e multimerici (cioè dimerici, trimerici, ecc.); mappa peptidica (ad esempio triptica o LYS e simili). L'instabilità può risultare in aggregazione, deamidazione (ad es. deamidazione ASN), ossidazione (ad es. ossidazione a umido), isomerizzazione (ad es. isomerizzazione Asp), denaturazione, clippaggio/idrolisi/frammentazione (ad es. frammentazione regione cardine), formazione succinimide, cisteina non doppia, estensione N terminale, elaborazione C terminale, differenze di glicosilazione, ecc. attività biologica o funzione di legame dell'antigene, ad es. legame dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (ad es. MAdCAM-1) ad es. MAdCAM immobilizzato (ad

es MAdCAM-1) può essere valutato usando varie tecniche disponibili al medico dotato (vedere ad es., Soler et al., J. Pharmacol. Exper. Ther. 330:864-875 (2009)). La misurazione del contenuto di umidità di una formulazione secca può indicare quanto è probabile che una formulazione subisca un degrado fisico o chimico, con maggiore umidità che porta a maggiore degrado.

5 Una formulazione stabile può contribuire ad una bassa immunogenicità di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ immunogenico può portare ad una reazione anticorpo umano-anti-umano (HAHA) in soggetti o pazienti umani. I pazienti che sviluppano una reazione HAHA ad un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ possono avere effetti collaterali (ad es. reazione al sito di reazione) dopo il trattamento o possono eliminare un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ velocemente, risultando in una
10 dose inferiore rispetto a quella pianificata dal trattamento. Un rapporto (Feagen et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:2499-2507) di uno studio precedente del trattamento con anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ha indicato che gli anticorpi anti-umani umani si sono sviluppati alla settimana 8 nel 44% dei pazienti trattati. L'anticorpo in questo studio è stato conservato come un liquido e non contiene polisorbato.

15 In alcune realizzazioni, la formulazione può aumentare la proporzione di pazienti negativi HAHA ad almeno il 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% di pazienti a confronto con i risultati HAHA o di una formulazione meno stabile.

In alcune realizzazioni, una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ha $\geq 50\%$ di isoforma caricati, $\geq 55\%$ isoforma caricati maggiori, o 65 a 70% isoforma caricati maggiori. In altri casi,
20 una formulazione stabile anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ha isoforma acidici caricati $\leq 45\%$ isoformi acidici caricati $\leq 40\%$, isoformi acidici caricati $\leq 30\%$ o isoformi acidici 22 a 28%. In ancora altri casi, una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ stabile ha $\leq 25\%$ di isoforma di base, $\leq 20\%$ isoforma di base, $\leq 15\%$ isoforma di base, circa 5% isoforma base o 10% isoforma base. In un caso, una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ stabile ha $\geq 55\%$ isoforma maggiori, $\leq 30\%$ di isoforma
25 acidici e/o $\leq 20\%$ isoforma basici, ad es., come determinato da CEX. In un altro caso, una

formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 stabile ha $\geq 50\%$ di isoforma maggiori, $\leq 45\%$ isoforma acidi e/o $> 10\%$ di isoforma basici ad es determinati da cIEF.

Il tempo necessario per la ricostituzione è ≤ 60 minuti, ≤ 50 minuti o ≤ 40 minuti o ≤ 30 minuti o ≤ 20 minuti.

5 Il contenuto monomero e/o contenuto dell'aggregato (ad es. dimeri, trimeri, tetrameri, pentameri, oligomeri e aggregati di ordine maggiore) cioè nella formulazione liquida o nella formulazione ricostituita, possono essere misurati da SEC, ultra-centrifugazione analitica, diffusione di luce (DLS o MALLS), MALD-TOF MS o misurazione nanoscala, quale analisi di traccia nanoparticella NTA, NanoSight Ltd, Wiltshire, UK). La risoluzione, caratterizzazione e
10 quantificazione dell'aggregato può essere raggiunta in molti modi, incluso l'aumento della lunghezza della separazione della colonna SEC in linea con la colonna SEC analitica iniziale, ad es. da una colonna più lunga o da collegamenti seriali di una seconda o più colonne SEC in linea con la colonna analitica iniziale SEC, che coadiuva la quantificazione di monomeri con la diffusione della luce o usando NTA.

15 In una realizzazione, una formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 ha $\geq 90\%$ di isoforma monomerici, $\geq 95\%$ di anticorpi monomerici, o da 97 a 99% di anticorpi monomerici. In un'altra realizzazione, la maggior parte del materiale nella formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 ha un raggio medio di ≤ 20 nm, ≤ 15 nm, ≤ 10 nm, o circa 5 a circa 7 nm. In un caso, la formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 ha $\geq 80\%$ di quantità più della catena leggera tramite l'analisi della
20 proteina. In un caso, vi è il $\geq 90\%$ più della catena leggera. In un altro caso la formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 ha $\leq 10\%$ di aggregato, $\leq 5\%$ di aggregato, $\leq 2,5\%$ di aggregato, $\leq 1,5\%$ di aggregato, $\leq 1,0\%$ di aggregato o $\leq 0,5\%$ di aggregato. In un altro caso, la formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 stabile ha un monomero $\geq 96\%$ e/o $\geq 2,5\%$ di un aggregato. In un altro caso ancora, una formulazione dell'anticorpo anti- α 4 β 7 stabile ha circa il 99% del monomero e/o
25 $< 1\%$ di aggregato.

Il formato delle particelle, maggiore da 1 a 2 micron, ad es., di aggregati o eccipienti non dissolti, cioè nelle formulazioni liquide o nella formulazione ricostituita può essere misurato oscurazione di luce (ad es. il sistema di conteggio della particella di liquido (HIAC) da Hach Ultra Analytics (Grants Pass, OR)), microscopica, contatore coulter, o digitale (ad es. basso flusso sistema basato su immagini microscopiche come l'immagine dei microfluidi (MFI) da Brightwell (Ottawa, CA) o FLOWCAM® analizzatore particella di immagine da Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME). In un caso, la dimensione della particella nella preparazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è di circa 30 μm , 25 μm , 10 μm , 5 μm , 2 μm o 1 μm o meno. La quantità di particelle dovrebbe essere ridotta in formulazioni di anticorpi. In un caso, una quantità di particelle in una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è < 6000 particelle $\geq 10 \mu\text{m}$ di diametro e/o diametro da < 600 particelle $\geq 25 \mu\text{m}$ in una dose (U.D. Pharmacopoeia Chp). 788, il metodo di conteggio con oscurazione di luce; metà di quelle quantità del metodo di qualifica microscopica). In un altro caso, una quantità di particelle in una dose della formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è 1000 particelle $\geq 10 \mu\text{m}$ e circa 100 particelle $\geq 25 \mu\text{m}$ (U.D. metodo)). In un altro caso, una quantità di particelle per millilitro, ad es. per misurazione MFI, in una dose di formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è da circa 500 a circa 2000 di particelle 2-10 μm per ml, da circa 50 a circa 350 di $\geq 10 \mu\text{m}$ particelle per ml e da circa 0 a circa 50 di $\geq 25 \mu\text{m}$ di particelle per ml. In un altro caso, una quantità di particelle in una dose di una formulazione di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è da circa 500 a 100.000, da circa 1000 a circa 5.000, da circa 1500 a circa 3000 di particelle 2-10 μm per ml.

La viscosità di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può essere controllata da somministrazione sottocutanea o intramuscolo. La viscosità può essere compromessa dalla contrazione proteica e dal pH. Ad esempio, man mano che la concentrazione proteica aumenta, la viscosità aumenta. Un aumento nel PH può diminuire la viscosità della formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In alcune formulazioni della proteina, il cloruro di sodio è aggiunto per ridurre la viscosità della formulazione. I componenti aggiuntivi che possono influenzare la

viscosità di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ sono aminoacidi quali istidina e arginina.

Una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può essere isotonica (ad es., 250-350 mOsm) o ipertonica (ad es., maggiore di 350 mOsm, maggiore di 450 mOsm, maggiore di 550 mOsm o maggiore di 650 mOsm), ad es., per somministrazione sottocutanea o intramuscolo. In un caso, 5 la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ non è ipotonica, ad es. meno di 250 mOsm, in un altro aspetto, la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è di circa 350 a circa 400 mOsm, circa 400 a circa 450 mOsm o circa 350 a circa 450 mOsm.

L'instabilità che porta alla denaturazione può essere valutata con la calorimetria differenziale a scansione (DSC). Gli anticorpi hanno due temperature di fusione (T_m) in DSC, ad 10 es., T_{m1} e T_{m2} . Alcuni eccipienti possono influenzare la stabilità dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Un esito di una temperatura di fusione più elevata a confronto con le formulazioni di DSC possono indicare una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ più stabile con T_m superiore. Ad esempio, al pH 5,7, il T_m di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è inferiore e quinpari a meno stabile del pH a 6,5. In un caso il T_{m1} di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è $>60^\circ\text{C}$. In un altro 15 caso il T_{m1} di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è di circa 65°C a circa 70°C o circa 69°C . In un caso, il T_{m2} di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è $>80^\circ\text{C}$. In un altro caso, il T_{m2} di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è di circa 82°C a 88°C o circa 86°C .

In una realizzazione, una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ha un'affinità di legame o un valore EC_{50} di circa il 60% a circa il 140% dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ di riferimento standard. 20 In un caso, un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in una formulazione descritta nel documento si lega all' $\alpha 4\beta 7$, ad es. su una cellula (WO98/06248 o N. Brevetto americano 7,147,851), ad un valore di circa 80% a 120% dello standard di riferimento. In un'altra realizzazione, una formulazione di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ ha la capacità di inibire almeno il 50% o almeno il 60% del legame di una cellula che esprime integrina $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (ad es., MAdCAM-1), ad es., una chimera 25 MAdCAM-Ig (vedere Richiesta di brevetto americano n. 20070122404, anche per esempi dello

standard di riferimento).

Come notato prima, il congelamento della formulazione è contemplato in maniera specifica nel documento. Quindi, la formulazione può essere testata per la stabilità al congelamento o scongelamento. Di conseguenza, l'anticorpo in una formulazione liquida può essere stabile dal congelamento o allo scongelamento della formulazione, ad esempio, l'anticorpo può essere stabile dopo uno, due, tre, quattro, cinque o più cicli di congelamento/scongelamento.

In alcune realizzazioni, la formulazione farmaceutica è una formulazione liquida che comprende almeno circa da 60 mg/ml a 170 mg/ml dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tampone (ad es. istidina) e almeno 5 mM di citrato come ulteriormente definito nelle rivendicazioni. In alcune realizzazioni, la formulazione è una formulazione liquida che comprende almeno da 60 mg/ml a 170 mg/ml circa dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tampone (ad es. citrato), aminoacido (ad es. arginina) e tensioattivo (ad es. polisorbato 80) come ulteriormente definito nelle rivendicazioni.

In un'altra realizzazione, la formulazione comprende almeno circa 140 mg/ml o circa 150 mg/ml fino a 170 mg/ml, ad esempio, circa 160 mg/ml di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tampone (ad es. istidina), almeno 5mM di citrato e un amino acido libero (ad es. arginina) come ulteriormente definito nelle rivendicazioni.

In un'altra realizzazione, la formulazione comprende almeno 160 mg/ml di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tampone (ad es. istidina) almeno 5 mM citrato, 0,2% polisorbato 80 e un amino acido libero (ad es. arginina). In una realizzazione, la concentrazione del tampone nella formulazione è di 15 a circa 78 mM, da 25 a circa 65 mM o circa 50 mM. La concentrazione di aminoacido libero nella formulazione varia da 50 a circa 250 mM, da 75 a circa 200 mM, da 100 a circa 150 mM o circa 125 mM; la concentrazione di polisorbato 80 nella formulazione è di da circa 0,05% a 0,4%, da circa 0,1% a 0,4%, circa 0.1% a 0.3%, da circa 0,1% a 0,25%, da circa 0,1% a 0,2%, o ad circa 0,2%.

In una realizzazione, la formulazione è liofilizzata e conservata come dose singola in un contenitore, ad es fiala, siringa, cartuccia e/o auto-iniettore. Il contenitore può essere conservato a circa 2-8°C o 25°C fin quando è somministrato ad un soggetto che ne ha bisogno. La fiala può ad esempio essere a 5, 10 o 20 cc (ad esempio per una dose di 160 mg/ml). La fiala può contenere
5 almeno circa 20 mg, 50 mg, 70 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 155 mg, 180 mg, 200 mg, 240 mg, 300 mg, 360 mg, 400 mg, 540 mg, 900 mg di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In un caso il contenitore contiene circa 165 mg di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

In un'altra realizzazione, la formulazione è liquida e può essere conservata come dose singola in una o due fiale, cartucce, siringhe o auto-iniettori. La fiala, cartuccia, siringa o auto-
10 iniettore possono essere conservati a circa 2-8°C fin quando il contenuto, ad es un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, viene somministrato ad un soggetto che ne ha bisogno. La fiala può ad esempio essere da 5, 10 o 20 cc (ad esempio per una dose di 160 mg/ml). La fiala può contenere almeno circa 20 mg, 50 mg, 70 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 155 mg, 180 mg, 200 mg, 240 mg, 300 mg, 360 mg, 400 mg, 540 mg, 900 mg di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In un caso la fiala contiene circa 165 mg di
15 anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La siringa o cartuccia possono essere un contenitore da 1 mL o 2 mL (ad esempio per una dose di 160 mg/mL) o oltre 2 mL ad es. per una dose maggiore (almeno 320 mg o 400 mg o superiore). La siringa o cartuccia può contenere almeno circa 20 mg, 50 mg, 70 mg, 80 mg, 100 mg, 120 mg, 155 mg, 180 mg, 200 mg, 240 mg, 300 mg, 360 mg, 400 mg, 500 mg di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

20 Uno o più altri trasportatori farmaceuticamente accettabili, eccipienti o stabilizzatori come quelli descritti in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Hendrickson, R. Ed. (2005) possono essere inclusi nella formulazione fornita che non comprometteranno le caratteristiche auspiccate della formulazione. I trasportatori accettabili, eccipienti o stabilizzatori non sono tossici per i destinatari alle dosi e concentrazioni impiegate e
25 includono agenti tampone aggiuntivi; co solventi; antiossidanti incluso il citrato e la cisteina; gli

agenti chelanti quali EDTA; complessi metallici (ad es. proteine Zn complesse); polimeri biodegradabili quali poliesteri; conservanti; lubrificanti pareti contenitore, ad es. silicone, olio minerale, glicerina o TRIBOGLIDE® (Tribo Film Research, Inc.) derivato perfluoropolietere per facilità di iniezione e formazione di sale come il sodio.

5 **Anticorpi $\alpha 4\beta 7$**

Gli anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ adatti per l'uso nelle formulazioni includono anticorpi provenienti da qualsiasi fonte, tipo anticorpi completamente umani, anticorpi murini, anticorpi del coniglio e simili e qualsiasi anticorpo ideato come gli anticorpi chimerici, umanizzati e simili. I frammenti legante l'antigene di qualsiasi di questi tipi di anticorpi, tipo frammenti Fab, Fv, scFv, Fab' e
10 F(ab')₂, sono anche disponibili per uso nelle formulazioni. Gli anticorpi sono ulteriormente definiti nelle rivendicazioni.

L'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può legarsi ad un epitopo sulla catena $\alpha 4$ (ad es. MAb 21.6 umanizzato (Bendig et al., U.S. Pat. No. 5,840,299)), sulla catena $\beta 7$ (ad es., FIB504 o un derivato umanizzato (ad es., Fong et al., Brevetto americano N. 7,528,236)), o epitopo combinatoriale
15 formato dall'associazione della catena $\alpha 4$ con catena $\beta 7$ chain. In un caso, l'anticorpo si lega ad un epitopo combinatoriale sul complesso $\alpha 4\beta 7$ ma non si lega ad un epitopo sulla catena $\alpha 4$ o $\beta 7$ a meno che le catene siano unite l'una all'altra. L'associazione di integrina $\alpha 4$ con $\beta 7$ può creare un epitopo combinatoriale ad esempio portando in prossimità residui presenti sulle catene che comprendono un epitopo o esponendosi sulla catena, ad es. la catena di integrina $\alpha 4$ sulla catena
20 di integrina $\beta 7$, un sito di legame epitopico che non è accessibile al legame dell'anticorpo in assenza del partner di integrina adatto o in assenza di attivazione dell'integrina. In un altro caso, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ si lega alla catena dell'integrina $\alpha 4$ e $\beta 7$ e quindi, è specifico per il complesso di integrina $\alpha 4\beta 7$. Tali anticorpi possono legarsi a l' $\alpha 4\beta 7$ ma non a $\alpha 4\beta 1$ e/o non $\alpha E\beta 7$, ad esempio. In un altro caso, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ si lega allo stesso o sostanzialmente lo stesso
25 epitopo come l'anticorpo Act-1 (Lazarovits, A. I. et al., J. Immunol., 133(4): 1857-1862 (1984),

Schweighoffer et al., J. Immunol., 151(2): 717-729, 1993; Bednarczyk et al., J. Biol. Chem., 269(11): 8348-8354, 1994). La linea cellulare ibridoma ACT-1 che produce l'anticorpo monoclonale Act-1 murino, è stato depositato secondo i provvedimenti del Trattato di Budapest, 22 agosto 2001, per conto del Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A., presso l'American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A., ad Accesso N. PTA-3663. In un altro caso, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è un anticorpo umano o un proteina legante $\alpha 4\beta 7$ usando il CDR forniti in Pubblicazione Richiesta di Patente americana N. 2010/0254975.

In un caso, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ inibisce il legame di anti- $\alpha 4\beta 7$ a uno o più dei suoi ligandi (ad es l'addressina della mucosa, MAdCAM (ad es. MAdCAM-1), fibronectina, e/o addressina vascolare (VCAM)). Gli MAdCAM primati (ad es., MAdCAM-1) sono descritti nella pubblicazione PCT WO 96/24673, l'intero insegnamento di qui sono allegati qui tramite questo riferimento. In un altro aspetto, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ inibisce il legame di $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) e/o fibronectina senza inibire il legame di VCAM.

In un caso, gli anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ per uso nelle formulazioni sono versioni umanizzate del dell'anticorpo del topo Act-1. Metodi adatti per preparare gli anticorpi umanizzati sono ben noti. Generalmente l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzato conterrà una catena pesante che contiene le 3 regioni determinanti la complementarità della catena pesante (CDRs, CDR1, SEQ ID N.:8, CDR2, SEQ ID N.:9 e CDR3, SEQ ID N.:10) dell'anticorpo Act-1 del topo e le regioni framework della catena umana adatta; e contiene anche una catena leggera che contiene le 3 catene leggere CDRs (CDR1, SEQ ID N.:11, CDR2, SEQ ID N.:12 e CDR3, SEQ ID N.:13) dell'anticorpo del topo Act-1 e le regioni framework della catena leggera umana adatta. L'anticorpo Act-1 umanizzato può contenere qualsiasi regione framework umana, incluse le regioni framework di consenso con o senza le sostituzioni aminoacidiche. Ad esempio, uno o più aminoacidi framework possono essere sostituiti con un altro aminoacido quale l'aminoacido nella posizione

corrispondente nell'anticorpo del topo Act-1. La regione costante umana o porzione, se presente, può derivare dalle catene leggere κ o λ e/o γ (ad es., γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4), μ , α (ad es., α_1 , α_2), δ o ϵ catene pesanti di anticorpi umani, incluse variante alleliche. Una particolare regione costante (ad es. IgG1) variante o porzione, può essere selezionato per ideare la funzione dell'effettore. Ad esempio, una regione costante mutata (variante) può essere inserita in una proteina di fusione per ridurre il legame ai recettori Fc e/o la capacità di fissare il complemento (vedere es., Winter et al., GB 2,209,757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, Dec. 22, 1994). Versioni umanizzate dell'anticorpo Act-1 sono state descritte nelle pubblicazioni PCT n. WO98/06248 e WO07/61679.

10 Gli anticorpi umanizzati anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ per l'uso nella formulazione dell'invenzione comprendono una regione variabile della catena pesante che comprende aminoacidi da 20 a 140 di SEQ ID N.:2, e una regione variabile della catena leggera che comprende aminoacidi da 20 a 131 della SEQ ID N.:4 o aminoacidi 21 a 132 di SEQ ID N.:5. Se necessario, può essere presente una regione costante umana. Ad esempio, l'anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ umanizzato può comprendere una
15 catena pesante che comprende aminoacidi da 20 a 470 di SEQ ID N.:2 e una catena leggera che comprende aminoacidi da 21 a 239 di SEQ ID N.:5. In un altro caso, gli anticorpi umanizzati anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ per l'uso nella formulazione comprendono una regione variabile della catena pesante che comprende aminoacidi da 20 a 470 di SEQ ID N.:2, e una regione variabile della catena leggera che comprende aminoacidi da 20 a 238 della SEQ ID N.:4. La figura 4 mostra un
20 allineamento che confronta le catene leggere generiche degli anticorpi umani con gli anticorpi murini. L'allineamento illustra che la catena leggera umanizzata del vedolizumab (ad es., Chemical Abstract Service (CAS, American Chemical Society) numero registro 943609-66-3), con due residui cambiati per residui umani è più umano della catena leggera LDP-02 (Figura 3). Inoltre, LDP-02 ha un sito idrofobico, alanina flessibile, 114 e idrofilo (Aspartato 115) che è
25 sostituito con vedolizumab con treonina leggermente idrofila 114 e idrofobica, potenzialmente in

dentro verso la valina 115.

Ulteriori sostituzioni alla sequenza dell'antibiotico possono essere, ad esempio, mutazioni alle regioni della catena leggera e pesante quali la mutazione dell'isoleucina a valina al residuo 2 of SEQ ID N.:14: una mutazione del metionine a valina sul residuo 4 del SEQ ID N.:14; una mutazione di alanina a glicina al residuo 24 di SEQ ID N.:15; una mutazione di arginina a lisina al residuo 38 di SEQ ID N.:15; una mutazione di alanina a arginina al residuo 40 di SEQ ID N.:15: una mutazione del metionine a isoleucina sul residuo 48 del SEQ ID N.:15; una mutazione di isoleucina a leucina sul residuo 69 della SEQ NO 15: una mutazione di arginina a valina al residuo 71 di SEQ ID N. 15, una mutazione di treonina a isoleucina al residuo 73 di SEQ ID N. 15 o qualsiasi combinazione e sostituzione della catena pesante CDR con CDR (DR1, SEQ ID N.:8, CDR2, SEQ ID N.:9 e CDR3, SEQ ID N.:10) del topo dell'anticorpo Act-1; e una sostituzione della catena leggera CDR con la catena leggera CRD (CDR1, SEQ ID N.:11, CDR2, SEQ ID N.:12 e CDR3, SEQ ID N.:13) dell'anticorpo del topo Act-1.

In alcune realizzazioni, gli anticorpi umanizzati anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ per l'uso nella formulazione comprendono una regione variabile della catena pesante 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% che comprende aminoacidi da 20 a 140 di SEQ ID N.:2, e una regione variabile della catena leggera 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% che comprende aminoacidi da 20 a 131 della SEQ ID N.:4 o aminoacidi 21 a 132 di SEQ ID N.:5. L'identità della sequenza aminoacidica può essere determinata usando un algoritmo di allineamento della sequenza adatta quale il sistema Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), usando i parametri predefiniti. In una realizzazione, l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ per l'uso nella formulazione è (CAS, American Chemical Society, Numero di registro 943609-66-3).

Altri anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ possono essere usati nelle formulazioni e regimi posologici descritti nel documento. Ad esempio, gli anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ descritti in US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), sono adatti per l'uso nelle formulazioni e per le formulazioni per l'uso nei metodi

di trattare la malattia infiammatoria intestinale in un individuo.

L'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può essere prodotto tramite espressione delle sequenze di acido nucleico che codifica ogni catena nelle cellule viventi, ad es nella cultura di cellule. Molti sistemi di vettori di espressione ospite possono essere utilizzati per esprimere le molecole di anticorpo
5 dell'invenzione. Tali sistemi di espressione ospite rappresentano i veicoli con i quali le sequenze di codifica di interesse possono essere prodotti e sequenzialmente purificati ma rappresentano cellule che possono esprimere un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in situ quando trasformate con le sequenze di nucleotide. Questi includono ma non si limitano a microorganismi come i batteri (ad es., *E. coli*, *B. subtilis*) trasformati con il DNA batteriografo ricombinante, DNA plasmide o vettori di
10 espressione DNA cosmide a base di sequenze di codifica dell'anticorpo; (ad es., *Saccharomyces*, *Pichia*) trasformato con vettori di espressione ricombinante a base di sequenze di anticorpi; sistemi cellulari di insetti infetti di vettori di espressione virus ricombinanti (ad es., baculovirus) sequenze di codifica anticorpo (ad es., virus mosaico cavolfiore; virus mosaico tabacco, TMV) o trasformato con vettori di espressioni plasmide ricombinante (ad es., plasmie Ti) a base di
15 sequenze di anticorpi (ad es., COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) espressione ricombinante derivati dal genoma delle cellule mammifere (ad es., promotore della metallotioneina) o da virus mammiferi (ad es., il promotore dell'anedovirus; il virus vaccinia 7,5K). Ad esempio le cellule mammifere quale le cellule ovariche di criceto cinese (CHO) insieme a un vettore quale l'elemento promotore del gene primitivo da citomegalovirus umano rappresentano un sistema di
20 espressione efficace per anticorpi (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

Nei sistemi batterici, una quantità di vettori di espressione può essere selezionata con vantaggio secondo l'uso inteso per la molecola antibiotica espressa. AD esempio, quando deve essere prodotta una grande quantità di tale proteina, per la generazione delle composizioni
25 farmaceutiche di una molecola antibiotico, i vettori che dirigono l'espressione di livelli elevati di

prodotti proteici di fusione che vengono purificati prontamente possono essere auspicabili. Tali vettori includono ma non si limitano al vettore di espressione del vettore pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), in cui la sequenza dell'anticorpo può essere legata individualmente nel vettore con la regione di codifica Z in modo che venga prodotta la proteina di fusione (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); e simile, i vettori pGEX possono essere usati per esprimere i polipeptidi estranei come proteine di fusione con glutanione S transferrasi (GST). In generale, tali proteine di funzione sono solubili e possono essere purificati facilmente da cellule lisate tramite assorbimento e legando alla matrice di glutanione-agarose seguita dall'eluzione in presenza del glutanione libero. I vettori pGEX sono ideati per includere trombina o fattore Xa nei siti di clivaggio in modo che il prodotto del gene bersaglio possa essere rilasciato da GST.

In un sistema di insetti, il virus di poliedrosi nucleare *Autographa californica* (AcNPV) viene utilizzato come vettore per esprimere geni estranei. Il virus cresce nelle cellule di *Spodoptera frugiperda*. La sequenza di codifica dell'anticorpo può essere clonata singolarmente in regioni non essenziali (ad esempio il gene della poliedrina) del virus e posta sotto controllo di un promotore AcNPV (ad esempio il promotore di poliedrina).

Nelle cellule ospiti di mammiferi possono essere utilizzati diversi sistemi di espressione a base virale. Nei casi in cui un adenovirus viene utilizzato come vettore di espressione, la sequenza codificante dell'anticorpo di interesse può essere legata ad un complesso di controllo della trascrizione / traduzione adenovirus, ad esempio il promotore tardivo e la sequenza di leader tripartita. Questo gene chimerico può quindi essere inserito nel genoma dell'adenovirus mediante ricombinazione in vitro o in vivo. L'inserimento in una regione non essenziale del genoma virale (ad es. Regione E1 o E3) comporterà un virus ricombinante che sia vitale e capace di esprimere la molecola di anticorpi negli host infetti (ad esempio, vedere Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). Possono anche essere necessari segnali di inizio specifici per una

traduzione efficace delle sequenze di codifica degli anticorpi inseriti. Questi segnali includono il codone di inizio ATG e sequenze adiacenti. Inoltre, il codone di inizio deve essere in fase con il frame di lettura della sequenza di codifica desiderata per assicurare la traduzione dell'intero inserto. Questi segnali di controllo traslazionale esogeni e codoni di iniziazione possono essere di
5 varie origini, sia naturali che sintetiche. L'efficacia dell'espressione può essere migliorata mediante l'inclusione di appropriati elementi di miglioramento della trascrizione, terminatori di trascrizione, ecc. (Vedi Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Inoltre, può essere scelto un ceppo di cellule host che modula l'espressione delle sequenze inserite o modifica ed elabora il prodotto genico nel modo specifico desiderato. Tali modifiche
10 (ad es., Glicosilazione) e l'elaborazione (ad esempio, scissione) di prodotti proteici, possono essere importanti per la funzione della proteina. Diverse cellule ospitanti hanno meccanismi caratteristici e specifici per l'elaborazione post-traslazionale e la modifica delle proteine e dei prodotti genetici. Possono essere scelte linee cellulari o sistemi adatti per assicurare la corretta
15 modifica e lavorazione della proteina esterna espressa. A tal fine possono essere impiegate le cellule ossee eucariotiche che possiedono la macchina cellulare per una corretta elaborazione della trascrizione primaria, la glicosilazione e la fosforilazione del prodotto genico. Queste cellule ospiti di mammiferi comprendono, ma non sono limitate alla linea cellulare ovarica di criceto cinese (CHO), NS0, HeLa, VERY, cellule renali del criceto (BHK), tessuti di rene di scimmia (COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, cellule umane di carcinoma epatocellulare (es. Hep G2), linee
20 cellulari del cancro al seno come ad esempio BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, e linee normali di cellule ghiandolari mammarie come ad esempio CRL7030 e Hs578Bst.

La glicosilazione di diversi tipi di cellule può produrre anticorpi con diversa composizione di glicosilazione rispetto a un altro tipo di cellule, oppure nessuna glicosilazione, come con le cellule batteriche. In un aspetto, i tipi di cellule per la produzione dell'anticorpo anti-
25 $\alpha\beta 7$ sono cellule di mammiferi, come le cellule NS0 o CHO. In un aspetto, le cellule di

mammiferi possono comprendere la delezione di un enzima coinvolto nel metabolismo cellulare e il gene esogeno di interesse può essere operativamente legato a un enzima sostitutivo, ad esempio in un costrutto o un vettore per l'introduzione nelle cellule, per esempio mediante trasformazione o la transfezione. Il costrutto o il vettore con il gene esogeno conferiscono alle

5 cellule che ospitano il costrutto o un vettore un vantaggio di selezione per favorire la produzione del polipeptide codificato dal gene esogeno. In una forma di attuazione, le cellule CHO sono cellule DG44 (Chasin and Urlaub (1980) PNAS USA 77:4216), comprendenti la delezione o l'inattivazione del gene della diidrofollato reduttasi. In un'altra forma di attuazione, le cellule CHO sono cellule CHO K1 che comprendono la delezione o l'inattivazione del gene della glutammina

10 sintetica (vedere, ad esempio, brevetti Brevetto americano n. 5.122.464 o 5.827.739).

Formulazioni solide

Le formulazioni solide (non facenti parte dell'invenzione) vengono generalmente preparate essiccando una formulazione liquida. Può essere utilizzato qualsiasi metodo di essiccazione idoneo, come la liofilizzazione o l'essiccazione a spruzzo. In un aspetto, un

15 lioprotettivo viene aggiunto alla formulazione prima della liofilizzazione. La liofilizzazione comporta il congelamento di una formulazione liquida, di solito nel contenitore che verrà utilizzato per conservare, spedire e distribuire la formulazione (ad esempio, una fiala, una siringa (ad es. una siringa singola o a doppia camera) o una cartuccia (ad es. - a cartuccia o a doppia camera) (vedere, ad esempio, Gatlin and Nail in Protein Purification Process Engineering, ed.

20 Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994).) Una volta che la formulazione è congelata, la pressione atmosferica viene ridotta e la temperatura viene regolata per consentire la rimozione del solvente congelato, per esempio attraverso la sublimazione. Questo step di liofilizzazione talvolta viene definito come essiccazione primaria. Se lo si desidera, è possibile aumentare la temperatura così da rimuovere qualsiasi solvente ancora legato alla formulazione

25 secca tramite l'evaporazione. Questo step di liofilizzazione talvolta viene definito essiccazione

secondaria. Quando la formulazione ha raggiunto il grado di secchezza desiderato, il processo di essiccazione viene concluso e i contenitori sono sigillati. La formulazione solida finale può essere definita "formulazione liofilizzata" o "cake". Il processo di liofilizzazione può essere eseguito usando qualsiasi attrezzatura idonea. Apparecchi di liofilizzazione adatti sono facilmente
5 reperibili presso numerose sedi commerciali (per esempio, SP Scientific, Stone Ridge, NY).

Per asciugare le formulazioni liquide al fine di produrre una formulazione solida (ad esempio, liofilizzata) possono essere utilizzati apparecchiature differenti. Generalmente, preparazioni liofilizzate vengono preparate da esperti del settore mediante una camera sigillata a base di scaffali su cui vengono posizionati i flaconi della formulazione liquida da essiccare. La
10 temperatura degli scaffali, la temperatura di raffreddamento e di riscaldamento, possono essere controllate, così come la pressione all'interno della camera. Si noti bene che i diversi parametri di processo qui discussi fanno riferimento a processi eseguiti utilizzando questo tipo di apparecchiatura. Le persone con esperienza media potranno facilmente adattare i parametri qui descritti ad altri tipi di apparecchiature per l'essiccazione, se lo si desidera.

15 Le temperature adeguate e la quantità di trattamento sottovuoto necessari per l'essiccazione primaria e secondaria, possono essere facilmente determinate da una persona di esperienza media. In generale, la formulazione viene congelata ad una temperatura di circa -30 °C o inferiore, come -40 °C o -50 °C. Il tasso di raffreddamento può influenzare la quantità e la dimensione dei cristalli di ghiaccio nella matrice. L'essiccazione primaria viene generalmente
20 effettuata ad una temperatura che è di circa 10 °C, circa 20 °C, circa 30 °C, circa 40 °C o circa 50 °C più calda rispetto alla temperatura di congelamento. In un aspetto, le condizioni di essiccazione primaria possono essere impostate per mantenere l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ sotto la temperatura di transizione vetrosa o la temperatura di collasso della formulazione. Sopra la temperatura di collasso, la matrice congelata amorfa può fluire (collasso), con il risultato che le molecole
25 proteiche non possono essere circondate da una rigida e solida matrice e le molecole proteiche

potrebbero non essere stabili nella matrice collassata. Inoltre, la formulazione può essere difficile da essiccare completamente se si verifica un collasso. Le risultanti maggiori quantità di umidità nella formulazione possono portare a tassi di degrado della proteina più elevati e a una diminuzione della quantità di tempo in cui il prodotto liofilizzato può essere conservato prima che
5 la sua qualità diminuisca sino a livelli inaccettabili. In un aspetto, la temperatura dello scaffale e la pressione della camera sono selezionate per mantenere la temperatura del prodotto al di sotto della temperatura di collasso durante l'essiccazione primaria. La temperatura di transizione vetrosa di una formulazione congelata può essere misurata attraverso i metodi noti, per esempio con calorimetria di scansione differenziale (DSC). La temperatura di collasso può essere misurata
10 attraverso metodi noti, ad es. microscopia, tomografia ottica a coerenza di fase. La fase di essiccazione può rimuovere almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70% o più del solvente. In un aspetto, la fase di essiccazione primaria rimuove più dell'80% del solvente dalla formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

La dimensione delle fiale potrà essere selezionata sulla base della superficie che sarà
15 esposta sullo scaffale e al sottovuoto durante la liofilizzazione. Il tempo di essiccazione è direttamente proporzionale all'altezza del cake, perciò la dimensione del flacone può essere scelta in base a ciò che viene determinato come un'altezza ragionevole della torta. Una fiala con un grande diametro rispetto al volume può fornire un'ampia percentuale di contatto con lo scaffale per un efficiente trasferimento di calore durante il ciclo di liofilizzazione. Una soluzione
20 anticorpale diluita in un elevato volume di liquido richiederà più tempo per l'essiccazione. Si deve trovare un equilibrio nella dimensione del flaconcino in proporzione al volume di formulazione poiché le fiale più grandi possono essere più costose da conservare e spedire, e potrebbe anche avere un rapporto di volume maggiore rispetto al rapporto di formulazione ed esporre un'elevata percentuale della formulazione agli effetti degradanti dell'umidità nei periodi di stoccaggio più
25 lunghi. Per una dose da 165 mg, la dimensione del flaconcino della formulazione anticorpale anti-

$\alpha 4\beta 7$ può essere di 3 mL, 5 mL o 10 mL. In un aspetto, la dimensione della fiala è di 5 ml per una soluzione da 160 mg / ml.

I principi per la scelta di una cartuccia o di una siringa per la liofilizzazione sono simili a quelli della scelta della fiala. La profondità dell'altezza del cake farà aumentare anche il tempo di essiccazione nel momento in cui l'altezza aumenta. I diametro e la dimensione della siringa o della cartuccia devono essere bilanciati con il volume di formulazione finale. I diametri più grandi possono aumentare il tasso di assorbimento dell'umidità nel cake liofilizzato, aumentando così gli effetti degradanti dell'umidità durante lo stoccaggio. Per una dose di 165 mg, il volume di formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può essere di 1 ml o 2 ml. In un aspetto, la dimensione della siringa o della cartuccia è maggiore di 1 mL per una soluzione da 160 mg / mL.

Dopo la liofilizzazione, la fiala, la siringa o la cartuccia possono essere sigillati, ad esempio, chiusi ermeticamente, sotto vuoto. In alternativa, un gas, ad esempio aria secca o azoto, può essere rilasciato nel contenitore prima della sigillatura. Se c'è pericolo di ossidazione, il gas inserito nella camera di liofilizzazione potrà essere un gas che rallenta o impedisce l'ossidazione del prodotto liofilizzato. In un aspetto, i gas sono gas non ossigenati, ad esempio azoto, o un gas inerte come elio, neon, argon, cripto o xeno. In un altro aspetto, il gas è azoto o argon.

La formulazione dell'anticorpo per l'uso in un trattamento

In un aspetto, l'invenzione fornisce una formulazione per l'uso in un metodo per trattare una malattia o un disturbo in un soggetto che prevede la somministrazione a un soggetto della formulazione di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ qui descritta in una quantità efficace per trattare la malattia o il disturbo, ad esempio negli esseri umani. Il soggetto umano può essere un adulto (18 anni o più), un adolescente o un bambino. Il soggetto umano può essere una persona di 65 anni o più. Contrariamente ai regimi di dosaggio terapeutici alternativi, un soggetto umano di 65 anni o più non richiede alcuna modifica del regime di dosaggio qui descritto e potrà ricevere la formulazione convenzionale anti- $\alpha 4\beta 7$ anticorpale qui descritta.

Il soggetto può avere avuto una mancanza di risposta adeguata, perdita di risposta o intolleranza al trattamento con un immunomodulatore, un antagonista TNF- α o loro combinazioni. Il paziente può anche essere stato precedentemente sottoposto a trattamento con almeno un corticosteroide (ad es. Prednisone) per la sindrome del colon irritabile. Si intende
5 risposta inadeguata ai corticosteroidi in presenza di segni e sintomi di malattia attiva in modo persistente nonostante una storia di almeno 4 settimane di regime caratterizzato da una dose equivalente di prednisone 30 mg assunta oralmente ogni giorno per 2 settimane o per via endovenosa per 1 settimana. Si intende perdita di risposta ai corticosteroidi in presenza di almeno
10 due tentativi falliti di ridurre gradualmente i corticosteroidi per raggiungere l'equivalente di prednisone 10 mg assunta oralmente tutti i giorni. L'intolleranza dei corticosteroidi comprende un'anamnesi di sindrome di Cushing, osteopenia / osteoporosi, iperglicemia, insonnia e / o infezione.

Un immunomodulatore può essere, ad esempio, azatioprina per via orale, 6-mercaptipurina o metotrexato. Con risposta inadeguata ad un immunomodulatore si fa
15 riferimento a segni e sintomi di malattia persistente attiva nonostante una storia di almeno 8 settimane di regime o azatioprina in via orale ($\geq 1,5$ mg / kg), 6-mercaptipurina ($\geq 0,75$ mg / kg) o metotrexato ($\geq 12,5$ mg / settimana). L'intolleranza di un immunomodulatore comprende, ma non si limita a nausea / vomito, dolore addominale, pancreatite, anomalie dei parametri di funzionalità epatica (LFT), linfopenia, mutazione genetica TPMT e / o infezione.

Un antagonista TNF- α è ad esempio un agente che inibisce l'attività biologica di TNF- α ,
20 e preferibilmente lega TNF- α , tipo un anticorpo monoclonale ad es., REMICADE (infliximab), HUMIRA (adalimumab), CIMZIA (certolizumab pegol), SIMPONI (golimumab) o una proteina di fusione del recettore circolatorio quale ENBREL (etanercept). Una risposta inadeguata all'antagonista TNF- α si riferisce ai segni e sintomi di una malattia attiva nonostante un'anamnesi
25 di almeno 4 settimane di regime di induzione di infliximab 5 mg/kg IV, 2 dosi ad almeno 2

settimane; 80 mg di adalimumab seguito da 40 mg per almeno due settimane o 400 mg di certolizumab pegol, 2 dosi a 2 settimane. Una perdita di risposta da un antagonista TNF si riferisce all'occorrenza dei sintomi durante il dosaggio di mantenimento dopo il beneficio clinico precedente. L'intolleranza a un antagonista TNF include ma non si limita alla reazione
5 dell'infusione, demielinazione, cedimento congestizio e/o infezione.

Una perdita di mantenimento della remissione, come utilizzata qui nei soggetti affetti da colite ulcerosa, si riferisce ad un aumento dello score di Mayo di almeno 3 punti e un Score Endoscopico di Baron modificato di almeno 2.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$
10 come definito nelle rivendicazioni che (1) possono legare l'integrina $\alpha 4\beta 7$ in vitro e / o in vivo; e (2) possono modulare un'attività o una funzione di un integrina $\alpha 4\beta 7$, come ad esempio: (a) funzione di binding o legame (ad esempio, la capacità dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ di legarsi a MAdCAM (es. MAdCAM-1), fibronetina e / o VCAM-1) e / o (b) funzione di infiltrazione leucocitaria, compresa l'assunzione e / o l'accumulazione di leucociti nei tessuti (ad esempio, la capacità di
15 inibire la migrazione dei linfociti al tessuto mucoso intestinale). In una forma di attuazione, un anticorpo nella formulazione come definito nelle rivendicazioni può legare un'integrina $\alpha 4\beta 7$ e può inibire il legame dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ ad uno o più dei suoi ligandi (ad es. MAdCAM (ad es. MAdCAM-1), VCAM-1, fibronectina) inibendo pertanto l'infiltrazione dei tessuti di leucociti (compresa l'assunzione e / o l'accumulo di leucociti nei tessuti). In un'altra forma di realizzazione,
20 un anticorpo nella formulazione può legare un'integrina $\alpha 4\beta 7$ e può inibire selettivamente il legame dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ ad uno o più dei suoi ligandi (ad es., MAdCAM (ad es., MAdCAM-1), VCAM-1, fibronetina) inibendo così l'infiltrazione dei tessuti di leucociti (compresa l'assunzione e / o l'accumulo di leucociti nei tessuti). Queste formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ come definito nelle rivendicazioni possono inibire l'adesione cellulare delle cellule a base di
25 l'integrina $\alpha 4\beta 7$ alle cellule endoteliali vascolari nei tessuti della mucosa, compresi i tessuti

associati all'intestino, gli organi linfoidei o leucociti (in particolare i linfociti come le cellule T o B) in vitro e / o in vivo. In un'altra forma di attuazione, la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ della presente invenzione come definito nelle rivendicazioni può inibire l'interazione di $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM (ad es. MAdCAM-1) e / o fibronectina. In ancora un'altra forma di realizzazione, la
5 formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ della presente invenzione come definito nelle rivendicazioni può inibire l'interazione di $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) e / o fibronectina in modo selettivo, ad esempio senza inibire l'interazione di $\alpha 4\beta 7$ con VCAM.

Le formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ della presente invenzione come definito nelle rivendicazioni possono essere impiegate per modulare (ad esempio, inibire (ridurre o prevenire)
10 la funzione di binding e / o la funzione di infiltrazione leucocitaria (ad esempio, linfociti, monociti) dell'integrina $\alpha 4\beta 7$. Ad esempio, le immunoglobuline umanizzate che inibiscono il legame dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando (cioè, uno o più ligandi) possono essere somministrate secondo il metodo nel trattamento delle patologie associate all'infiltrazione di leucociti (ad esempio, linfociti, monociti) dei tessuti (inclusi reclutamento e / o accumulazione di leucociti nei
15 tessuti), in particolare dei tessuti che esprimono la molecola MAdCAM (es. MAdCAM-1).

Una quantità efficace di una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ della presente invenzione come definito nelle rivendicazioni (cioè uno o più) viene somministrata ad un individuo (ad esempio un mammifero, come un essere umano o altro primate) con lo scopo di trattare una determinata malattia. Ad esempio, i disturbi infiammatori, comprese le malattie
20 associate all'infiltrazione leucocitaria del tratto gastrointestinale (compreso l'endotelio associato all'intestino), altri tessuti della mucosa o i tessuti che esprimono la molecola MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) (ad es. tessuti associati all'intestino, come le venule della lamina propria dell'intestino tenue e crasso, e la ghiandola mammaria (ad esempio la ghiandola mammaria)), può essere trattata secondo il metodo qui presentato. Analogamente, un individuo affetto da una
25 malattia associata all'infiltrazione leucocitaria dei tessuti causata dal legame di leucociti a cellule

(ad es. Cellule endoteliali) che esprimono MAdCAM (ad es. MAdCAM-1) può essere trattata con la formulazione della presente invenzione.

In una forma di realizzazione, le patologie che possono essere trattate come qui descritto, includono infiammazione cronica dell'intestino (IBD), ad esempio colite ulcerosa, morbo di Crohn, ileite, celiachia, Sprue non tropicale, enteropatia associata ad artropatie sieronegative, colite microscopica o collagenosa, gastroenterite eosinofila, o pouchite provocata da proctocolectomia e anastomosi ileo-anale. In alcune forme di realizzazione, l'infiammazione cronica dell'intestino coincide con il morbo di Crohn o la colite ulcerosa. La gravità della colite ulcerosa può essere da moderata a fortemente attiva. La gravità della colite ulcerosa può essere da moderata a fortemente attiva. Il trattamento può portare alla guarigione della mucosa nei pazienti affetti da colite ulcerosa sia in forma moderata sia grave. Il trattamento può anche portare a una riduzione, all'eliminazione o alla riduzione con successiva eliminazione della somministrazione del corticosteroide al paziente.

La pancreatite e il diabete mellito insulino-dipendente sono altre patologie che possono essere trattate mediante le formulazioni di questa invenzione. È stato descritto che MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) viene espresso da alcuni vasi nel pancreas esocrino in topi NOD (diabetici non obesi), nonché nei topi BALB/c e SJL. L'espressione di MAdCAM (ad esempio, MAdCAM-1) è stata indotta sull'endotelio in isole infiammate del pancreas nel topo NOD, in cui MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) era l'addressina dominante espressa da isole di cellule endoteliali in topi NOD nelle fasi iniziali dell'insulite (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)). Il trattamento di topi NOD con anticorpi anti-MAdCAM o anti- β 7 ha impedito lo sviluppo del diabete (Yang et al., Diabetes, 46: 1542-1547 (1997)). Inoltre, è stato osservato un accumulo di linfociti che esprimono α 4 β 7 all'interno delle isole, inoltre MAdCAM-1 è stato coinvolto nel legame delle cellule del linfoma attraverso α 4 β 7 con i vasi delle isole infiammate (Hanninen, A., et al., J. Clin. Invest., 92: 2509-2515 (1993)) o con il tratto gastrointestinale nel linfoma a cellule

mantellari (Geissmann et al., Am. J. Pathol., 153:1701-1705 (1998)).

Fra le patologie infiammatorie associate a tessuti mucosi che possono essere trattate usando una formulazione dell'invenzione troviamo colecistite, colangite (Adams e Eksteen Nature Reviews 6: 244-251 (2006) Grant et al., Hepatology 33: 1065-1072 (2001)), ad esempio, colangite
5 sclerosante primaria, malattia di Behcet, ad es. dell'intestino o pericolangite (canale biliare e tessuto circostante del fegato) e GvHD (graft versus host disease) (ad es. nel tratto gastrointestinale (ad es. dopo un trapianto di midollo osseo) (Petrovic et al. Blood 103:1542-1547 (2004)). Come nel caso del morbo di Crohn, l'infiammazione spesso si estende oltre la superficie della mucosa e, di conseguenza, malattie infiammatorie croniche come sarcoidosi, gastrite
10 cronica, ad es. gastrite autoimmune (Katakai et al. Int. Immunol., 14: 167-175 (2002)) e altre condizioni idiopatiche possono essere trattabili.

L'invenzione è utile anche come metodo per inibire l'infiltrazione leucocitaria del tessuto mucoso. La descrizione particolareggiata riguarda anche un metodo per il trattamento del cancro (ad esempio un tumore $\alpha4\beta7$ positivo, come un linfoma). Altri esempi di malattie infiammatorie
15 associate a tessuti mucosi che possono essere trattati utilizzando una formulazione dell'invenzione sono la mastite (ghiandola mammaria) e la sindrome dell'intestino irritabile.

Le malattie o i patogeni le cui eziologie sfruttano l'interazione di MAdCAM (ad es., MAdCAM-1) con $\alpha4\beta7$ possono essere trattate con un anticorpo anti- $\alpha4\beta7$ in una delle formulazioni qui descritte. Fra queste malattie troviamo disturbi dell'immunodeficienza come
20 quelli provocati dal virus dell'immunodeficienza umana (vedi, ad esempio, WO2008140602).

Una certa formulazione dell'invenzione viene somministrata in una quantità sufficiente ad inibire il legame dell'integrina $\alpha4\beta7$ al suo ligando. Per la terapia, una quantità efficace basterà per ottenere l'effetto terapeutico desiderato (anche profilattico) (ad esempio, una quantità sufficiente a ridurre o prevenire l'associazione e/o la segnalazione mediata dall'integrina $\alpha4\beta7$,
25 inibendo in tal modo l'adesione e l'infiltrazione dei leucociti e/o le risposte cellulari associate).

Una quantità efficace di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, ad esempio un titolo sufficiente a mantenere la saturazione o, ad esempio, la neutralizzazione, dell'integrina $\alpha 4\beta 7$, può indurre una risposta clinica o una remissione nella sindrome dell'intestino irritabile. Una quantità sufficiente dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ può produrre la guarigione della mucosa nella colite ulcerosa o nel morbo di Crohn. La formulazione dell'invenzione può essere somministrata in un'unica dose o in più dosi. Il dosaggio può essere determinato attraverso le metodologie note e potrà variare, ad esempio, in base all'età dell'individuo, alla sensibilità, alla tolleranza e allo stato di salute generale. Fra le modalità di somministrazione possiamo trovare quelle topiche, come somministrazione nasale o inalatoria o transdermica; enterale, ad esempio mediante cannula di alimentazione o supposta; parenterale, come per via endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, intra-arteriale, intraperitoneale o intravitale. I dosaggi corretti degli anticorpi possono essere da circa 0,1 mg / kg di peso corporeo a circa 10,0 mg / kg di peso corporeo per trattamento, ad esempio da circa 2 mg / kg a circa 7 mg / kg, da circa 3 mg / kg a circa 6 mg / kg, o circa da 3,5 a circa 5 mg / kg. In forme di realizzazione particolari, la somministrazione sarà di circa 0,3 mg / kg, circa 0,5 mg / kg, circa 1 mg / kg, circa 2 mg / kg, circa 3 mg / kg, circa 4 mg / kg, circa 5 mg / kg, circa 6 mg / kg, circa 7 mg / kg, circa 8 mg / kg, circa 9 mg / kg, o circa 10 mg / kg. La dose totale potrà essere di circa 22 mg, circa 50 mg, circa 72 mg, circa 125 mg, circa 165 mg, o circa 432 mg. La dose totale potrà essere di almeno 77 mg, almeno 125 mg o almeno 356 mg. In una forma di realizzazione, la dose totale è di 165 mg. In un'altra forma di realizzazione, la dose totale è di 108 mg. In un'altra forma di realizzazione, la dose totale è di 216 mg.

Modellazione e simulazioni (software BERKELEY MADONNA™, Università della California) utilizzando dati farmacocinetici (PK) in alcuni studi condotti sulla disponibilità degli anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$ nel corso tempo dopo la somministrazione, possono determinare i potenziali dosaggi per la somministrazione sottocutanea o intramuscolare. I dati PK possono essere utili per l'induzione e per i regimi di mantenimento. Un altro approccio di modellazione è l'analisi

farmacocinetica / farmacodinamica della popolazione (NONMEM[®] nonlinear mixed effects modeling tool, ICON plc, Dublino, Irlanda). Possono essere analizzati sia livelli di esposizione che livelli di valle.

In genere, dopo aver raggiunto l'obiettivo di saturazione, ad esempio l'integrina $\alpha 4\beta 7$, la
5 concentrazione degli anticorpi nel sangue si dimostra in linea con la dose somministrata. Un
anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ somministrato per via sottocutanea o intramuscolare ha circa dal 60% a circa
il 90% della biodisponibilità di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ somministrato per via endovenosa. Per
fare un esempio di questa relazione, presumendo che una dose IV sia biodisponibile al 100% e
che una dose di sottocutanea abbia una biodisponibilità del 69,5%, allora una dose endovenosa di
10 300 mg può essere abbinata a una dose di 432 mg per la somministrazione sottocutanea. Di
conseguenza, una dose endovenosa di 150 mg può essere abbinata da una dose sottocutanea di
216 mg a una biodisponibilità relativa del 69,5%. Allo stesso modo, se si ha una dose sottocutanea
con una disponibilità di 75% e si ha una dose con biodisponibilità di 80%, per raggiungere una
dose endovenosa di 300 mg, la dose sottocutanea potrà essere di 400 mg mentre la dose
15 intramuscolare di 375 mg. Le tabelle 40-43 negli esempi illustrano queste relazioni e forniscono
le dosi utili nonché i regimi di dosaggio di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

In alcuni aspetti, il regime di dosaggio ha due fasi, una fase di induzione e una fase di
mantenimento. Nella fase di induzione, l'anticorpo o il suo frammento di legame antigene viene
sommministrato in modo da fornire rapidamente una quantità efficace dell'anticorpo o del suo
20 frammento di legame antigene adatto a determinati scopi, come ad esempio indurre una tolleranza
immunitaria all'anticorpo o al frammento legante dell'antigene o per indurre una risposta clinica
e migliorare i sintomi della malattia infiammatoria intestinale. A un paziente può essere
sommministrato un trattamento di fase di induzione solamente quando ha precedentemente
effettuato un trattamento con un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, se trattato dopo una lunga interruzione della
25 terapia, ad esempio, per più di tre mesi, più di quattro mesi, più di sei mesi, più di nove mesi, più

di un anno, più di diciotto mesi o più di due anni dalla terapia anticorpale anti- $\alpha 4\beta 7$; oppure durante la fase di mantenimento della terapia anticorpale anti- $\alpha 4\beta 7$ se si fossero nuovamente manifestati sintomi della sindrome dell'intestino irritabile, ad es. una recidiva da remissione della malattia. In alcune forme di realizzazione, il regime dell'induzione avrà una concentrazione più
5 alta del siero medio, ad esempio la concentrazione precedente alla dose successiva, rispetto alla concentrazione media del siero che si era portata avanti durante il regime di mantenimento.

Nella fase di mantenimento, l'anticorpo o il suo frammento con sito di legame per l'antigene viene somministrato in modo tale da prolungare la risposta ottenuta attraverso la terapia di induzione con un livello stabile di anticorpi o di frammento con sito di legame per l'antigene.
10 Un regime di mantenimento può impedire il ritorno dei sintomi o la ricomparsa della sindrome dell'intestino irritabile. Un regime di mantenimento potrà essere funzionale per il paziente, ad esempio, un regime di dosaggio semplice o che non richieda frequenti spostamenti per la somministrazione della terapia. In alcune forme di realizzazione, il regime di mantenimento può includere la somministrazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o del suo frammento con sito di legame
15 per l'antigene, ad esempio, in una formulazione descritta all'interno di questo documento, tramite una strategia selezionata dal gruppo, caratterizzata da dosaggi bassi, somministrazione saltuaria, auto-somministrazione e una combinazione di qualunque delle precedenti.

In una forma di realizzazione, ad esempio, durante la fase di induzione della terapia, il regime di dosaggio fornisce una quantità sufficiente di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o del frammento
20 con sito di legame per l'antigene in una formulazione qui descritta per indurre la remissione della sindrome dell'intestino irritabile in un paziente umano. In alcune forme di realizzazione, la quantità efficace dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è sufficiente a raggiungere circa 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ fino a circa 60 $\mu\text{g} / \text{ml}$, circa 15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ fino a circa 45 $\mu\text{g} / \text{ml}$, circa 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ fino a circa 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$, o circa 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ fino a circa 35 $\mu\text{g} / \text{ml}$ di concentrazione media di siero dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ entro
25 la fine della fase di induzione. La durata della fase di induzione può essere di circa quattro

settimane, circa cinque settimane, circa sei settimane, circa sette settimane, o circa otto settimane di trattamento. In alcune forme di realizzazione, il regime di induzione può utilizzare una strategia scelta dal gruppo caratterizzata da dosaggi elevati, somministrazioni frequenti e la combinazione di dosaggi elevati e somministrazioni frequenti dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o del frammento legante dell'antigene, ad esempio in una delle formulazioni qui descritte. Il dosaggio di induzione potrà essere in un'unica dose o in più dosi, ad esempio almeno due dosi. Durante la fase di induzione, una dose può essere somministrata una volta al giorno, a giorni alterni, due volte alla settimana, una volta alla settimana, una volta ogni dieci giorni, una volta ogni due settimane o una volta ogni tre settimane. In alcune forme di realizzazione, le dosi di induzione vengono somministrate entro le prime due settimane di terapia con l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In una forma di realizzazione, il dosaggio di induzione può avvenire una prima volta all'inizio del trattamento (giorno 0) e una seconda volta dopo circa due settimane. In un'altra forma di realizzazione, la durata della fase di induzione è di sei settimane. In un'altra forma di realizzazione, la durata della fase di induzione è di sei settimane in cui più dosi di induzione saranno somministrate nel corso delle prime due settimane.

In alcune forme di realizzazione, ad esempio quando si avvia il trattamento di un paziente affetto da una grave forma di sindrome dell'intestino irritabile (come nel caso nei pazienti che hanno fallito la terapia anti-TNF α), la fase di induzione deve avere una durata più lunga rispetto ai pazienti con forma lieve o moderata. In alcune forme di realizzazione, la fase di induzione per un paziente affetto da una patologia in forma grave può avere una durata di almeno 6 settimane, almeno 8 settimane, almeno 10 settimane, almeno 12 settimane o almeno 14 settimane. In una forma di realizzazione, un regime di dosaggio a induzione per un paziente affetto da patologia in forma grave malattia potrà essere caratterizzato da una dose alla settimana 0 (inizio del trattamento), una dose alla settimana 2 e una dose alla settimana 6. In un'altra forma di realizzazione, un regime di dosaggio di induzione per un paziente affetto da patologia in forma

grave potrà essere caratterizzato da una dose alla settimana 0 (inizio del trattamento), una dose alla settimana 2, una dose alla settimana 6 e una dose alla settimana 10.

In una forma di realizzazione, ad esempio durante la fase di mantenimento della terapia, il regime di dosaggio si mantiene ad una concentrazione media stabile del siero, come nella
5 concentrazione di plateau poco prima della dose successiva, da circa 5 a circa 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$, fs circa 7 a circa 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$, fs circa 5 a circa 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, fs circa 10 a circa 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$, fs circa 15 a circa 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o fs circa 9 a circa 13 $\mu\text{g} / \text{mL}$ di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$. In un'altra forma di realizzazione, il regime di dosaggio durante, ad esempio, una fase di mantenimento della terapia, mantiene una concentrazione media stabile tra 20 e 30 mg / mL , da circa 20 a circa 55 $\mu\text{g} / \text{mL}$,
10 da circa 30 a circa 45 $\mu\text{g} / \text{mL}$, da circa 45 a circa 55 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o da circa 35 a circa 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$. In un'altra forma di realizzazione, il regime di dosaggio, ad esempio durante una fase di mantenimento della terapia, conserva una concentrazione sierica media a lungo termine, es. esposizione (ad es., area sotto la curva - concentrazione-tempo) da circa 15 a circa 40
15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ circa, da 10 a circa 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$, da circa 18 a circa 26 $\mu\text{g} / \text{mL}$, o da circa 22 a circa 33 $\mu\text{g} / \text{mL}$ di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$. In un'altra forma di realizzazione, ad esempio durante una terapia di mantenimento, il regime di dosaggio conserva una concentrazione sierica media a lungo termine, ad esempio esposizione (ad esempio, area sotto la curva - tempo di concentrazione) da circa 35 a circa 90 $\mu\text{g} / \text{ml}$, da circa 45 a circa 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$, da circa 52 a circa 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o da circa 50 a circa 65 $\mu\text{g} / \text{mL}$ di anticorpi anti- $\alpha 4\beta 7$.

20 La forma di dosaggio finale può comprendere l'intero dosaggio in circa 0,5 ml, in circa 1 ml, in circa 1,5 ml, in circa 2 ml, in circa 2,5 ml, in circa 3 ml della formulazione anticorpale.

La forma di dosaggio finale per somministrazione endovenosa può essere ad una concentrazione compresa da 1,0 mg/ml a circa 1,4 mg / ml , da circa 1,0 mg/ml a circa 1,3 mg/ml , da circa 1,0 mg/ml a circa 1,2 mg/ml , da circa 1,0 mg/ml a circa 1,1 mg/ml , da circa 1,1 mg/ml a circa 1,4 mg/ml , da circa 1,1 mg/ml a circa 1,3 mg/ml , da circa 1,1 mg / ml a circa 1,2 mg/ml , da
25

circa 1,2 mg/ml a circa 1,4 mg/ml, da circa 1,2 mg/ml a circa 1,3 mg/ml, o da circa 1,3 mg/ml a circa 1,4 mg/ml. La forma di dosaggio finale può essere ad una concentrazione di circa 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, circa 1,2 mg/ml circa 1,3 mg/ml circa 1,4 mg/ml, circa 1,5 mg/ml, circa 1,6 mg/ml, circa 1,8 mg/ml o circa 2,0 mg/ml.

5 La dose può essere somministrata una volta alla settimana, una volta ogni 2 settimane, una volta ogni 3 settimane, una volta ogni 4 settimane, una volta ogni 6 settimane, una volta ogni 8 settimane o una volta ogni 10 settimane. Una dose più elevata o più frequente, ad esempio a giorni alterni, una volta alla settimana, una volta ogni due settimane, una volta ogni 3 settimane o una volta ogni 4 settimane, può essere utile per indurre la remissione delle patologie attive o per
10 trattare un nuovo paziente, ad esempio per indurre la tolleranza all'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Una dose una volta ogni 2 settimane, una volta ogni 3 settimane, una volta ogni 4 settimane, una volta ogni 5 settimane, una volta ogni 6 settimane, una volta ogni 8 settimane o una volta ogni 10 settimane, può essere utile per la terapia preventiva, ad esempio per mantenere la remissione di un paziente con malattia cronica. In un aspetto, il regime di trattamento è il trattamento al giorno 0, circa alla
15 settimana 2, circa alla settimana 6, e ogni 1 o 2 settimane da quel momento in poi. In un altro aspetto, il regime di trattamento di induzione è il trattamento a giorni alterni per un totale di 6 trattamenti.

 Il regime di dosaggio può essere ottimizzato per indurre una risposta clinica e una remissione clinica nella sindrome dell'intestino irritabile del paziente. In alcune forme di
20 realizzazione, il regime di dosaggio non altera il rapporto tra CD4 e CD8 nel liquido cerebrospinale dei pazienti che ricevono il trattamento.

 In alcuni aspetti può essere raggiunta una remissione clinica duratura, ad esempio una remissione clinica comprovata per almeno due, almeno tre, almeno quattro visite presso un medico curante nell'arco dei sei mesi o dell'anno successivi all'inizio del trattamento, mediante un
25 regime di dosaggio ottimizzato.

In alcuni aspetti, una risposta clinica duratura, come ad esempio una risposta clinica comprovata per almeno 6 mesi, almeno 9 mesi, almeno un anno dall'inizio del trattamento, può essere raggiunta mediante un regime di dosaggio ottimizzato.

5 La formulazione può essere somministrata per via sottocutanea tramite iniezioni singole o multiple. Ad esempio, il volume di una singola iniezione può variare da circa 0,5 ml a circa 3 ml. In una forma di realizzazione, il volume di una singola iniezione può essere da circa 0,6 ml a circa 1,1 ml o da circa 1 ml a circa 3 ml. In un aspetto, il volume di una singola iniezione è di circa 1 ml. Il calibro dell'ago usato per somministrare la formulazione per via sottocutanea può essere di circa 25, circa 26, circa 27, circa 28, circa 29 o circa 30G.

10 La formulazione può essere somministrata per via intramuscolare tramite iniezioni singole o multiple. Ad esempio, il volume di una singola iniezione può variare da circa 0,5 ml a circa 5 ml. In una forma di realizzazione, il volume di una singola iniezione può essere da circa 2 ml a circa 5 ml, da circa 0,6 ml a circa 1,1 ml o da circa 1 ml a circa 3 ml. In un aspetto, il volume di una singola iniezione è di circa 1 ml, circa 2 ml, circa 3 ml, circa 4 ml, o circa 5 ml. L'ago usato
15 per somministrare la formulazione intramuscolare può essere di circa 5/8 ", circa 7/8", circa 1", circa 1,25", circa 1,5 ", circa 2" o circa 3". Il calibro dell'ago può essere tra 20-22G per ogni somministrazione intramuscolare.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo per trattare un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale in cui il metodo comprenda
20 una fase di somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene che abbia una specificità di legame dell'integrina umana in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene viene somministrato al paziente secondo il seguente regime posologico: (a) le dosi
25 iniziali, di 165 mg dell'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene con iniezione sottocutanea ogni giorno per sei dosi; (b) seguito da una settimana e successiva dose, ad

es. in un regime di trattamento della fase di mantenimento, di 165 mg di immunoglobulina immunizzata o frammento legante l'antigene tramite iniezione sottocutanea ogni due settimane e ogni quattro settimane come richiesto; in cui il regime posologico induce una reazione chimica e remissione clinica del malattia infiammatoria intestinale del paziente; e ulteriormente in cui

5 l'immunoglobulina o frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$ in cui la regione legante l'antigene comprende tre regioni che determinano complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena leggera e tre regioni che determinano complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione variabile della catena pesante della sequenza di seguito specificata: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2

10 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è ulteriormente definito nelle rivendicazioni.

In un caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un metodo per trattare un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale in cui il metodo comprende una fase di somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale,

15 un'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene che ha una specificità di legame per un integrina umana $\alpha 4\beta 7$ in cui l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene preveda la regione legante l'antigene di origine non umana sia somministrata al paziente secondo il seguente regime posologico: (a) una dose iniziale endovenosa di 300 mg dell'immunoglobulina umanizzata o del suo frammento legante antigene come infusione

20 endovenosa; (b) seguita da una successiva seconda dose endovenosa di 300 mg dell'immunoglobulina umanizzata o del suo frammento legante antigene come infusione endovenosa dopo circa due settimane dalla somministrazione iniziale; (c) seguita, a partire dalla sesta settimana, da una terza e successive dosi da 165 mg dell'immunoglobulina umanizzata o del suo frammento di legame antigene tramite iniezione sottocutanea, una volta alla settimana, ogni

25 due settimane o ogni tre settimane, secondo necessità; in cui il regime di dosaggio induca una

risposta clinica e una remissione clinica nella sindrome dell'intestino irritabile del paziente; e inoltre in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante antigene abbiano specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$, in cui la regione legante l'antigene includa tre regioni che determinano la complementarietà (CDR1, CDR2 e CDR3) di una regione variabile a catena
5 leggera e tre regioni che determinano la complementarietà (CDR1, CDR2 e CDR3) di una regione variabile a catena pesante della sequenza aminoacidica riportata di seguito: catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è ulteriormente definito nelle rivendicazioni.

10 In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un regime posologico per il trattamento terapeutico della malattia infiammatoria intestinale, mentre il regime posologico comprende la fase di: somministrazione ad un paziente che soffre di malattia infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene che abbia specificità legante per l'integrina $\alpha 4\beta 7$ umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o
15 frammento legante l'antigene preveda una regione legante l'antigene di origine non umana e almeno una parte di un anticorpo di origine umana, mentre l'immunoglobulina umanizzata o frammento legante l'antigene viene somministrato al paziente secondo un regime posologico sottocutaneo o intramuscolo che mantenga uno steady state medio di siero attraverso la concentrazione di circa 9 a 13 $\mu\text{g/mL}$ del frammento legante l'antigene; in cui il regime
20 posologico induca una reazione clinica e remissione clinica nella malattia infiammatoria intestinale del paziente e ulteriormente in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$, in cui la regione legante l'antigene comprenda tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a catena leggera variabile e tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e
25 CDR3) di una regione a catena pesante variabile della sequenza aminoacidica definiti di seguito:

catena leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante::
CDR1 SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 come ulteriormente descritto
nelle rivendicazioni.

In un altro caso, la formulazione dell'invenzione può essere utilizzata in un regime
5 posologico per il trattamento terapeutico della malattia infiammatoria intestinale, mentre il
regime posologico comprende la fase di somministrazione ad un paziente che soffre di malattia
infiammatoria intestinale, un'immunoglobulina umanizzata o un frammento legante l'antigene
che abbia specificità legante per l'integrina $\alpha 4\beta 7$ umana, in cui l'immunoglobulina umanizzata o
frammento legante l'antigene preveda una regione legante l'antigene di origine non umana e
10 almeno una parte di un anticorpo sia di origine umana, mentre l'immunoglobulina umanizzata o
frammento legante l'antigene viene somministrato al paziente secondo un regime posologico
sottocutaneo o intramuscolo che mantenga uno steady state medio di siero attraverso la
concentrazione da 35 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del frammento legante l'antigene; in cui il regime posologico
induca una reazione clinica e remissione clinica nella malattia infiammatoria intestinale del
15 paziente e ulteriormente in cui l'immunoglobulina umanizzata o il frammento legante l'antigene
abbia una specificità di legame per il complesso $\alpha 4\beta 7$, in cui la regione legante l'antigene
comprende tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di una regione a
catena leggera variabile e tre regioni determinanti complementarietà (CDR1, CDR2, e CDR3) di
una regione a catena pesante variabile della sequenza aminoacidica definiti di seguito: catena
20 leggera: CDR1 SEQ ID N.:9, CDR2 SEQ ID N.:10, CDR3 SEQ ID N.:11; catena pesante: CDR1
SEQ ID N.:12, CDR2 SEQ ID N.:13, CDR3 SEQ ID N.:14 in cui l'anticorpo è ulteriormente
descritto nelle rivendicazioni.

In alcune realizzazioni, il metodo di trattamento, la formulazione per l'uso nella dose o il
regime posologico assicura la probabilità che un paziente sviluppi la risposta all'anticorpo anti-
25 $\alpha 4\beta 7$. Lo sviluppo di HAHA, ad es. come misurato da anticorpi reattivi all'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$,

può aumentare la clearance dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, ad es. ridurre la concentrazione di siero dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, ad es. diminuire il numero di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ legati all'integrina $\alpha 4\beta 7$, rendendo il trattamento meno efficace. In alcune realizzazioni, per evitare HAHA, il paziente può essere trattato con regime di induzione seguito da un regime di mantenimento. In
5 alcune realizzazioni, non vi è interruzione tra il regime di induzione e il regime di mantenimento. In alcune realizzazioni, il regime di induzione comprende la somministrazione di una pluralità di dosi dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ al paziente. Per evitare HAHA, il paziente può essere trattato con una dose iniziale elevata, ad es. almeno 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg o da circa 2 a 6 mg/kg, o somministrazioni iniziali frequenti, ad es. circa una volta a
10 settimana, circa una volta ogni due settimane o circa ogni tre settimane, della dose iniziale quando si inizia la terapia con anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In alcune realizzazioni, l'uso nel metodo di trattamento mantiene almeno il 30%, il 40%, il 50%, il 60%, il 70%, l'80%, il 90% o il 95% dei pazienti con HAHA negativo. In altre realizzazioni, l'uso nel metodo di trattamento mantiene i pazienti HAHA negativi per almeno 6 settimane, 10 settimane, 15 settimane, sei mesi, 1 anno, 2 anni o per la
15 durata della terapia. In alcune realizzazioni, i pazienti, o almeno il 30%, 40%, 50%, 60% dei pazienti che sviluppano HAHA mantengono un basso titolo, ad es. ad es., ≤ 125 , o dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In una realizzazione, l'uso nel metodo di trattamento mantiene almeno il 70% dei pazienti con HAHA negativo per almeno 12 settimane dopo l'inizio della terapia con anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

20 La formulazione può essere somministrata ad un individuo (ad es. un umano) solo o insieme ad un altro agente. Una formulazione dell'invenzione può essere somministrata prima, durante o successivamente alla somministrazione dell'agente aggiuntivo. In una realizzazione, più di una formulazione che inibisce il legame di un'integrina $\alpha 4\beta 7$ ai suoi ligandi sono somministrati. In tale realizzazione, un agente, ad es. un anticorpo monoclonale, quale un
25 anticorpo anti-MAdCAM o un anti-VCAM-1 può essere somministrato. In un'altra realizzazione,

l'agente aggiuntivo inibisce il legame di leucociti ad un ligante endoteliale in una via diversa dalla via di $\alpha 4\beta 7$. Tale agente può inibire il legame, ad es di chemochine (motivo C-C) recettore 9 linfociti che esprimono (CCR9) alle chemochine che hanno espresso timo (TACK o CCL25) o un agente che evita il legame di LFA-1 alla molecola di adesione intracellulare (ICAM). Ad esempio, 5 gli anticorpi anti-TACK o anti-CCR9 di un inibitore CCR9 a molecola piccola, quali gli inibitori rivelati nella pubblicazione PTC WO03/099773 o WO04/046092, o anticorpo di un oligonucleotide che evita l'espressione dell'ICAM è somministrato insieme ad una formulazione della presente invenzione. In ancora un'altra realizzazione, un ulteriore principio attivo (ad es. il composto antinfiammatorio, quale la sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurine, acido 5 10 aminosalicilico a base di antinfiammatori, altro composto antinfiammatorio non steroideo, un composto antinfiammatorio steroideo o antibiotico somministrato comunemente per il controllo di IBD (ad es ciprofloxacina, metronidazolo) o un altro agente biologico (ad es antagonisti alfa TNF) possono essere somministrati insieme ad una formulazione della presente invenzione.

In una realizzazione, la dose della medicazione co-somministrata può essere diminuita 15 nel tempo durante il periodo di trattamento attraverso la formulazione che comprende l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. AD esempio un paziente trattato con steroidi (ad es. prednisone, prednisolone) all'inizio o prima di trattare con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ subirebbe un regime di dosi in diminuzione di steroidi iniziando a 6 settimane di trattamento con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La dose steroidea sarà ridotta di circa il 25% entro 4-8 settimane di 20 inizio, del 50 % a circa 8-12 settimane e del 75% a circa 12-16 settimane durante il trattamento con formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. In un caso, a circa 16-24 settimane di trattamento con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, la dose steroidea può essere eliminata. In un altro esempio, un paziente trattato con composto antinfiammatorio, quale 6 mercaptopurina all'inizio, o prima, del trattamento con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ subirebbe un regime di dose 25 in diminuzione del composto antinfiammatorio simile al regime per il dosaggio steroideo come

notato prima.

In una formulazione, la formulazione per l'uso nel metodo comprende la somministrazione sottocutanea o intramuscolo somministrando una quantità efficace di una formulazione dell'invenzione ad un paziente. In un'altra realizzazione, la formulazione può essere preparata per auto-somministrazione. In un aspetto, una formulazione secca può essere ricostituita, per esempio, con un liquido come sopra descritto, per l'uso in iniezione, ad es. iniezione endovenosa, intramuscolare o sottocutanea.

L'invenzione riguarda anche una formulazione per l'uso in un metodo per trattare una malattia associata all'infiltrazione leucocitaria di tessuto che esprime la molecola MAdCAM (ad esempio, MAdCAM-1). Il metodo comprende la somministrazione a un paziente di una quantità sufficiente di una formulazione anticorpale anti- $\alpha 4\beta 7$ dell'invenzione. In una forma di realizzazione, la malattia GvHD (graft versus host disease). In alcune forme di realizzazione, la malattia è una malattia associata all'infiltrazione leucocitaria di tessuto a seguito del legame di leucociti che esprimono l'integrina $\alpha 4\beta 7$ all'endotelio associato all'intestino che esprime la molecola MAdCAM (ad es., MAdCAM-1). In altre forme di realizzazione, la malattia è gastrite (ad esempio, gastrite eosinofila o gastrite autoimmune), pancreatite o diabete mellito insulino-dipendente. In altre forme di realizzazione, la malattia è colecistite, colangite o pericolangite.

L'invenzione riguarda anche la formulazione per l'uso in un metodo per trattare la malattia infiammatoria intestinale in un paziente. In una forma di realizzazione, il metodo comprende la somministrazione sottocutanea di una quantità sufficiente di una formulazione anticorpale anti- $\alpha 4\beta 7$ dell'invenzione. In alcune forme di realizzazione, la sindrome dell'intestino irritabile è la colite ulcerosa o il morbo di Crohn. In altre forme di realizzazione, la sindrome dell'intestino irritabile è la celiachia, l'enteropatia associata a artropatie sieronegative, la colite microscopica o collagenosa, la gastroenterite (ad esempio la gastroenterite eosinofila) o la pouchite.

In alcune forme di realizzazione, il trattamento con un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ non altera il

rapporto tra linfociti CD4: CD8. CD4: i rapporti CD8 possono essere misurati in sangue, ago aspirato linfonodale e liquido cerebrospinale (CSF). I rapporti linfocitari CSF CD4+:CD8+ nei soggetti sani sono generalmente superiori o uguali a circa 1. (Svenningsson et al., J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46; Svenningsson et al., Ann Neurol. 1993; 34:155-161). Un
5 immunomodulatore può alterare il rapporto CD4:CD8 a meno di 1.

Articoli di produzione

In un altro caso, l'invenzione è un articolo di produzione che contiene la formulazione farmaceutica della presente invenzione e fornisce istruzioni per l'uso. L'articolo della produzione comprende un contenitore. I contenitori adatti includono, ad esempio, fiale, flaconi (ad esempio
10 fiale e due camere, una fiala della formulazione liquida con o senza ago, una fiala di formulazione solida con o senza una fiala di ricostituzione liquida con o senza un ago), siringhe (quali le siringhe a doppia camera, siringhe precaricate, un iniettore automatico) cartucce e provette. Il contenitore può essere composto da diversi materiali quali il vetro, il metallo o la plastica. Il contenitore contiene la formulazione ed un'etichetta sopra o in associazione al contenitore può indicare le
15 istruzioni per l'uso. In un'altra realizzazione, la formulazione può essere preparata per l'auto-somministrazione e/o contenere le istruzioni per l'auto somministrazione. In un caso, il contenitore che contiene la formulazione può essere una fiala monouso. In un altro caso, il contenitore che conserva la formulazione può essere una fiala multi-uso che consente la somministrazione ripetuta della formulazione (ad es da 2-6 somministrazioni), ad es più di una
20 parte di una formulazione ricostituita. L'articolo della produzione può anche includere altri materiali auspicabili da un punto commerciale o dell'utente, inclusi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi, siringhe e inserti con istruzioni per l'uso come annotato nella sezione precedente.

In una realizzazione l'articolo di produzione è una siringa con un ago. La dimensione dell'ago può essere 25 G, 26 G, 27 G, 29 G, 30 G. Un ago con una parete fine, ad es 19 G o 23 G
25 o superiore, può facilitare l'iniezione di una formulazione ad alta velocità. In un caso, la

dimensione dell'ago è di 27 G o maggiore. La lunghezza dell'ago può essere adatta per la somministrazione sottocutanea e può essere di circa 1/2 pollici, circa 5/8 pollici o 1 pollice (1 pollice = 2,54 cm). In alcune realizzazioni, la siringa è pre-riempita.

Sviluppo del prodotto della siringa pre-riempita

5 In alcuni casi, esistono molte caratteristiche del prodotto che sono auspicabili per un prodotto della proteina (ad es. un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$) in una siringa pre-riempita (PFS) (ad es per la somministrazione intramuscolo o sottocutanea di una formulazione). È utile bilanciare alcuni degli attributi per ridurre gli effetti contrastanti. Ad esempio, quando è necessario un volume a bassa iniezione, potrebbe essere preferibile una concentrazione proteica elevata per la
10 formulazione. Ad ogni modo, nel caso di un'elevata concentrazione proteica, possono esserci elevati tassi di impurità (ad es. impurità dell'aggregato che filtrano nella formulazione dalla siringa) ed è necessaria più forza nell'utilizzo della siringa. Un ago di dimensioni piccole usato per maggiore comodità per il paziente nel sito di iniezione, può richiedere maggiore forza nell'utilizzo della siringa. La comprensione di come viene compromessa la stabilità e la
15 prestazione del prodotto in base alla formulazione e ai parametri della siringa quali concentrazione proteica, pH, diametro interno dell'ago permette lo sviluppo di un prodotto proteico (ad es. un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in una siringa pre-riempita).

In un caso, un metodo per sviluppare un prodotto proteico (ad es. anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$) per uso in siringa pre-riempita comprende la variazione dei parametri della siringa e i parametri
20 di formulazione, ad es. in modo coordinato o simultaneamente. In questo modo è possibile capire meglio l'intervallo della stabilità della proteina e della prestazione del prodotto che ci si può aspettare da un prodotto proteico in una siringa pre-riempita, quando ogni aspetto viene variato separatamente o in serie.

Lo sviluppo di un prodotto in siringa pre-riempita (ad es. un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$) richiede
25 la comprensione che ad un certo punto, vi è una formulazione liquida in contatto con diversi

componenti della siringa pre-riempita (Figura 15). Ad esempio, la formulazione può essere in contatto con il cilindro della siringa, che può essere in vetro (ad es. vetro borosilicato di tipo I) o in plastica (ad es. polimero olefinico ciclico (COP), copolimero olefina ciclica (COC), polipropilene o politetrafluoroetilene). La formulazione può essere in contatto con la siringa, lo stantuffo e/o il tappo della punta, che può essere elastomerico (ad es. dello stesso o di un tipo diverso di materiale, (ad es. plastica, come polietilene, polistirene o polipropilene o elastico, quale gomma (naturale, sintetica, butile) o silicone)) . La formulazione può essere in contatto con il lubrificante che è aggiunto ad una superficie interna del cilindro per facilitare il movimento dello stantuffo. Il lubrificante può essere, ad esempio, olio di silicone, minerale o glicerina. Nella realizzazione di una siringa con ago montato, l'ago potrebbe essere in lega di metallo (ad es. ago in acciaio inossidabile e adesivo usato per incollare l'ago in posizione). Una considerazione da fare nel caso di un prodotto proteico in una siringa pre-riempita è che la soluzione della proteina liquida è a diretto contatto con uno o più di questi componenti della siringa per tutta la durata del prodotto. I componenti della siringa e della formulazione possono influenzare la stabilità del prodotto.

I parametri di formulazione che possono compromettere la stabilità del prodotto della siringa pre-riempita includono concentrazione proteica, pH, tipo di tampone, concentrazione, forza ionica, tipo e concentrazione dello stabilizzatore. Esempi di stabilizzatori per le formulazioni proteiche includono, ad esempio, sali ionici, polisaccaridi, aminoacidi, antiossidanti, chelanti e tensioattivi come descritto nelle sezioni precedenti.

I componenti della siringa che possono influenzare la stabilità del prodotto della siringa pre-riempita, ad esempio, lubrificante, composizione dello stantuffo o cappuccio della punta e impurità. La quantità del lubrificante (ad es. olio siliconico sul cilindro della siringa) può influenzare la stabilità del prodotto. La composizione dello stantuffo e del cappuccio della punta, che può compromettere la permeabilità dell'ossigeno di questi componenti e introdurre perdite d

dei componenti stessi del prodotto proteico (ad es. formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$) può similmente compromettere la stabilità del prodotto. Un altro parametro della siringa che può compromettere la stabilità del prodotto include il tipo e/o quantità di impurità (ad es metalli pesanti (ad es. tungsteno)) che possono essere trasferite nella formulazione del prodotto (ad es. dal cilindro (ad es cilindro di vetro) e/o ago (ad es. acciaio inossidabile)). (Vedere anche Ludwig et al. J.Pharm. Sci. 99:1721-1733 (2010); Nashed-Samuel et al., American Pharmaceutical Review Jan/Feb:74-80 (2011); Badkar et al. AAPS PharmSciTech 12:564-572)

Una siringa pre-riempita può essere iniettata manualmente o usata con un dispositivo auto-iniettante. Il controllo funzionale della siringa pre-riempita include la misurazione della forza di sblocco, della forza necessaria per iniziare il movimento dello stantuffo e della forza di spinta, la forza necessaria per iniettare i contenuti della siringa a velocità costante. La prestazione meccanica della siringa pre-riempita può dipendere da molti parametri della formulazione e della siringa quali la viscosità della formulazione e la quantità di lubrificante (ad es. olio di silicone) nella siringa.

Diversi attributi dei prodotti proteici nelle siringhe pre-riempite e nella formulazione o i fattori della siringa che possono influenzare quegli attributi del prodotto sono presentati nella tabella 1. Molti attributi del prodotto possono essere una funzione complessa di diversi parametri della formulazione e della siringa. Ad esempio, la forza di spinta della siringa dipende dalla viscosità della formulazione, sebbene la viscosità possa dipendere da diversi fattori della formulazione, quali la concentrazione proteica, le concentrazioni dello stabilizzatore e il pH.

Tabella 1: Attributi del prodotto per i prodotti proteici nelle siringhe pre-riempite e i parametri della siringa e ella formulazione potenziale che possono influire sui loro attributi

Attributo del prodotto	Parametri di formazione della proteina che possono influenzare l'attributo del prodotto	Parametri della siringa che possono influenzare l'attributo del prodotto
Osmolarità	Concentrazioni dello stabilizzatore, pH, concentrazione proteica	Nessuno
Viscosità	Concentrazioni dello stabilizzatore,	Nessuno

	pH, concentrazione proteica	
Forza di spinta e di sblocco iniziale della siringa	Viscosità, concentrazione proteica, concentrazione del tensioattivo	Velocità di iniezione, lunghezza dell'ago, ID ago, ID cilindro della siringa, quantità di olio di silicone, formulazione stantuffo e forma.
Velocità della deaminazione della proteina	Concentrazioni dello stabilizzatore, pH, concentrazione proteica	Nessuno
Velocità di ossidazione della proteina	Concentrazioni dello stabilizzatore/antiossidante, pH, concentrazione delle proteine, concentrazione del tensioattivo, ossigeno disciolto	Formulazione dello stantuffo e del cappuccio della punta (permeabilità dell'ossigeno), livelli di impurità dei metalli pesanti, dimensione della bolla d'aria
Velocità della formazione di aggregato solubile	Concentrazioni dello stabilizzatore, pH, concentrazione proteica, concentrazione del tensioattivo, ossigeno sciolto in soluzione	Quantità di olio di silicone, livelli di impurità del metallo pesante, dimensione della bolla d'aria
Velocità della formazione del particolato proteinico visibile e sub-visibile	Concentrazioni dello stabilizzatore, pH, concentrazione proteica, concentrazione del tensioattivo	Quantità di olio di silicone, livelli di impurità del metallo pesante, dimensione della bolla d'aria, area della superficie interna della siringa

In un caso, un tensioattivo, tipo il polisorbato 20 o polisorbato 80 può essere aggiunto a formulazioni proteiche nelle siringhe pre-riempite (ad es per evitare che le molecole proteiche si assorbano e denaturino nelle interfacce all'aria/liquide e/o liquide/lubrificanti (ad es olio di silicone). L'assorbimento della superficie e la denaturazione delle molecole delle proteine può essere un meccanismo della nucleazione delle particelle proteinacee visibili e sub-visibili. L'aggiunta di un tensioattivo ad una siringa pre-riempita, quindi, può ridurre la formazione dei particelle visibili e sotto-visibili nei prodotti della siringa pre-riempita. In una realizzazione, una piccola quantità di tensioattivi può emulsionare il lubrificante (ad esempio le goccioline di olio di

silicone nella soluzione e quindi ridurre la formazione di lubrificante sotto-visibile e visibile (ad es. goccioline di olio di silicone)) (Ludwig et al., *supra*). In un'altra realizzazione, la quantità di tensioattivo in una formulazione è ridotta a causa dei potenziali effetti dannosi di elevate quantità di tensioattivi sulle formulazioni della proteina. Le impurità di perossido presenti nei polisorbati
5 possono portare ad un'ossidazione proteica aumentata (Wang and Wang J. Pharm. Sci. 91:2252-2264 (2002)). Elevate quantità di tensioattivi possono emulsionare una quantità considerevole di olio di silicone dalle pareti della siringa e portare ad un aumento della forza di spinta funzionale per la durata. Gli studi sullo sviluppo del prodotto possono essere ideati per esaminare l'effetto della variazione dei livelli di tensioattivo sulla stabilità del prodotto e la prestazione della siringa.

10 Le interazioni complesse tra la formulazione e i parametri della siringa nelle proteine/sistemi PFS sono conducibili all'esame di questi sistemi utilizzando un approccio Quality by Design (QbD) o Design of Experiments (DOE). Possono essere ideati studi che variano simultaneamente i parametri di formulazione e la siringa per avere una migliore comprensione di questi sistemi complessi. Per questo deve essere previsto un approccio diversificato nello sviluppo
15 di prodotti con siringa pre-riempita. La Tabella 2 mostra un esempio dei parametri di ingresso e dei livelli che possono essere previsti nel design dell'esperimento per un prodotto in siringa pre-riempita e un esempio del controllo analitico da utilizzare. Secondo il tipo di design sperimentale previsto per lo studio QbD, il numero di esperimenti può variare da 9 per lo screening a 81 per design che tenga conto di tutti i fattori (tutte le combinazioni possibili). Maggiore è il numero di
20 esperimenti, maggiore è il numero delle interazioni tra i parametri del prodotto che possono essere risolti. Il software ideato per questa analisi, ad esempio, il software di analisi statistica JIMP® (Cary, NC), può essere d'aiuto per gli studi QbD. Quest'analisi permette una comprensione quantitativa di come parametri di formulazione e siringa interagiscono per influire sugli attributi del prodotto.

25 Tabella 2: Esempio di design sperimentale per un prodotto proteico liquido in siringa pre-

riempita

Parametri di input della formulazione	Livelli	Controllo analitico
Concentrazione proteica	50, 100, 150 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilità della proteina per cromatografia di esclusione e cromatografia a scambio di ioni • Forza di sblocco e forza di spinta nel tempo utilizzando l'analisi della forza • Formazione di particelle proteinacee sotto-visibili e goccioline di olio di silicone nel tempo utilizzando l'imaging del micro flusso o contatore di Coulter
pH	5,5, 6,5, 7,5	
Concentrazione del tensioattivo	0,01, 0,08, 0,15 %	
Quantità di olio di silicone in siringa	0,2, 0,5, 0,8 mg/siringa	

Un esempio di un modello previsionale che può essere ottenuto dall'esperimento come evidenziato nella Tabella 2 è precisato in seguito, in cui C_n sono costanti numeriche.

Formazione dell'aggregato solubile nel Tempo = $C_0 + C_1$ [Concentrazione proteica] + C_2
 5 [Concentrazione proteica]² + C_3 [pH] + C_4 [Concentrazione del tensioattivo] + C_5 [Quantità del
 lubrificante]

Diversi parametri della siringa possono compromettere la stabilità del prodotto e la prestazione, quindi una realizzazione include la caratterizzazione di come le tolleranze consentite a livello dei parametri della siringa influenzano la stabilità del prodotto e la prestazione. La
 10 quantità di lubrificante (ad es. olio di silicone) sul cilindro della siringa può variare dal 50 al 100% da siringa a siringa. La variazione della quantità può compromettere diverse caratteristiche del prodotto come mostrato nella Tabella 1. Il diametro interno del cilindro della siringa può variare da siringa a siringa e questo influisce sulle forze di iniezione. Per le siringhe con ago montato, il
 15 diametro interno dell'ago può variare da lotto a lotto o da produttore a produttore e questo influenza le forze di iniezione. Utilizzando un approccio QbD per esaminare come i parametri della siringa influiscano sulla prestazione, possono essere ottenuti modelli di previsione per valutare come le tolleranze consentite nei parametri della siringa possano influenzare la prestazione del prodotto. I modelli di previsione ottenuti usando un approccio QbD possono

essere usati per selezionare la formulazione e i parametri della siringa che soddisfino gli attributi del prodotto desiderati e prevedano la stabilità e la prestazione del prodotto.

La siringa pre-riempita può contenere un'aggiunta di emulsione di silicone o tungsteno alla formulazione della proteina. Le quantità esemplari di silicone che possono essere presenti
5 nella siringa predefinita variano da 0,3 mg a circa 0,8 mg. In un caso, la quantità di silicone che può essere presente nella siringa pre-riempita è di circa 0,3 mg, circa 0,4 mg, circa 0,5 mg, circa 0,6 mg, circa 0,7 mg o circa 0,8 mg. In un altro caso, la viscosità della formulazione andrà da 2 a 60 cP (1 cP = 0,001 Pa.s), con conseguenti forze di iniezione da 5N a 80N alla velocità di 200 mm/min. In un altro caso ancora, la viscosità della formulazione varia da 4 a 27 cP risultando in
10 forze di iniezione da 10 N a 40 N alla velocità di 200 mm/min.

L'invenzione sarà compresa più a fondo con riferimento ai seguenti esempi.

PROTOCOLLO PER LA CREAZIONE DELLA FORMULAZIONE

Una soluzione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è diafiltrata in un sistema di filtrazione a flusso tangenziale per raggiungere la concentrazione specificata in citrato, istidina, tampone di arginina
15 poi raggruppati e mescolati con una soluzione di polisorbato 80 in citrato, istidina, tampone di arginina. La soluzione viene conservata a -70 °C in flaconi da 2L o 5 L. La soluzione viene poi scongelata e filtrata due volte attraverso un filtro da 0,2 μm . Circa 1,0 mL sono trasferiti in una siringa sterilizzata e chiusa con uno stantuffo (stopper) sterilizzato. La formulazione viene conservata e il prodotto finale viene spedito in siringhe a 2-8 °C.

20 **ESEMPI**

ESEMPIO 1

PRODUZIONE DELLA FORMULAZIONE

Fattori

Concentrazioni dell'eccipiente

25 È stata testata la formazione di aggregati nella formulazione dell'anticorpo. È stato

sviluppati un modello di aggregati SEC in base a dati sperimentali che hanno esaminato la concentrazione proteica, il pH e il rapporto molare tensioattivo:proteina. All'intervallo del pH da 6,0 a 6,5, la formazione di aggregati era simile con rapporto molare polisorbato 80: proteina da 0,7 a 1,5. (Fig 6) Generalmente, con rapporti PS80:proteina superiore a 1,5, la velocità di
5 formazione degli aggregati aumenta con l'aumento del pH. (Fig 7)

È stato fatto un esperimento per analizzare la formazione di aggregati SEC in presenza di aria. Fiale di borosilicato e chiuse con stopper elatometrici con uno spazio vuoto per l'aria sono state riempite con undici diverse formulazioni in composizioni diverse. È stata creata una serie identica di formulazioni e lo spazio è stato spostato con argon. Questi campioni sono stati stoccati
10 con stabilità a 40°C per due settimane. Tutti i campioni con lo spazio vuoto per l'aria hanno presentato grandi quantità di aggregati alla fine dell'esperimento a confronto con la stessa formulazione con lo spazio vuoto riempito di argon.

Tabella 3

Campione	Conc. proteica (mg/ml)	Saccarosio (%)	Istidina (mM)	Arginina (mM)	PS 80 (%)	pH	Campioni di aria aggregati (%)	Campioni di argon aggregati (%)
1	60	2	25	75	0,05	6,2	0,64	0,48
2	60	4	25	75	0,05	7	0,62	0,42
3	160	4	50	75	0,14	6,2	0,92	0,73
4	160	2	50	75	0,14	7	1,16	0,74
5	60	2	50	125	0,05	7	1,28	0,33
6	60	4	50	125	0,05	6,6	0,48	0,36
7	160	4	25	125	0,14	7	1,04	0,70
8	160	2	25	125	0,14	6,2	1,06	0,75
9	160	3	25	75	0,14	6,6	1,09	0,78
10	110	3	50	125	0,10	6,2	0,65	0,47
11	110	2	25	75	0,10	6,6	0,90	0,62

Secondo questi esperimenti, si pensa che gli aggregati SEC si formino per ossidazione o
15 per formazione del legame di disulfide. Inoltre sono stati analizzati gli antiossidanti e/o i chelanti. È stata creata una formulazione a base di 40 mM di istidina, 90 mM di arginina, e 160 mg/mL di proteina con rapporto molare polisorbato 80:proteina pari a 1,5 con pH 6.6. Alla formulazione sono stati aggiunti 25mM di citrato, 5 mM di citrato, 5 mM EDTA, 25 mM cisteina, o 5 mM di

cisteina. Tutti e 3 gli eccipienti aggiuntivi hanno ridotto la formazione di aggregati (Fig. 8). L'aggiunta degli antiossidanti e/o dei chelanti è stata classificata secondo la prestazione come citrato>EDTA>cisteina. 5 o 25 mM di citrato hanno ridotto la formazione di aggregati SEC a confronto con la formulazione di controllo.

5 È stato eseguito un esperimento per determinare gli effetti del pH, della concentrazione proteica, della concentrazione del citrato, della concentrazione di istidina e del rapporto molare polisorbato 80:proteina. Il pH è stato modificato da 6,0 a 6,3, la concentrazione della proteina è stata variata da 60 a 160 mg/mL, la concentrazione di citrato è stata variata da 0 a 25 mM, la concentrazione dell'istidina è stata variata da 25 a 50 mM e il rapporto molare polisorbato 80
10 :proteina è passato da 0,7 a 1,5. Le formulazioni sono state riempite in siringhe lunghe 1ml 27G1/2" (silicone 0.55 +/- 0.2 mg). Tutte le formulazioni contenevano circa 125 mM di arginina.

La stabilità è stata testata a 40 °C per due settimane utilizzando CEX e SEC. I risultati (Fig 9 e Tabella 4) mostrano una riduzione della formazione dell'aggregato con la presenza di 25 mM di citrato nella formulazione mentre aumentando la concentrazione della proteina tasso di
15 formazione di aggregati aumenta. La quantità di monomero mostra la tendenza opposta alla formazione dell'aggregazione a 25 °C e 40 °C mentre a 5°C la quantità di monomero resta sostanzialmente invariata fino a 24 mesi (Tabella 5).

Un'altra serie di formulazioni ha controllato la velocità di formazione degli aggregati SEC in presenza di citrato a 40-63 mM ma senza istidina a 40 °C, 25 °C, 5 °C. La velocità di
20 formazione dell'aggregato in queste formulazioni è leggermente superiore alle formulazioni con istidina a 40°C. Comunque, a 5°C, la velocità di formazione degli aggregati nelle formulazioni con citrato e senza istidina erano paragonabili alle formulazioni a base di citrato e istidina (Tabella 6). Inoltre a 5 °C, la quantità di monomero resta sostanzialmente invariata fino a 24 mesi (Tabella 7).

Tabella 4

Formulazione #	Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PS80:proteina	Quantità iniziale di aggregati (%)	Cambiamento negli aggregati dopo 12 mesi a 5 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 24 mesi a 5 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 12 mesi a 25 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 1 mese a 40 °C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	0,4	0,1	0,1	0,7	0,2
2	60	6,4	50	0	125	1,5	0,4	0,5	1,1	1,5	0,4
3	157	6,4	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,3	1,3	0,5
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,4	0,6	0,7	2,5	0,8
5	60	6,2	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,2	0,5	0,2
6	110	6,0	50	0	125	0,7	0,4	0,4	0,6	1,7	0,7
7	162	6,2	50	25	125	0,7	0,4	0,3	0,3	1,1	0,5
8	160	6,0	50	0	125	1,5	0,4	0,4	0,6	2,2	0,9
9	169	6,3	25	25	125	0,7	0,5	-	0,3	-	0,6
10	158	6,3	25	25	123	1,0	0,5	-	-	-	0,6

Tabella 5

formulazione #	Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PS80:proteina	Quantità iniziale di monomero (%)	Cambiamento nei monomeri dopo 12 mesi a 5 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 24 mesi a 5 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 12 mesi a 25 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 1 mese a 40 °C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	98,3	0,4	0,1	-2,5	-1,3
2	60	6,4	50	0	125	1,5	98,3	-0,2	-1,0	-3,9	-2,0
3	157	6,4	50	25	125	1,5	98,2	0,2	0,0	-3,1	-1,6
4	161	6,3	50	0	125	0,7	98,2	0,0	-0,4	4,5	-2,1
5	60	6,2	50	25	125	1,5	98,3	0,3	0,2	-2,2	-1,4
6	110	6,0	50	0	125	0,7	98,3	0,1	-0,3	-3,6	-2,1
7	162	6,2	50	25	125	0,7	98,3	0,2	-0,1	-2,8	-1,7
8	160	6,0	50	0	125	1,5	98,3	-0,1	-0,4	-4,2	-2,3
9	169	6,3	25	25	125	0,7	98,2	-	-0,1	-	-1,8
10	158	6,3	25	25	123	1,0	98,1	-	-	-	-1,7

Tabella 6

Formulazione #	Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PS80:proteina	Quantità iniziale di aggregati (%)	Cambiamento negli aggregati dopo 12 mesi a 5 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 24 mesi a 5 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 12 mesi a 25 °C	Cambiamento negli aggregati dopo 1 mese a 40 °C
11	160	6,3	0	40	125	0,7	0,5	-	0,4	-	0,9
12	165	6,3	0	40	125	1,5	0,6	0,3	-	-	0,9
13	62	6,2	0	40	125	1,5	0,5	-	-	1,7	0,4
14	170	6,1	0	40	125	1,5	0,5	-	-	-	0,9
15	165	6,5	0	63	125	1,5	0,5	-	-	-	1,0
16	160	6,3	0	40	125	1,0	0,6	0,3	-	-	0,9

Tabella 7

Formulazione #	Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PSS0:proteina	Quantità iniziale di monomero (%)	Cambiamento nei monomeri dopo 12 mesi a 5 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 24 mesi a 5 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 12 mesi a 25 °C	Cambiamento nei monomeri dopo 1 mese a 40 °C
11	160	6,3	0	40	125	0,7	98,3	-	-0,3	-	-2,2
12	165	6,3	0	40	125	1,5	98,2	0,1	-	-3,4	-2,1
13	62	6,2	0	40	125	1,5	98,1	-	-	-	-1,4
14	170	6,1	0	40	125	1,5	98,1	-	-	-	-2,0
15	165	6,5	0	63	125	1,5	98,2	-	-	-	-2,3
16	160	6,3	0	40	125	1,0	98,2	0,1	-	-	-2,0

pH

Sono stati condotti diversi esperimenti sul pH per determinare gli effetti del pH sul degrado CEX a 5°C. La formulazione dell'anticorpo vedolizumab comprendeva 160 mg/ml di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, 125 mM di arginina, 50 mM istidina, e 25 mM di citrato. Sono stati testati
5 diversi livelli di pH, 6,3, 6,5, 6,7 e 6,9 i con stabilità a 40°C, 25°C, e 5°C.

I modelli CEX a 40°C mostrano (FIG. 10) che il pH influenza maggiormente il degrado. Il pH delle formulazioni a base di istidina diminuisce con la temperatura mentre il pH delle formulazioni a base di citrato non è influenzato dalla temperatura (FIG. 11). La formulazione a base di istidina/citrato è stata determinata per avere una buona stabilità con pH 6,8 a 40°C dopo
10 1 settimana, 6,3-6,5°C a 25°C dopo 6 mesi e 6,3-6,5°C a 5°C dopo 6 mesi. Secondo gli studi ulteriori, la stabilità delle formulazioni erano simili a 25°C e 5°C per l'intervallo di pH del 6,2 a 6,9 (Tabelle 8 e 9).

Tabella 8

Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PS80:proteina	Quantità iniziale di specie acide (%)	Quantità iniziale di specie basiche (%)	Quantità iniziale di isoformo maggiore (%)	Differenza nella % dell'area relativa nel tempo a 25 °C					
									Modifica nel CEX acido dopo 6 mesi	Modifica nel CEX acido dopo 12 mesi	Modifica nel CEX basico dopo 6 mesi	Modifica nel CEX basico dopo 12 mesi	Modifica nel CEX maggiore dopo 6 mesi	Modifica nel CEX maggiore dopo 12 mesi
157	6,4	50	25	125	1,5	23,9	6,8	69,3	8,5	17,4	7,1	3,4	-15,6	-20,8
162	6,2	50	25	125	0,7	24,0	6,9	69,1	4,4	12,8	10,8	8,6	-15,2	-21,4
158	6,3	50	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	7,2	-	4,9	-	-14,4	-
160	6,4	42	25	125	1,5	24,9	5,5	69,7	9,5	-	1,0	-	-14,4	-
147	6,7	45	25	125	2,1	24,9	4,7	70,4	14,8	-	3,6	-	-16,5	-
147	6,9	45	25	125	2,2	25,0	4,9	70,1	14,5	-	3,2	-	-17,9	-
153	6,7	46	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	14,7	-	0,3	-	-17,3	-
154	6,9	46	25	125	1,5	24,9	5,3	69,8	19,7	-	0,5	-	-20,2	-
170	6,5	50	25	125	1,0	25,7	4,6	69,7	10,8	-	4,4	-	-15,2	-
170	6,5	50	25	125	1,5	25,7	4,6	69,7	11,1	-	5,2	-	-16,4	-
160	6,5	50	25	125	1,5	26,3	7,0	66,7	11,8	-	-2,6	-	-11,9	-

Tabella 9

Conc. proteica (mg/ml)	pH	Conc. istidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Rapporto molare PS80:proteina	Differenza nella % dell'area relativa nel tempo a 5°C					
						Modifica nel CEX acido dopo 6 mesi	Modifica nel CEX acido dopo 24 mesi	Modifica nel CEX basico dopo 6 mesi	Modifica nel CEX basico dopo 24 mesi	Modifica nel CEX maggiore dopo 6 mesi	Modifica nel CEX maggiore dopo 24 mesi
157	6,4	50	25	125	1,5	0,2	0,6	2,3	-0,9	-2,5	0,3
162	6,2	50	25	125	0,7	-0,2	-0,7	4,3	2,2	-4,1	-1,5
158	6,3	50	25	125	1,5	0,0	-	1,9	-	-1,9	-
160	6,4	42	25	125	1,5	0,1	-	1,7	-	-1,8	-
147	6,7	45	25	125	2,1	1,7	-	1,7	-	-3,4	-
147	6,9	45	25	125	2,2	1,6	-	1,1	-	-2,7	-
153	6,7	46	25	125	1,5	1,7	-	0,4	-	-2,1	-
154	6,9	46	25	125	1,5	2,1	-	0,4	-	-2,4	-
170	6,5	50	25	125	1,0	0,9	-	1,6	-	-2,5	-
170	6,5	50	25	125	1,5	0,8	-	1,6	-	-2,5	-
160	6,5	50	25	125	1,5	11,8	-	-2,6	-	-11,9	-

ESEMPIO 2

STABILITÀ

È stata testata la stabilità di quattro diverse formulazioni di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ nel corso di 12 mesi. Le formulazioni con pH pari a 6,0-6,2 hanno mostrato circa l'1-2% in meno delle specie maggiori rispetto alle formulazioni che hanno un pH di 6,3-6,4. (FIG. 12). Le formulazioni con pH pari a 6,3-6,4 hanno mostrato meno dell'1% di modifica nelle specie maggiori o di base a 5°C.

È stata testata la stabilità SEC di dieci diverse formulazioni anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ nel corso di 12 mesi (Tabella 10). Le formulazioni con concentrazione proteica pari a 60 mg/mL e a base di 25 mM di citrato hanno subito un cambiamento negli aggregati di 0,1-0,2% dopo 1 anno, mentre le formulazioni a base di 160 mg/mL di proteina e 25 mM di citrato hanno subito un aumento degli aggregati da 0,2-0,3% in 1 anno. Si è registrato un aumento dello 0,4-0,6% a livello degli aggregati per le formulazioni a base di 60, 110 o 160 mg/mL di proteina senza citrato.

Tabella 10

Formulazione #	Concentrazione proteica (mg/mL)	pH	Concentrazione Istidina (mM)	Concentrazione citrato (mM)	Concentrazione arginina (mM)	Rapporto molare PS80	Cambio in % di aggregati a 5 °C dopo 1 anno.
1	62	6,41	50	25	125	0,7	0,11
2	60	6,35	50	0	125	1,5	0,50
3	157	6,44	50	25	125	1,5	0,23
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,56
5	60	6,19	50	25	125	1,5	0,16
6	110	6,03	50	0	125	0,7	0,39
7	162	6,19	50	25	125	0,7	0,26
8	160	6	50	0	125	1,5	0,44
9	165	6,28	0	40	125	1,5	0,30
10	160	6,3	0	40	125	1,0	0,33

15 ESEMPIO 3

VISCOSITÀ

La forza di iniezione necessaria per somministrare la formulazione farmaceutica è correlata alla viscosità della formulazione. Sono state proposte formulazioni con variazione del il pH e delle concentrazioni della proteina, arginina, istidina, citrato, saccarosio e polisorbato 80. È stata testata la viscosità di queste formulazioni. È stato sviluppato un modello statistico dell'Ln

(viscosità).. Il modello mostrava che la viscosità è compromessa dalla concentrazione proteica e dal pH (Fig. 13). Saccarosio, istidina e arginina possono avere un effetto minore sulla viscosità. In alcune formulazioni della proteina, è stato aggiunto cloruro di sodio per ridurre la viscosità della formulazione. È noto, comunque, che gli effetti del cloruro di sodio sulla viscosità
5 dipendono dalla proteina e dalla formulazione.

Il cloruro di sodio è stato aggiunto ad una formulazione a base di 140 mg/ml di vedolizumab, 125 mM di arginina, 25 mM di istidina, 25 mM di citrato, e polisorbato 80 con un rapporto molare 1,5 tra il polisorbato 80 e la proteina e un pH di 6,4. L'NaCl non aveva nessun effetto sulla viscosità della formulazione.

10 Gli effetti della viscosità sulla forza di iniezione delle varie siringhe testate sono precisati nelle figure 16A e 16B.

ESEMPIO 4

METODI

Cromatografia a scambio cationico CEX

15 È stato utilizzato un gradiente di cloruro di sodio/fosfato su una colonna a scambio cationico debole su un sistema di cromatografia liquida ad elevate prestazioni per separare le specie caricate nelle formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ e determinare la composizione della carica delle specie dell'anticorpo. Gli isoforma acidi si eluiscono prima dell'isoforma maggiore e gli isoforma basali si eluiscono dopo l'isoforma maggiore.

20 I dati sulla stabilità per la formulazione di vedolizumab generato usando un test CEX hanno indicato che la % di isoforma maggiore era superiore al 55,00 %.

Focalizzazione isoelettrica capillare (cIEF)

cIEF viene eseguito usando un sistema cIEF di rilevamento a colonna intera iCE280 (Convergent Biosciences, Toronto, Ontario). La scelta di anfoliti può essere raccomandata dal
25 produttore o può essere una combinazione degli anfoliti presenti sul mercato. Una combinazione

utile è una miscela di 3-10 e 5-8 di PHARMALYTE™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

I dati relativi alla stabilità per una formulazione di vedolizumab generata usando un test cIEF ha indicato che la % di isoforma maggiore era pari a circa il 53%, nelle specie acidiche circa 42% e nelle specie di base a circa 5%.

5 Cromatografia di esclusione dimensionale (SEC)

La SEC viene eseguita utilizzando una colonna analitica SEC (Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA). La fase mobile è una soluzione salina tamponata con fosfato e l'assorbimento è monitorato a 280 nm.

I dati relativi alla stabilità per una formulazione di vedolizumab generata usando un test
10 SEC ha indicato che la % di monomero era pari al 99,0%, gli aggregati erano < 0,5% e la % di sostanze a basso peso molecolare era pari a <1,0%.

Analisi SDS-PAGE

L' SDS-PAGE viene eseguita usando il gel Invitrogen (Carlsbad, CA) Tris-Glycine, 4-
20% per la condizione riducente e 4-12% per la condizione non riducente. Il campione della
15 formulazione dell' anticorpo ricostituito viene diluito nel tampone della formulazione liquida poi diluita da uno a due con tampone campione SDS trisglicina (2X, Invitrogen) sia con 10% di 2-mercaptoetanolo o senza 2-mercaptoetanolo (tampone campione non riducente). I campioni vengono riscaldati brevemente e caricati secondo il marcatore del peso molecolare (Invitrogen). I gel sono colorati con blu di coomassie colloidale (Invitrogen) secondo le istruzioni del
20 produttore. Le bande di proteina vengono analizzate per densitometria in modo da identificare la % di catena pesante e leggera per i gel ridotti e la % IgG per gel non riducenti.

Efficacia di legame

Le cellule HuT78 (cellule del linfoma a cellule T umano, American Type Culture Collection, Manassas, VA) sospese in azoturo di sodio 1% BSA in PBS allo 0,01% sono messe a
25 contatto con diluizioni in serie di analisi primarie di anticorpi. Dopo l' incubazione su ghiaccio, le

cellule sono lavate e trattate con anticorpo secondario etichettato. Dopo un ulteriore lavaggio, le cellule sono fisse e sospese in un reagente FACS per l'analisi attraverso citometria a flusso (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ); vedere anche Brevetto Americano n. 7,147,851.

Umidità in base al metodo di Karl Fischer

5 La formulazione è titolata con metanolo per una determinazione coulometrica di Karl Fischer.

ESEMPIO 5

Effetti del silicone da una siringa pre-riempita con prodotti con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$

10 È stata utilizzata una formulazione sottocutanea a base di 60-160 mg/mL di proteina anti- $\alpha 4\beta 7$ in un tampone a base di L-istidina, L-arginina idrocloruro, citrato e polisorbato 80 per studiare gli effetti del silicone sulla stabilità delle formulazioni proteiche e degli attributi di chiusura/contenitore. Lo studio è stato eseguito con un riempimento pari a 0,5 mL.

15 Sono stati controllati i parametri inclusi la concentrazione proteica, il rapporto molare del polisorbato 80 con la proteina e la quantità di silicone che viene spruzzata sul cilindro della siringa. L'intervallo di ogni parametro di inserimento è precisato nella Tabella 11.

Tabella 11. Intervalli parametro di ingresso

Parametri	Basso	Alto
Concentrazione proteica (mg/mL)	100	160
Rapporto Polisorbato 80:Proteina	0	2
Quantità silicone (mg)	0,4	0,8

20 Viene utilizzato un design dello esperimento per determinare la serie di formulazioni da studiare. Un numero ragionevole di formulazioni varia da 6 a 8 formulazioni. Un esempio delle formulazioni che sono state testate viene presentato nella Tabella 12.

Tabella 12

Esecuzione	Conc. proteica (mg/ml)	Rapporto PS80:Proteina	Concentrazione PS80 (%)	Livello silicone (mg)
1	100	1	0,087	0,8
2	100	2	0,174	0,8

3	160	0	0	0,8
4	160	2	0,279	0,4
5	100	0	0	0,4
6	160	2	0,279	0,8
7	100	1	0,087	0,4
8	160	0	0	0,4
9	100	0	0	0
10	100	2	0,174	0
11	160	0	0	0
12	160	2	0,279	0

Alcuni controlli possono essere aggiunti alla serie di formulazioni e testati a pochi punti temporali.

Queste formulazioni sono messe in stabilità a diverse temperature (ad es., 5 °C, 25 °C/60%RH, 40 °C/75% RH) e spinte in punti temporali (ad es., 0 settimane, 1 settimane, 2 settimane, 4 settimane, 8 settimane, 12 settimane, 6 mesi, e 12 mesi) per il controllo. I controlli sono testati a 0 settimane, 12 settimane, 6 mesi e 12 mesi.

I test che sono eseguiti ad ogni tempo di stabilità includono SEC, CEX, Instron, MFI, e quantificazione di silicone. La siringa 1 è testata per Istrone, con il materiale espulso utilizzato per la forza di iniezione, SEC, CEX, misurazioni della forza di iniezione e immagini di microflusso (MFI) e quantificazione del silicone.

ESEMPIO 6

Analisi dei componenti della siringa pre-riempita con formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$

Lo studio ha esaminato come i vari produttori di siringhe, i materiali elastomerici dello stantuffo (stopper) e la quantità di PS80 nella formulazione abbiano influito sulle proprietà meccaniche del sistema e sulla stabilità della formulazione.

È stato previsto un design dell'esperimento testando 3 diversi produttori di siringhe, 2 diversi tipi di materiale dello stantuffo (stopper), e 2 diversi rapporti molari PS80:proteina. Il resto della formulazione è stato mantenuto costante a 170 mg/mL di proteina, 125 mM di arginina, 50 mM di istidina, 25 mM di citrato e un pH di 6,5. La dimensione dell'ago di queste siringhe pre-

riempite era di 27G ½' o 29G ½" a parete sottile. Gli esperimenti eseguiti sono descritti dettagliatamente nella Tabella 15.

I design sperimentale per la parte attiva dello stesso sono presentati nella Tabella 13 mentre le costanti nella Tabella 14. Il design sperimentale è stato creato utilizzando gli input presentati nella Tabella 13.

L'elenco degli esperimenti è presentato nella tabella 10.

Tabella 13. Variabili e livelli DOE con la formulazione attiva

Variabile	Valori		
Rapporto molare PS80: proteina	1,0	1,5	
Produttore siringa	A	B	C
Tipo stantuffo (stopper)	4432	4023 rivestito	

Tabella 14. Costanti per la formulazione attiva

Valore	costante
Concentrazione proteica (mg/mL)	170
Concentrazione arginina (mM)	125
Concentrazione Istidina (mM)	50
Concentrazione citrato (mM)	25
pH	6,5

Tabella 15. Dettagli dell'esperimento

Esecuzione #	Tipo siringa	Stantuffo (stopper)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1,5
7	C	4023	1,5
8	B	4023	1,5

Una formulazione della concentrazione anti- $\alpha 4\beta 7$ è realizzata con polisorbato 80 e diluita a 170 mg/mL. La composizione della formulazione iniziale è presentata nella tabella 16.

Tabella 16. Dettagli del tampone della formulazione iniziale

Proteina (mg/ml)	Isr totale (mM)	Citrato totale (mM)	Arg (mM)	pH
183	50	25	125	6,48

Per la diluizione del materiale alla composizione della formulazione desiderata, vengono prodotte le soluzioni di stoccaggio del PS80 in 25 mM di citrato, 50 mM di istidina, 125 mM di

arginina, pH 6,48.

Tabella 17. Dettagli della soluzione conservata

Eccipienti	Concentrazione
PS 80 (%)	5

Lo schema di diluizione per le formulazioni è spiegato dettagliatamente nella Tabella 18.

Tabella 18. Dettagli della diluizione

formulazione iniziale (uL)	PS80 in tampone di Is/Arg/Citrato (uL)	50 mM istidina, 125 mM Arginina, 25 mM tampone Citrato pH 6,48	Volume totale (uL)
27868,9	890,8	1240,3	30000,0
18579,2	890,8	530,0	20000,0

5 Il composto è eseguito secondo lo schema di diluizione e la formulazione di inizio è pesata mentre le altre soluzioni conservate sono pipettate volumetricamente. Le formulazioni sono filtrate. 0,5 mL di formulazione sono suddivisi in aliquote nel numero necessario di siringhe da 1 mL. Le siringhe sono chiuse dalla macchina sottovuoto di chiusura con una bolla di 2-4 mm. Per ogni punto di tempo, vi è un ago di siringa conservato rivolto verso il basso e uno ai lati. Le siringhe extra sono conservate con l'ago verso il basso.

10 Le siringhe sono testate a 5, 25 e 40 °C alla settimana 2 a un mese. L'analisi analitica (aspetto, Instrone, pH, osmolarità, densità, viscosità, SEC, CEX e Brightwell) viene eseguito inizialmente e poi ancora alla settimana 2 a 25 e 40 °C e a 4 settimane a 25 °C.

ESEMPIO 7

15 Analisi delle chiusure del contenitore sottocutaneo usato nelle siringhe 27G con ago a parete fine pre-riempite con formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$

Il presente studio esamina come i vari modelli di siringa con un ago a parete fine 27 G e i vari produttori di stantuffo (stopper) e i modelli influiscono sulle proprietà meccaniche del sistema e la stabilità della formulazione nel tempo.

20 Il presente studio esamina come la stabilità della formulazione sottocutanea anti- $\alpha 4\beta 7$ in una siringa pre-riempita e le proprietà meccaniche siano influenzate dal produttore della siringa

e dal modello dello stantuffo (stopper) per siringhe con ago 27GTW. I dati generati di questo studio possono determinare i componenti del contenitore/chiusura per la formulazione anti- $\alpha 4\beta 7$ sottocutanea liquida.

il design sperimentale è presentato nella Tabella 19 mentre le costanti nella Tabella 20. Il

5 design sperimentale è stato creato utilizzando gli inserimenti presentati nella Tabella 19.

L'elenco degli esperimenti da eseguire è presentato nella tabella 21.

Tabella 19. Variabili e livelli DOE con la formulazione attiva

Variabile	Valori			
	A	B	C	
Produttore siringa	A	B	C	
Tipo stantuffo (stopper)	4432	4023 rivestito	D	E

Tabella 20. Costanti per la formulazione attiva

Valore	costante
Concentrazione proteica (mg/mL)	160
Concentrazione arginina (mM)	125
Concentrazione Istidina (mM)	50
Concentrazione citrato (mM)	25
PS80 (%)	0,2
pH	6,5

Tabella 21. Dettagli dell'esperimento

Esecuzione #	Siringa	Stantuffo (stopper)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023 rivestito
5	A	D
6	C	4023 rivestito
7	A	4023 rivestito
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

10 Una formulazione anti- $\alpha 4\beta 7$ viene eseguita con polisorbato 80 e diluita a 160 mg/mL. La composizione della formulazione iniziale è presentata nella tabella 22.

Tabella 22. Dettagli tampone della formulazione iniziale

Proteina (mg/ml)	Is totale (mM)	Citrato totale (mM)	Arg (mM)	pH
180	50	25	125	6,3

Per la diluizione del materiale alla composizione della formulazione desiderata, vengono prodotte le soluzioni di stoccaggio del PS80 in 25 mM di citrato, 50 mM di istidina, 125 mM di arginina, pH 6,3.

5

Tabella 23. Dettagli della soluzione conservata

Eccipienti	Concentrazione
PS 80 (%) in tampone is/ Arg/ Citrato pH 6,3	1,68

Lo schema di diluizione per le formulazioni è spiegato dettagliatamente nella Tabella 24.

Tabella 24. Dettagli della diluizione

Formulazione iniziale in tampone is/Arg./Citrato (mL)	PS80 in tampone Is/Arg/Citrato (mL)	Volume totale (mL)
78	10 (1,68%)	88

Il composto è prodotto secondo lo schema di diluizione e la formulazione di inizio è pesata mentre le altre soluzioni conservate sono pipettate volumetricamente. Le formulazioni sono filtrate. 0,5 mL di formulazione sono suddivisi in aliquote nel numero necessario di siringhe da 1 mL. Le siringhe sono chiuse dalla macchina sottovuoto con una bolla di 2-4 mm. Per ogni punto di tempo, vi è un ago di siringa conservato verso il basso (posizione orizzontale).

10

Le siringhe sono testate a 5 °C, 25 °C/60% RH, e 40 °C/75% RH a 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi (opzionale), 12 mesi, 18 mesi e 24 mesi.

15

Le formulazioni liquide sono testate analiticamente (concentrazione, osmolarità, pH, MFI, SEC, e/o CEX) a 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 mesi (5°C); 1, 3, 6, 9, 12, 18, mesi (25°C); 1, 3, 6, 9, 12, mesi(40°C); e 1, 3, mesi (40°C).

ESEMPIO 8

Analisi della formulazione sottocutanea dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in siringhe in plastica preriempite

20

Il presente studio è stato previsto per studiare l'uso delle siringhe in plastica come sistema

container/chiusura per una formulazione sottocutanea anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Viene studiata la stabilità di una formulazione sottocutanea dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in siringhe in plastica pre-riempite. I dati generati di questo studio aiutano a giudicare l'applicabilità dell'uso di una siringa in plastica per una formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ sottocutanea liquida.

5 Vengono preparati test di stabilità come evidenziato di seguito. I test di stabilità vengono condotti in condizioni di immagazzinamento a 40 °C/ Umidità relativa al 75%, a 25 °C/Umidità relativa al 60%, e 5 °C.

Sono testati due tipi di siringhe in plastica e una siringa di vetro (Control) nella tabella 25 con la formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ sottocutanea presentata nella Tabella 26. La tabella

10 27 mostra i dettagli di ogni serie di campioni da testare nell'esperimento.

Tabella 25. Siringhe in plastica

		Campione #1 Siringa in plastica 1	Campione #2 Siringa in plastica 2	Campione #3 Siringa di vetro (controllo)
Siringa	Riventitore	F	B	A
	Componenti	Siringa: polimero Ago: 27G(TW) Guaina dell'ago rigida	Siringa: polimero Ago: 26G(RW) Cappuccio della punta Luer lock	Siringa: vetro Ago: 27G(TW) Guaina dell'ago rigida
	Rivestimento in silicone	Assente	Non assente	Non assente
Stantuffo	Rivenditore	F	F	←
	Descrizione del prodotto	1 mL di materiale A	1 mL di materiale B	←
	Rivestimento in silicone	No	Si	←

Tabella 26. formulazione sottocutanea dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (pH 6.5)

Composizione	componente
anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$	160 mg/mL
Arginina	125 mM
Istidina	50 mM
Citrato	25 mM
PS80 (Rapporto molare con la proteina)	1,5 (0,2w/v%)

Tabella 27. Dettagli del campione

Campione #	Rivenditore siringa in plastica	Proteina (MW:150000)		Arg (MW:174.20) (mM)	Is (MW:155.15) (mM)	Citrato (MW:210.14) (mM)	PS 80 (MW:1309.68)		pH
		(mg/ml)	(mM)				(w/v%)	Rapporto molare della proteina	
1	F	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
2	B	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
3 (Cont.)	A	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5

In questo studio sono state utilizzate le formulazioni dell' anti- $\alpha 4\beta 7$ sottocutanee liquide preparate in precedenza. Le formulazioni sono state filtrate. Campionamento della soluzione filtrata per il test di qualità come campione “prima del riempimento” (Aspetto, MFI, DLS). 0,5 mL di formulazione sono stati suddivisi in siringhe in plastica da 1 mL. Le siringhe sono state chiuse dalla macchina per il sottovuoto. Le siringhe sono state poi conservate con l’ago rivolto verso il basso.

Un controllo iniziale viene eseguito per misurare pH, osmolarità, densità, viscosità e concentrazione proteica. Controllo analitico (aspetto, SEC (aggregati, monomero, LMW), CEX (Acido, Principale, Base) forza di spinta, MFI, DLS e/o peso) è eseguito dopo 1 settimana a 40 °C, 2 settimane, 40 °C, 1 mese, 5, 25 e 40 °C, 3 mesi, 5 e 25 °C, 6 mesi a 5 e 25 °C, 9 mesi a 5 e 25 °C, e 12 mesi a 5 e 25 °C.

I campioni sono stati analizzati a 1 mese, 3 mesi, 6 mesi, 9 mesi e 12 mesi a 5°C e 25°C. I campioni sono presi a 1 settimana, 2 settimane e 1 mese a 40 °C.

Esempio 9:

I campioni sono stati analizzati a livello di aspetto, forza di iniezione, SEC, CEX e immagine micro-flow a 5°C e 25°C a vari punti temporali comprensivi di 0, 1, 3, 6 e 12 mesi. La stabilità della formulazione come misurata da SEC e CEX erano simili a ciò che è stato discusso nell’Esempio 1 e 2. Per l’analisi della forza di iniezione, è stata misurata la forza di spinta (Tabella 28). Un modello statistico ha determinato che il solo fattore determinante che incide sulla forza di spinta era il produttore della siringa in cui A aveva una forza di spinta maggiore di B che era

maggiore di C (Figura 17). Le modifiche nella forza di spinta delle siringa nei 12 mesi a 5°C e 6 mesi a 25°C erano inferiori a 10N ma principalmente a meno di 5N.

Tabella 28

Esecuzione #	Produttore siringa	Dimensione ago	Tipo stantuffo (stopper)	PS80: Rapporto molare della proteina	Forza di spinta iniziale (N)
1	C	27G	D	1	19,2
2	B	27G	D	1	22,9
3	A	29GTW	E	1	25,0
4	C	27G	E	1	18,5
5	B	27G	E	1	22,7
6	A	29GTW	E	1,5	28,8
7	C	27G	E	1,5	18,7
8	B	27G	E	1,5	23,7

ESEMPIO 10

5 Analisi dei componenti della siringa pre-riempita usata nelle siringhe 27G con ago a parete fine con formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$

Il presente studio esamina come i vari produttori di siringhe con un ago a parete fine 27 G e i vari produttori di stantuffo (stopper) oltre che i modelli elastomerici influiscono sulle proprietà meccaniche del sistema di siringa pre-riempita e sulla stabilità della formulazione nel tempo.

Tre diversi produttori di siringhe e 4 diversi modelli di stantuffo (stopper) sono stati testati con aghi a parete sottile da 27G 1/2" e una formulazione a base di 160 mg/mL di proteina, 125 mM di arginina, 50 mM istidina, 25 mM citrato, 0,2% PS80, a un pH di 6.5. Tutti i campioni creati e analizzati sono presentati nella Tabella 29.

15

Tabella 29. Dettagli dell'esperimento

Esecuzione #	Siringa	Stantuffo (stopper)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E

7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

I campioni sono stati analizzati per aspetto, forza di iniezione, SEC, CEX e immagine micro-flow a 5 °C , 25 °C e 40 °C a vari punti temporali comprensivi di 0, 1, 3, 6 e 12 mesi. La stabilità della formulazione come misurata da SEC e CEX erano simili a ciò che è stato discusso nell'Esempio 1 e 2. Per il controllo della forza di iniezione è stata misurata la forza di sblocco e la forza di spinta. I risultati al tempo iniziale sono presentati nella Tabella 30.

Tabella 30

Esecuzione #	Produttore siringa	Tipo stantuffo (stopper)	forza di spinta iniziale (N)	forza di sblocco iniziale (N)	forza di sblocco a 12 mesi a 5°C (N)	forza di sblocco a 12 mesi a 25 °C (N)	forza di sblocco a 12 mesi a 40 °C (N)
1	B	F	12,0	4,0	3,8	12,9	28,7
2	B	D	11,9	3,9	4,6	12,4	36,0
3	A	D	7,0	4,0	6,5	5,1	6,4
4	B	E	13,9	4,5	4,7	5,8	17,2
5	A	F	5,7	4,1	3,0	17,5	23,9
6	C	E	6,7	4,1	5,0	5,8	11,4
7	A	E	7,9	7,6	4,3	10,4	6,1
8	C	F	6,3	4,2	4,1	15,0	33,3
9	C	D	5,9	4,8	3,9	4,4	10,0
10	C	G	7,2	4,6	6,1	9,8	13,0

Un modello statistico ha mostrato che i produttori di siringhe A e C erano simili con forze di spinta inferiori rispetto al produttore B, mentre lo stantuffo (stopper) E presentava una forza di spinta maggiore rispetto all'altro stantuffo (stopper).

10 In genere le forze iniziali di sblocco erano simili tra tutti i campioni testati.

Nei 12 mesi a 5 °C, 25 °C, e 40 °C, le forze di spinta non si modificavano significativamente. Comunque, la forza di sblocco per le siringhe con stantuffo (stopper) F è aumentata nei 12 mesi a 25 °C e 40 °C.

ESEMPIO 11

15 Analisi della formulazione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ nelle siringhe in plastica pre-riempite

Questo studio determina come i livelli variabili di concentrazione proteica,

concentrazione di polisorbato 80, concentrazione di citrato e pH influiscano sulle formulazioni anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ in una siringa pre-riempita.

Parte design sperimentale è creato in JMP con un fattore di frazione di due livelli di concentrazione proteica (da 60 a 160 mg/mL), pH (6.0 to 6.3), rapporto molare polisorbato 80:proteina ,(da 0,723 a 1,5), e concentrazione di citrato (da 0 a 25 mM). Queste formulazioni hanno un valore costante di concentrazione di istidina (50 mM) e arginina (125 mM) (Formulazioni 1-8). Sono aggiunte le variazioni di queste formulazioni con 25 mM di istidina (Formulazioni 9-10).

Una serie aggiuntiva di formulazioni è stata sviluppata per esplorare le formulazioni senza istidina presenti e solo citrato che agisce come tampone (Formulazioni 11-16). I livelli di input per tutte le formulazioni esplorate sono presentati nella tabella 31. Le costanti utilizzate per tutte le formulazioni sono presentate nella Tabella 32.

Tabella 31. Variabili e livelli DOE

Variabile	Valori nominali	
	Basso	Alto
Concentrazione proteica (mg/mL)	60	160
pH	6,0	6,3
PS80: Rapporto molare della proteina	0,723	1,5
Concentrazione citrato (mM)	0	40
Concentrazione Istidina (mM)	0	50

Tabella 32. Costanti

Valore	costante
Concentrazione arginina (mM)	125

La tabella 33 elenca la formulazione da testare.

Tabella 33. Dettagli della formulazione

formulazione #	Proteina (mg/ml)	Proteina (mM)	Is (mM)	Arg (mM)	PS 80 %	pH	Rapporto molare PS80:proteina	Antiossidante	Concentrazione antiossidante (mM)
1	60	0,400	50	125	0,038	6,3	0,723	Acido citrico	25
2	60	0,400	50	125	0,079	6,3	1,5	Acido citrico	0
3	157	1,047	50	125	0,206	6,3	1,5	Acido citrico	25
4	160	1,067	50	125	0,101	6,3	0,723	Acido citrico	0
5	60	0,400	50	125	0,079	6,0	1,5	Acido citrico	25
6	110	0,733	50	125	0,069	6,0	0,723	Acido citrico	0
7	160	1,067	50	125	0,101	6,0	0,723	Acido citrico	25
8	160	1,067	50	125	0,210	6,0	1,5	Acido citrico	0
9	160	1,067	25	125	0,101	6,0	0,723	Acido citrico	25
10	160	1,067	25	125	0,140	6,0	1	Acido citrico	25

11	160	1,067	0	125	0,101	6,3	0,723	Acido citrico	40
12	160	1,067	0	125	0,210	6,3	1,5	Acido citrico	40
13	60	0,400	0	125	0,079	6,3	1,5	Acido citrico	40
14	160	1,067	0	125	0,210	6,1	1,5	Acido citrico	40
15	160	1,067	0	125	0,210	6,6	1,5	Acido citrico	40
16*	160	1,067	0	125	0,140	6,3	1	Acido citrico	40

Ogni formulazione è generata da una formulazione iniziale contenente anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ e diluita con varie soluzioni eccipienti. Per raggiungere volumi di diluizione ragionevoli, la soluzione dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ usata è presentata nella Tabella 34. Vengono eseguite due diverse operazioni TFF per ottenere le formulazioni TFF 1 e 2. Una parte del TFF1 è usata in una dialisi per raggiungere la formulazione con etichetta "Dialisi".

Tabella 34. Dettagli tampone della formulazione iniziale

formulazione iniziale	Proteina (mg/ml)	Is totale (mM)	Citrato totale (mM)	Arg (mM)	pH
TFF 1	192,1	50	0	125	6,1
TFF 2	206,1	0	40	125	6,3
Dialisi	169,65	25	25	125	6,0

Per la diluizione del materiale alla composizione della formulazione desiderata, le soluzioni di stoccaggio di ogni eccipiente in acqua sono prodotte alle concentrazioni specificate dalla tabella 35.

10

Tabella 35. Dettagli della soluzione conservata

Eccipienti	Concentrazione
Istidina (mM)	220
Idrocloruro di arginina (mM)	625
PS 80 (%)	2,5
Idrocloruro di istidina (mM)	600
Acido citrico (mM) (pH 6.3)	1500
Acido citrico (mM) (pH 6.0)	1500
Citrato (mM)	600
Citrato di sodio (mM)	800

Lo schema di diluizione per le formulazioni è spiegato dettagliatamente nelle Tabelle 36 e 37.

Tabella 36. Dettagli della diluizione

	formulazione iniziale (uL)	formulazione iniziale (mg)	Is (uL)	Is*HCl (uL)	Arg (uL)	Soluzione di citrato (uL)	PS80 (uL)	WFI (uL)
1	4685,06	4961,01	1612,2	268,4	2063,0	250	227,3	5894,0
2	4685,06	4961,01	1612,2	268,4	2063,0	0	471,6	5899,7

3	12259,2	12981,31	724,1	0,0	548,2	250,0	1234,0	0,0
4	12493,49	13229,36	696,7	0,0	501,3	0	606,2	702,4
5	4685,06	4961,01	1002,8	491,9	2063,0	250	471,6	6035,7
6	8589,28	9095,18	545,0	334,4	1282,1	0	416,7	3832,4
7	12493,49	13229,36	87,2	176,9	501,3	250	606,2	884,9
8	12493,49	13229,36	87,2	176,9	501,3	0	1257,6	483,5
9	12260,8	12941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	525,3	0,0
10	12260,8	12941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	726,6	0,0

Tabella 37. Dettagli della diluizione

	formulazione iniziale (uL)	formulazione iniziale (mg)	Citrato (uL)	NaCitrato (uL)	Arg (uL)	PS80 (uL)	WFI (uL)
11	9315,87	9944,69	8,3	128,0	536,8	484,9	1526,1
12	9315,87	9944,69	8,3	128,0	536,8	1006,1	1005,0
13	3493,45	3729,26	30,5	402,5	1701,3	377,3	5995,0
14	5822,42	6215,43	22,0	67,4	335,5	628,8	623,9
15	5822,42	6215,43	0,0	300,0	335,5	628,8	413,3
16	5822,42	6215,43	5,2	80,0	335,5	419,2	837,7

Il composto è eseguito secondo lo schema di diluizione e la formulazione di inizio viene pesata mentre le altre soluzioni conservate sono pipettate volumetricamente. Le formulazioni sono filtrate. 0,5 mL di formulazione sono suddivisi in aliquote nel numero necessario di siringhe da 1 mL. Le siringhe sono state chiuse dalla macchina per il sottovuoto. Le siringhe sono state conservate con l'ago rivolto verso il basso.

Le formulazioni liquide sono state testate analiticamente (aspetto, pH, osmolarità, densità, DLS, SEC, CEX, e/o Brightwell) inizialmente, e a 1 settimana, 40 °C, 2 settimane, 40 °C, 1 mese 25 e 40 °C, 2 mesi, 5 e 25 °C, 3 mesi, 5 e 25 °C, 6 mesi, 5 e 25 °C, 9 mesi, 5 e 25 °C, e 12 mesi, 5 e 25 °C. Sono anche state realizzate alcune formulazioni specifiche secondo la Tabella 38.

Tabella 38: formulazione specifica

formulazione	Temperatura	1 settimana	2 settimana	1 mese	2 mese	3 mese	6 mese	9 mese	12 mese	Extra
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4

formulazione	Temperatura	1 settimana	2 settimana	1 mese	2 mese	3 mese	6 mese	9 mese	12 mese	Extra
13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

ESEMPIO 12

È stata testata una formulazione che contiene 160 mg/mL di proteina, 50 mM di istidina, 25 mM citrato, 125 mM arginina pH 6,5 per determinare la stabilità in una siringa di vetro o due diverse siringhe in plastica COP. A 5 °C e 25 °C dopo 12 mesi, la quantità di aggregati e monomero erano paragonabili tra le siringhe in plastica e di vetro.

Tabella 39

Formulazione #	Rapporto molare PS80:proteina	Materiale della siringa	Cambiamento negli aggregati SEC dopo 12 mesi a 5°C (%)	Cambiamento negli aggregati SEC dopo 12 mesi a 25 °C (%)	Somma dei monomeri dopo 12 mesi a 5 °C (%)	Somma dei monomeri dopo 12 mesi a 25 °C (%)

1	1,5	Produttore 1 COP	0,2	1,0	98,3	96,8
2	1,5	Produttore 2 COP	0,2	1,6	98,3	96,9
3	1,5	Vetro	0,2	1,4	98,4	96,8
4	1	Vetro	0,2	1,6	98,3	96,8

Esempio 13: Biodisponibilità del vedolizumab somministrato per iniezione sottocutanea e intramuscolo (esempio di riferimento)

È stato completato uno studio di fase 1 sulla biodisponibilità del vedolizumab somministrato con iniezione sottocutanea e intramuscolo in soggetti maschili in salute. Nello studio sono stati coinvolti 42 uomini in buona salute. I soggetti erano divisi in tre gruppi (somministrazione sottocutanea, intramuscolo e endovenosa) di 14 soggetti ognuno. In prima giornata ai soggetti sono stati somministrati 180 mg di vedolizumab. La dose era ricostituita da una formulazione liofilizzata di anticorpo 60 mg/ml in 50 mM di istidina, 125 mM di arginina, polisorbato 80 allo 0,06%, saccarosio al 10% a pH 6,3. Per i soggetti con somministrazione intramuscolo e sottocutanea, la dose era divisa in due iniezioni di 1,5 ml ognuna. Il sangue è stato campionato per determinare la concentrazione di vedolizumab ed è stata determinata la biodisponibilità del vedolizumab in ogni serie di soggetti.

Non stati riportati effetti collaterali gravi o infezioni significative, anomalie clinicamente significative, liste di controllo RAMP oggettive/soggettive positive o esiti ECG clinicamente significativi.

Sono stati completati il modelling e la simulazione PK/PD per determinare la dose e i regimi di dosi extravascolari che risultano in esposizioni simili quali le dosi per endovena per mantenere tale concentrazione sierica in tutti i livelli.

Il profilo di assorbimento (FIG. 18) mostrava che le concentrazioni delle dosi intramuscolo e sottocutanee generalmente erano sovrapposte. Non esistono differenze evidenti nei profili di assorbimento tra queste vie di somministrazione. La biodisponibilità assoluta di vedolizumab in seguito all'iniezione SC (sottocutanea) era di circa il 75% e a seguito

dell'iniezione IM (intramuscolo) era di circa 80%.

Esempio 14. Modellare i regimi posologici sottocutanei

Sono stati completati il modelling e la simulazione PK/DSPD per determinare la dose e i regimi posologici extravascolari che risultano in esposizioni simili alle dosi per endovena per
5 mantenere tale concentrazione sierica in tutti i livelli.

Una serie finale di dati combinati (IV, SC e IM) ha mostrato due modelli lineari parametrati in termini di clearance (CL) e volume centrale di distribuzione (V''), volume periferico di distribuzione (V_3), costante dipendente extra-vascolare (KA) e biodisponibilità relativa (a rispetto alla somministrazione endovenosa) delle dosi extravascolari (F). I termini IIV
10 erano inclusi su CL, V_2 e V_3 con peso corporeo come sola covariante che influenza CL e V_3 con effetto allometrico.

L'accettabilità del modello e la prevedibilità è stata dimostrata attraverso valutazioni dei parametri, controlli predittivi visivi e qualità del plot. L'analisi del modello ha identificato il peso corporeo quale indice predittivo del PK del vedolizumab con la variabilità nel PK attribuita tra e
15 nei componenti del soggetto.

Una volta dimostrato che il modello è adeguato per la simulazione, sono state eseguite simulazioni per valutare l'effetto della via di somministrazione (IV, IM o SC) così come l'effetto della frequenza di dosaggio (settimanale, ogni 2 settimane, ogni 4 settimane e ogni 8 settimane) sulle concentrazioni minime steady state. Secondo questi valori e la biodisponibilità relativa del
20 vedolizumab a seguito di somministrazione IM e SC ($F=69,5$), sono state selezionate dosi per raggiungere concentrazioni minime come le dosi IV.

Simulazioni delle dosi modellate e dei regimi per accoppiare l'induzione endovenosa e i regimi di mantenimento. I target erano l'esposizione (area sottesa alla curva concentrazione plasmatica-tempo (AUC)) e la concentrazione minima del farmaco. Le tabelle 40-43 precisano i
25 risultati delle simulazioni.

Tabella 40. Regime di induzione corrispondente a IV AUC nelle settimane 0-6

Via	Dose	Frequenza
IV	300 mg	Settimana 0 & 2
SC	485 mg	Settimana 0 & 2
SC	160 mg	Ogni altro giorno (6 dosi)
SC	>160 mg	Settimanalmente (6 dosi)

Tabella 41. Regime di induzione corrispondente alla concentrazione IV, settimane 0-6

Via	Dose	Frequenza
IV	300 mg	Settimana 0 & 2
SC	>160 mg	Settimana 0 & 2
SC	100 mg	Ogni settimana (6 dosi)
SC	160 mg	Ogni altro giorno (per 2 settimane)

Tabella 42. Regime di mantenimento che corrisponde a 300 mg di dose IV ogni 4 settimane

Frequenza	Via	Dose corrispondente alla concentrazione minima steady state IV 4 settimane	Dose corrispondente a IV AUC 4 settimane
Una volta ogni 4 settimane	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
Una volta ogni 2 settimane	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
Ogni settimana	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

Tabella 43. Regime di mantenimento che corrisponde a 300 mg di dose IV ogni 8 settimane

Frequenza	Via	Dose corrispondente alla concentrazione minima steady state IV 8 settimane	Riscontro dose IV AUC 8 settimane
Una volta ogni 8 settimane	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
Una volta ogni 4 settimane	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
Una volta ogni 2 settimane	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108
Ogni settimana	IV	15	37,5
	IM	22	54
	SC	22	54

Uno studio a dose multipla fase 2a può valutare la sicurezza, tollerabilità e PK steady state del vedolizumab a seguito di dosi multiple di vedolizumab attraverso somministrazione sottocutanea e per valutare la biodisponibilità relativa del regime sottocutaneo a confronto con il regime endovenoso. È possibile valutare lo sviluppo di HAHA e HAHA neutralizzante e l'effetto sul DP delle dosi multiple di vedolizumab a seguito della somministrazione sottocutanea.

I pazienti con colite ulcerosa che hanno un score Mayo di 1-12 e i pazienti con morbo di Crohn che hanno un CDAI maggiore di 150 possono essere inclusi nello studio. I coorti possono ricevere un regime di induzione di vedolizumab (300 mg) somministrato IV alla settimana 0 e 2 seguito da un regime di mantenimento di

10 Vedolizumab (300 mg) somministrato IV ogni 4 settimane alle settimane 6-22

Vedolizumab (300 mg) somministrato IV ogni 8 settimane alle settimane 6-22

Vedolizumab (108 mg) somministrato SC ogni settimana alle settimane 6-22

Vedolizumab (108 mg) somministrato SC ogni 2 settimane alle settimane 6-22

Vedolizumab (165 mg) somministrato SC ogni 3 settimane alle settimane 6-22.

15 I campioni possono essere raccolti prima della posologia al giorno 1 (12 ore), 2, 3, 5, 8, 15, 29, 43, 127, 127 (12 ore), 128, 129, 131, 134, 141, e 155 per valutare PK e PD.

Esempio 16: Esperienza clinica a lungo termine con Vedolizumab per il trattamento di IBD (esempio di riferimento)

È stato completato uno studio open-label di estensione della sicurezza di fase 2 per valutare la farmacocinetica a lungo termine (PK), la farmacodinamica (PD), la sicurezza e l'efficacia del vedolizumab. I pazienti avevano tra i 18 e i 75 anni e avevano partecipato precedentemente ad uno studio di sicurezza PK/PD sulla colite ulcerosa o avevano sintomi IBD da 2 mesi confermata endoscopicamente e/o istopatologicamente e/o radiologicamente durante i 36 mesi di screening.

25 A tutti i pazienti sono stati somministrati per via endovenosa 2 mg/kg o 6 mg/kg di

vedolizumab (5 mg/mL di anticorpo, 20 mM di citrato/acido citrico, 125 mM di cloruro di sodio, polisorbato 80 allo 0,05%, pH 6,0 (conservato a lungo termine -70°C e fino a 3 mo -20°C)) in prima, quindicesima e quarantatreesima giornata, seguiti da una dose ogni 8 settimane per un totale di 78 settimane. I pazienti in esame soffrivano di colite ulcerosa o morbo di Crohn oppure
5 si trattava di pazienti con colite ulcerosa che avevano partecipato ad un trial clinico precedente.

Per valutare i risultati dello studio sono stati utilizzati efficacia/qualità della vita (QfL); score parziale di Mayo (PMS), indice di attività del morbo di Crohn (CDAI) e questionario sulla malattia infiammatoria intestinale (IBDQ).

Risultati PK

10 Le concentrazioni di vedolizumab medie pre-infusione erano proporzionali alla dose e rimanevano costanti e rilevabili durante lo studio.

Risultati PD

I recettori (%ACT-1 + [CD4+CD45RO HIGH] e % MADCAM+ [CD4+CD45RO HIGH] erano quasi completamente inibiti per tutto il periodo di studio a tutti i livelli di dosaggio.

15 Score parziale di Mayo

Il PMS medio di base era maggiore nel caso di pazienti con colite ulcerativa naive al trattamento (5.4) rispetto ai pazienti rollover con colite (2.3). In quarantatreesima giornata, il PMS medio mostrava una diminuzione evidente nei pazienti rollover e naive al trattamento con colite ulcerosa. In centocinquantacinquesima giornata, i punteggi medi dei due gruppi erano
20 simili. Il PMS medio ha continuato a diminuire a partire dalla duecento sessantaseiesima giornata e si è uniformato successivamente.

Indice di attività del morbo di Crohn

Il CDAI medio dei pazienti con MC è diminuito da 294,6 in baseline a 237,7 in quarantatreesima giornata, e ha continuato a diminuire fino alla centocinquantacinquesima
25 giornata (156.1).

IBDQ

I pazienti rollover con colite ulcerosa avevano punteggi medi IBDQ in baseline. In quarantatreesima giornata, i punteggi medi IBDQ erano aumentati in tutti i gruppi di malattia. I punteggi medi IBDQ hanno continuato ad aumentare nel tempo in tutti e 3 i gruppi di malattia, raggiungendo un massimo in centocinquantacinquesima giornata per i pazienti con il morbo di Crohn ed in quattrocentonovantunesima giornata per i pazienti naive al trattamento e rollover con colite ulcerosa.

Proteina C reattiva

I pazienti con colite ulcerosa con morbo di Chron hanno mostrato livelli medi di CRP diminuiti fino in centocinquantacinquesima giornata e poi uniformati. I pazienti naive al trattamento con colite ulcerosa avevano un livello CRP medio inferiore in baseline rispetto ai pazienti rollover con colite ulcerosa (2.28 v. 7.09). I livelli di CRP medi dei pazienti naive al trattamento con colite ulcerosa restavano relativamente costanti in tutti i punti temporali valutati.

Altri risultati sulla sicurezza

Nessuna infezione opportunistica sistematica (incluso PML) è stata riferita durante lo studio. Un paziente è risultato positivo alla viremia JC in un singolo punto temporale sebbene fosse negativo a JVC in tutti gli altri punti. Tre dei 72 pazienti (4%) sono risultati positivi a HAHA (due di questi erano positivi transitoriamente). Lo studio non ha fornito evidenze di tossicità epatica, linfocitosi o linfopenia o qualsiasi modifica dell'istochimica associata al farmaco.

Conclusioni

Il vedolizumab somministrato in dosi da 2,0 o 6,0 mg/kg ogni 8 settimane fino a 78 settimane ha raggiunto le saturazioni del recettore target, è stato associato alle diminuzioni medie durevoli nell'attività della malattia e a migliori score IBDQ. È risultato generalmente sicuro e ben tollerato e ha dimostrato immunogenicità accettabile.

Esempio 17: Induzione e mantenimento della risposta e remissione in pazienti con colite

ulcerosa attiva da moderata a grave (esempio di riferimento)

Un trial singolo comprendente due studi multicentrici, in doppio cieco, randomizzati tesi a valutare l'induzione e la mantenimento della reazione e remissione in pazienti con colite ulcerosa attiva da moderata a grave. Le caratteristiche della malattia in baseline e demografica erano confrontabili per tutti i gruppi di trattamento.

Lo studio di induzione, con somministrazione endovenosa, ha confrontato il placebo con il vedolizumab, a una dose di 300 mg ricostituita da una formulazione liofilizzata di 60 mg/ml di anticorpo in 50 mM di istidina, 125 mM di arginina, polisorbato 80 allo 0,06%, saccarosio al 10% con pH 6,3, endpoint a 6 settimane dopo due dosi di vedolizumab.

Lo studio di mantenimento, utilizzando la stessa formulazione e via di somministrazione dello studio di induzione, ha confrontato il placebo rispetto al vedolizumab dosato ogni quattro settimane e il placebo rispetto al vedolizumab dosato ogni otto settimane. L'endpoint di questo studio era a 52 settimane, analizzando la popolazione responder a induzione.

Sono stati raccolti campioni di sangue per misurare le concentrazioni di vedolizumab durante lo studio. La concentrazione sierosa media del vedolizumab alla fine della fase di induzione variava da 20 a 30 µg/mL. Le concentrazioni minime nel siero di vedolizumab allo steady state dopo 30 min di infusione IV per somministrare 300 mg variavano da 9 a 13 µg/mL per il regime di 8 settimane e da 35 e 40 µg/mL per il regime a 4 settimane. Al termine dell'infusione, le concentrazioni medie di plasma variavano da 98 e 101 µg/mL per il regime di 8 settimane e tra 129 e 137 µg/mL per il regime di 4 settimane.

I riepiloghi delle risposte degli studi di mantenimento e induzione sono precisati nelle tabelle 44-47. Una parte significativamente maggiore di pazienti trattati con vedolizumab ha manifestato reazione clinica, remissione e guarigione della mucosa a 6 settimane rispetto al placebo (Tabella 44). Il 39% della popolazione intent-to-treat della fase di induzione aveva già sperimentato un fallimento dell'anti-TNFα. I tassi di reazione clinica e remissione erano maggiori

nei pazienti è cui è stato somministrato vedolizumab rispetto ai pazienti a cui è stato somministrato placebo tra coloro con fallimento dell'anti-TNF α e coloro senza precedente esposizione a anti-TNF. Nelle analisi preliminari in sesta settimana, i tassi degli effetti collaterali (AE), gli AE gravi e gli eventi avversi con conseguente interruzione dello studio erano superiori nel gruppo placebo rispetto al gruppo vedolizumab. Una parte significativamente maggiore dei pazienti vedolizumab rispetto ai pazienti placebo ha ottenuto una remissione clinica, guarigione della mucosa e remissione senza corticosteroide in cinquantaduesima settimana e una risposta durevole e remissione (Tabella 45). Il 32% della popolazione dello studio di mantenimento ha sperimentato un precedente fallimento dell'anti-TNF α . I tassi di remissione clinica e risposta clinica durevole erano maggiori con vedolizumab rispetto al placebo sia nei pazienti con fallimento del TNF e nei pazienti naive a TNF. Nella popolazione testata a livello di sicurezza (N=895) per le settimane 0-52, i tassi di effetti collaterali (AE), effetti collaterali gravi e infezioni gravi erano simili tra i gruppi di vedolizumab e placebo. Nessun aumento nei tassi di infezione opportunistica o enterica è stato riscontrato nel gruppo vedolizumab.

15 Tabella 44: Risultati dello studio di induzione - endpoint chiave secondari e primari

Endpoint di efficacia	Placebo	Vedolizumab	Differenza/RR	Valore P
Risposta clinica (%)	25,5%	47,1%	21,7%/1,8	<0,0001
Remissione clinica (%)	5,4%	16,9%	11,5%/3,1	0,0010
Guarigione della mucosa (%)	24,8%	40,9	16,1%/1,6	0,0013

Tabella 45: Risultati dello studio di induzione - endpoint chiave secondari e primari

Endpoint di efficacia	Placebo	VDZ Q8	VDZ Q4	Differenza/RR	Valore P
	N=126	N=122	N=125	Q8 vs. Pb Q4 vs. Pb	
Remissione clinica (%)	15,9	41,8	44,8	26,1/2,7 29,1/2,8	<0,0001 <0,0001
Risposta durevole (%)	23,8	56,6	52,0	32,8/2,4 28,5/2,2	<0,0001 <0,0001
Guarigione della mucosa (%)	19,8	51,6	56,0	32,0/2,6 36,3/2,8	<0,0001 <0,0001
Remissione durevole (%)	8,7	20,5	24,0	11,8/2,4 15,3/2,8	0,0090 0,0011
Remissione senza	13,9	31,4	45,2	17,6/2,3	0,0133

corticosteroide (%)	n=72	n=70	N=73	31,4/3,3	<0,0001
---------------------	------	------	------	----------	---------

Tabella 46: Studio di induzione: La remissione e la reazione clinica a 6 settimane in pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Anti-TNF- α e senza esposizione Anti-TNF, popolazione

ITT

Pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Anti-TNF- α (39%)				
Endpoint	Placebo N=63	Vedolizumab N=82	Differenza	CL al 95%
Risposta clinica (%)	20,6	39,0	18,4	3,9, 32,9
Remissione clinica (%)	3,2	9,8	6,6	-9,8, 22,8
Pazienti senza esposizione dell'antagonista Anti-TNF- α (55%)				
	Placebo N=76	Vedolizumab N=130	Differenza	CL al 95%
Risposta clinica (%)	26,3	53,1	26,8	13,7, 39,9
Remissione clinica (%)	6,6	23,1	16,5	2,4, 30,2

Tabella 47: Remissione clinica e reazione clinica durevole a 52 settimane: I pazienti con

5 precedente fallimento dell'antagonista Prior Anti-TNF- α o popolazione ITT senza esposizione

all'antagonista Anti-TNF- α

Pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Anti-TNF- α (32%)					
Endpoint	Placebo N=38	VDZ Q8Wks N=43	VDZ Q4Wks N=40	Differenza a 8 settimane rispetto a placebo a 4 settimane rispetto a Placebo	Cl al 95%
Remissione clinica (%)	5,3	37,2	35,0	31,9 29,7	10,3, 51,4 7,4, 49,4
Risposta clinica durevole (%)	15,8	46,5	42,5	30,7 26,7	11,8, 49,6 7,5, 45,9
Pazienti senza esposizione dell'antagonista Anti-TNF- α (60%)					
	Placebo N=79	VDZ Q8wks N=72	VDZ Q4wks N=73	Differenza a 8 settimane rispetto a placebo a 4 settimane rispetto a Placebo	CL al 95%
Remissione clinica (%)	19,0	45,8	47,9	26,8 29,0	12,4, 41,2 14,6, 43,3
Risposta clinica durevole (%)	26,6	65,3	56,2	38,7 29,6	24,0, 53,4 14,6, 44,6

Esempio 18: Induzione e mantenimento della risposta e remissione in pazienti con morbo

di Crohn da moderato a grave (esempio di riferimento)

Un trial singolo comprendente due studi multicentrici, in doppio cieco, randomizzati tesi a valutare l'induzione ed il mantenimento della reazione e remissione in pazienti con morbo di Crohn attivo moderato o grave. Le caratteristiche della malattia in baseline e demografica erano confrontabili per tutti i gruppi di trattamento.

Lo studio di induzione, utilizzando la somministrazione endovenosa, ha confrontato il placebo con il vedolizumab, a una dose di 300 mg da una formulazione liofilizzata di 60 mg/ml di anticorpo in 50mM di istidina, 125 mM di arginina, polisorbato 80 allo 0,06%, saccarosio al 10% a pH 6,3 con un endpoint a 6 settimane dopo due dosi di vedolizumab.

Lo studio di mantenimento, utilizzando la stessa formulazione e via di somministrazione dello studio di induzione, ha confrontato il placebo con il vedolizumab dosato ogni quattro settimane e il placebo rispetto al il vedolizumab dosato ogni otto settimane. L'endpoint di questo studio era a 52 settimane, analizzando la popolazione responder a induzione.

Sorprendentemente, lo studio ha mostrato che i gruppi Q4 e Q8 avevano ottenuto risultati molto simili. I riepiloghi delle risposte degli studi di mantenimento e induzione sono precisati nelle tabelle 48-51. Una parte significativamente maggiore di pazienti trattati con vedolizumab ha ottenuto remissione clinica e reazione migliorata rispetto al gruppo trattato con placebo (Tabella 48). I tassi di remissione clinica e risposta migliorata erano maggiori nel gruppo trattato con vedolizumab rispetto ai pazienti con placebo tra coloro con insuccesso dell'anti-TNF α e coloro senza precedente esposizione a anti-TNF. I tassi di effetti collaterali (AE), gli effetti collaterali gravi e le infezioni gravi erano simili tra i gruppi vedolizumab e placebo. Nessun aumento nei tassi di infezione opportunistica o enterica è stato riscontrato nel gruppo vedolizumab.

Tabella 48: Risultati dello studio di induzione - endpoint secondari e primari

Endpoint	Placebo N=148	Vedolizumab N=220	Differenza regolata/RR	Valore P
Remissione clinica (%)	6,8%	14,5%	7,8%/2,1	0,0206
Risposta migliorata (%)	25,7%	31,4%	5,7%/1,2	0,2322

CPR medio Variazione (µg/mL)	-3,6 N=147	-2.9 N=220		0,9288
------------------------------	------------	---------------	--	--------

Tabella 49: Risultati dello studio di induzione - endpoint chiave secondari e primari

Endpoint di efficacia	Placebo N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	Agg. Differenza/RR Q8 rispetto a Pb Q4 rispetto a Pb	Valore P
Remissione clinica (%)	21,6	39,0	36,4	17,4/1,8 14,7/1,7	0,0007 0,0042
Risposta migliorata (%)	30,1	43,5	45,5	13,4/1,4 15,3/1,5	0,0132 0,0053
Remissione senza corticosteroide (%)	15,9 N=82	31,7 N=82	28,8 N=80	15,9/2,0 12,9/1,8	0,0154 0,0450
Remissione durevole (%)	14,4	21,4	16,2	7,2/1,5 2,0/1,1	0,1036 0,6413

Tabella 50: La risposta migliorata e la remissione clinica a 6 settimane in pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Anti-TNF-α e senza esposizione all'Anti-TNF, popolazione ITT

Pazienti con precedente fallimento dell'antagonista dell'Anti-TNF-α (48%)				
Endpoint	Placebo N=70	Vedolizumab N=105	Differenza	CL al 95%
Remissione clinica (%)	4,3	10,5	6,2	(-9,1, 21,3)
Risposta migliorata (%)	22,9	23,8	1,0	(-11,8, 13,7)
Pazienti senza esposizione dell'antagonista dell'Anti-TNF-α (50%)				
	Placebo N=76	Vedolizumab N=130109	Differenza	CL al 95%
Remissione clinica (%)	9,2	17,4	8,2	(-1,4, 17,9)
Risposta migliorata (%)	30,3	42,2	11,9	(-1,9, 25,8)

5 Tabella 51: Remissione clinica e risposta migliorata a 52 settimane: I pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Prior Anti-TNF-α o popolazione ITT senza esposizione all'antagonista Anti-TNF-α

Pazienti con precedente fallimento dell'antagonista Anti-TNF-α (51%)					
Endpoint	Placebo N=78	VDZ 8 settimane N=82	VDZ 4 settimane N=77	Differenza Q8 rispetto a placebo Q4 rispetto a placebo	CL al 95%
Remissione	12,8	28,0	27,3	15,2	(3,0, 27,5)

clinica (%)				14,5	(2,0, 26,9)
Risposta migliorata (%)	20,5	29,3	37,7	8,8 17,1	(-4,6, 22,1) (3,1, 31,2)
Pazienti senza esposizione dell'antagonista Anti-TNF- α (45%)					
	Placebo N=71	VDZ 8 settimane N=66	VDZ 4 settimane N=71	Differenza Q8 settimane rispetto a placebo Q4 settimane rispetto a placebo	CL al 95%
Remissione clinica (%)	26,8	51,1	46,5	24,8 19,7	(8,9, 40,6) (4,2, 35,2)
Risposta migliorata (%)	38,0	60,6	53,5	22,6 15,5	(6,3, 38,9) (-0,7, 31,7)

Esempio 19: Induzione della risposta e remissione in pazienti con morbo di Crohn attivo da moderato a grave (esempio di riferimento)

Uno studio multicentrico, in doppio cieco, randomizzato è stato completato per valutare l'effetto di induzione del vedolizumab a dosi di 300 mg (ricostituito da una formulazione di 60 mg/ml anticorpo in 50 mM istidina, 125 mM arginina, polisorbato 80 allo 0,06% saccarosio al 10%, con pH6,3 che è stato liofilizzato), in pazienti con fallimento dell'antagonista TNF α in sesta (dopo 2 dosi --0 e 2 settimane) ed in decima settimana (dopo 3 dosi). Sono stati studiati 416 pazienti, il 75% dei quali avevano già sperimentato un fallimento dell'antagonista TNF α e il 25% dei quali era naive al TNF α . La demografia ed il farmaco IBD erano bilanciate nei gruppi di trattamento. Le caratteristiche di base della malattia erano anche equilibrate nei gruppi di trattamento, tranne per l'attività di base della malattia.

L'endpoint primario indicato per lo studio era la remissione in sesta settimana (%) nella popolazione con fallimento dell'antagonista anti-TNF α . Gli endpoint chiave secondari che sono stati valutati (procedura di controllo sequenziale) erano: remissione in sesta settimana (%) nella popolazione totale, remissione in decima settimana (%) nel caso di fallimento dell'antagonista anti-TNF α e popolazione totale (utilizzando la procedura di Hochberg) e reazione migliorata in sesta settimana (5) nella popolazione che aveva sperimentato un fallimento dell'antagonista anti-

TNF α .

Tabella 52: CDAI della linea di base:

	Placebo	Vedolizumab	Valore P
TNF ITT: Media (Deviazione standard)	306,1 (55,43)	316.1 (52.63)	0,0945
ITT Totale: Media (Deviazione standard)	301,3 (54,97)	313,9 (53,17)	0,0153

Tabella 53: Risultati studio di induzione: Endpoint chiave primari e secondari

Endpoint	TNF ITT (N=315)				Totale ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	Diff (RR)	Valore P	PLA N=207	VDZ N=209	Diff (RR)	Valore P
Remissione primaria sesta settimana	12,1 %	15,2 %	3,0% 1,2	0,4332				
1a remissione secondaria in sesta settimana					12,1%	19,1%	6,9% (1,6)	0,0478
2a remissione secondaria in decima settimana	12,1%	26,6%	14,4% (2,2)	0,0012	13%	28,7%	15,5% (2,2)	<0,0001
Remissione sostenuta (sia in sesta sia in decima settimana)	8,3%	12,0%	3,7% (1,4)	0,2755	8,2%	15,3%	7% (1,9)	0,0249
Risposta migliorata (CDAI100)	22,3%	39,2%	16,9% (1,8)	0,0011				

Tabella 54: Risultati nei pazienti naive all'antagonista anti-TNF α (n= 101, 24% del totale)

	Placebo %	Vedolizumab %	Differenza %	CL al 95%
Remissione sesta settimana	12	31,4	19,1	(3.3, 35.0)
Remissione decima settimana	16	35,3	19,2	(2,4, 35.8)

5 Tabella 55: Risultati studio: Remissione clinica in sesta e decima settimana, gruppo con fallimenti Tx precedenti, totale ITT

Sottogruppo	Variabile	Placebo	VDZ	Diff	CL al 95%
Qualsiasi fallimento anti-TNF	N	156	155		

precedente (75% di ITT)	Remissione sesta settimana (%)	12,8	14,8	2	(-5,7, 9,7)
	Remissione decima settimana (%)	12,8	26,5	13,6	(4,9, 22,3)
Progresso fallimento immunomodulatore ma non fallimento dell'anti-TNF (ITT 21%)	N	45	44		
	Remissione sesta settimana (%)	11,1	31,8	20,7	(-0,5, 39,7)
	Remissione decima settimana (%)	15,6	31,8	16,3	(-1,1, 33,6)
Solo pregresso fallimento con corticosteroidi (ITT 3%)	N	5	9		
	Remissione sesta settimana (%)	0	33,3	33,3	(-23,9, 75,7)
	Remissione decima settimana (%)	0	44,4	44,4	(-13,4, 85,3)

Lo studio ha mostrato che i pazienti con fallimento dell'antagonista TNF α necessitavano di 3 dosi per induzione della remissione. Il tasso di remissione dei pazienti con fallimento dell'antagonista TNF α aumentavano tra la sesta e la decima settimana ma solo per il gruppo trattato con vedolizumab (non il gruppo trattato con placebo). I tassi di remissione per i pazienti naive all'antagonista TNF α non aumentavano sostanzialmente tra la sesta e la decima settimana. Nella popolazione con fallimento dell'antagonista TNF α con un elevato grado di gravità della malattia, il 43% ha risposto ad un antagonista TNF α e il 45% non ha manifestato alcuna risposta.

Esempio 20: Stabilità

Sono state testate varie formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ per determinare la stabilità nel corso di 6-24 mesi a 5°C (Tabelle 6 e 7). Per le formulazioni con un pH pari a 6,0-6,2 si è rilevato un degrado delle specie maggiori quasi del 4% inferiore dopo 6 e a 24 mesi.

Sono state testate varie formulazioni dell'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ per determinare la stabilità tramite SEC fino a 24 mesi (Tabella 4 e 5). Le formulazioni con concentrazione proteica pari a 60 mg/mL, a base di 25 mM di citrato hanno permesso di ottenere un cambiamento negli aggregati pari allo 0,1-2% dopo 2 anni, mentre le formulazioni a base di 160 mg/mL di proteina e 25 mM di citrato hanno permesso di ottenere un aumento degli aggregati pari a circa lo 0,3% su 2 anni. Si è

osservato un aumento dello 0,6-1,1% degli aggregati per le formulazioni a base di 60, 110 o 160 mg/mL di proteina senza citrato. Per ogni formulazione testata a base di citrato, ma non istidina, dopo 12 mesi e 24 mesi, si è osservato un aumento pari a circa lo 0,3-0,4% di aggregati.

5 Esempio 21: Determinazione dell'effetto del vedolizumab sul rapporto CD4:CD8
(esempio di riferimento)

Soggetti in salute dai 18 ai 45 anni sono stati trattati con una dose singola di 450 mg di vedolizumab ricostituito da una formulazione liofilizzata a base di saccarosio al 10% e diluita in un sistema di infusione fisiologica allo 0,9%. Il fluido cerebrospinale (CSF) è stato raccolto con puntura lombare prima (baseline) ed in quinta settimana dopo la dose singola di 450 mg di vedolizumab. Ogni soggetto ha rappresentato anche il suo stesso controllo.

È stato selezionato un punto temporale a cinque settimane secondo uno studio precedente che aveva permesso di dimostrare effetti su rapporto linfocitario CSF CD4+:CD8+ ed una riduzione del numero di lesioni cerebrali sufficientemente ad una sola dose (Stuve et al. Arch Neurol.2006;63:1383-1387; Stuve et al. Ann Neurol. 2006;59:743-747. Miller et al. N Engl J Med. 2003;348(1):15-23); e anche perché in quinta settimana, una dose di 450 mg di vedolizumab è sufficiente a saturare il target ed a fornire concentrazioni sierose che superano i livelli minimi steady state associati con un regime posologico di fase 3 pari a 300 mg ogni 4 settimane.

Per ogni soggetto sono stati ottenuti circa 15 mL di CSF per l'immunofenotipizzazione. I campioni CFS sono stati inclusi per le analisi qualora avessero soddisfatto i seguenti criteri: ≤ 10 RBCs/ μ L per campione (per ridurre la contaminazione periferica del sangue); risultato della cultura di CSF negativo; un numero di linfociti T adeguato in ogni campione citometrico e nessun rilevamento di anticorpi sierosi al vedolizumab.

Le concentrazioni mediane a 5 settimane (34,80 μ g/mL) e sieriche di vedolizumab del singolo soggetto (da 24,9-47,9 μ g/mL) sono risultate superiori alla concentrazione minima steady-state prevista (~ 24 μ g/mL) per il regime posologico di fase 3. È stato osservato un elevato

grado (>90%) del recettore di saturazione $\alpha 4\beta 7$ in quinta settimana come misurato dal MAdCAM-1-Fc, indicando la saturazione del vedolizumab del target al momento della valutazione dell'endpoint.

5 Vedolizumab non è stato rilevato in nessun campione di CFS (limite di rilevamento = 0,125 $\mu\text{g/mL}$).

Effetto su numero e rapporto tra i di linfociti T CD4+ e CD8+

Il Vedolizumab non ha ridotto significativamente il rapporto CD4+:CD8+ (Tabella 56). Nessuno dei soggetti presentava un rapporto post dose CD4+:CD8 + <1 ($p < 0.0001$ (test t unilaterale)). Il Vedolizumab non riduceva significativamente il numero di CD4 o CD8 + linfociti T nel CSF. Inoltre, non sono stati osservati cambiamenti significativi nelle % di linfociti T CD4+ e di CD8+ nel CFS (tabella 57). Inoltre, nessun cambiamento significativo è stato osservato nei globuli bianchi periferici e nei linfociti T di memoria CD4+ e CD8+ (Tabella 58).

Tabella 56: Effetto del trattamento sul rapporto CD4+:CD8+ nel CSF (popolazione valutabile, n=13)

	Baseline	Quinta settimana	Differenza rapporto CD4+:CD8+ †
Rapporto CD4+:CD8+ Intervallo medio (SE)	3,59 (0,273) 1,53-5,67	3,60 (0,265)* 1,42-5,15	0,01 (0,197)
90% CE bilaterale per rapporto	3,00-4,19	3,132, 4,077	
90% CE bilaterale per rapporto			-0,337, 0,363
CI=intervallo di confidence * $p < 0,0001$ (t test unilaterale su un campione per $H_0: \mu < 1$ vs $H_1: \mu \geq 1$). †La differenza è definita in quinta settimane meno il rapporto in baseline			

15 Tabella 57: Effetto del trattamento sulla conta linfocitaria CSF CD4+ e CD8+ nel CSF (popolazione valutabile, n= 13)

	Baseline	Quinta settimana
CD4+ come % di linfociti, media (SD)	75,160 (7,3831)	74,215 (6,3732)
CD8+ come % di linfociti, media (SD)	22,272 (5,4320)	22,007 (6,1624)

Tabella 58: Linfociti T di memoria nel sangue periferico (RO+) Conteggi (popolazione

valutabile, n=13)

	Baseline	Quinta settimana
	Media (SD)	Media (SD)
CD4+CD45RO+	27,85 (4,98)	27,06 (5,02)
CD8+CD45RO+(%)	11,24 (3,40)	10,78 (2,98)

Riepilogo

Il vedolizumab non ha compromesso la conta cellulare CD4+ e CD8+ o il rapporto CD4+:CD8+ nel CSF nei volontari sani una dose singola di 450 mg. In nessuno dei soggetti si è osservata una riduzione della post dose del rapporto CD4+:CD8+ nel CSF inferiore a 1. Il Vedolizumab non è stato rilevato nel CSF. Inoltre, non si è osservato alcun cambiamento nei globuli bianchi totali o nei sottogruppi di CD4+ e CD8 + dei linfociti T di memoria nel sangue periferico. Si è osservata la saturazione del target ($\alpha 4\beta 7$) nel sangue in tutti i soggetti al momento della valutazione dell'endpoint. I livelli ed il rapporto di linfociti CD4+ e CD8+ del CSF sono risultati simili a quelli riferiti in precedenza in letteratura.

Questi risultati sono coerenti con la mancanza di effetto del vedolizumab sulla sull'immunosorveglianza fisiologica del SNC (sistema nervoso centrale) e sull'infiammazione patologica del SNC nelle scimmie.

Tabella 59: Sequenze

SEQ ID N.:	Sequenza presentata	Descrizione
1	FIG. 1	DNA che codifica la catena pesante dell'immunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzata
2	FIG. 1	Sequenza aminoacidica della catena pesante di dell'immunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzata
3	FIG. 2	DNA che codifica la catena leggera dell'immunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzata
4	FIG. 2	Sequenza aminoacidica della catena leggera dell'immunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ umanizzata
5	FIG. 3	Catena leggera umanizzata matura di LDP-02
6	FIG. 4	Regione costante catena leggera kappa umana generica

7	FIG. 4	Regione costante catena leggera kappa murina generica
8	Riferimento a pagina 31 SYWMH	CDR1 della catena pesante dell'anticorpo ACT-1 murino
9	Riferimento a pagina 31 EIDPSESNTNYNQKFKG	CDR2 della catena pesante anticorpo dell'ACT-1 murino
10	Riferimento a pagina 31 GGYDGWDY AidY	CDR3 della catena pesante dell'anticorpo ACT-1 murino
11	Riferimento a pagina 31 RSSQSLAKSYGNTYLS	CDR1 della catena leggera dell'anticorpo ACT-1 murino
12	Riferimento a pagina 31 GISNRFS	CDR2 della catena leggera dell'anticorpo ACT-1 murino
13	Riferimento a pagina 31 LQGTHQPYT	CDR3 della catena leggera dell'anticorpo ACT-1 murino
14	FIG. 7	regione variabile della catena leggera dell'anticorpo Kappa GM607CL umano
15	FIG. 7	Regione variabile della catena pesante dell'anticorpo umano 21/28 CL

RIVENDICAZIONI

1. Formulazione farmaceutica liquida stabile comprendente da almeno circa 60 mg/ml a circa 180 mg/ml di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, tampone di istidina e almeno circa 5 mM di citrato, in cui detta formulazione è una formulazione liquida, e in cui l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una regione variabile di catena pesante comprendente gli amminoacidi da 20 a 140 di SEQ ID NO:2 e comprende una regione variabile di catena leggera comprendente gli amminoacidi da 20 a 131 di SEQ ID NO:4 o gli amminoacidi da 21 a 132 di SEQ ID NO:5.
2. La formulazione farmaceutica liquida stabile della rivendicazione 1, comprendente inoltre un tensioattivo.
3. Formulazione farmaceutica liquida stabile comprendente una miscela di un anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, istidina, arginina e polisorbato 80, in cui detta formulazione è una formulazione liquida, e in cui l'anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una regione variabile di catena pesante comprendente gli amminoacidi da 20 a 140 di SEQ ID NO: 2, e comprende una regione variabile di catena leggera comprendente gli amminoacidi da 20 a 131 di SEQ ID NO: 4 o gli amminoacidi da 21 a 132 di SEQ ID NO: 5.
4. La formulazione farmaceutica liquida stabile di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detta formulazione comprende da circa 60 mg/ml a circa 160 mg/ml di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.
5. La formulazione farmaceutica liquida stabile di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui la formulazione comprende da circa 150 a circa 180 mg/ml di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o circa 165 mg/ml di anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$.
6. La formulazione farmaceutica liquida stabile di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto anticorpo anti- $\alpha 4\beta 7$ è vedolizumab.
7. La formulazione di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per l'uso in un metodo di trattamento della malattia infiammatoria intestinale.
8. La formulazione per l'uso della rivendicazione 7, in cui la formulazione deve essere

somministrata per via sottocutanea.

9. La formulazione per l'uso della rivendicazione 7, in cui la formulazione deve essere auto-somministrata.
10. La formulazione per l'uso della rivendicazione 8, in cui la formulazione deve essere somministrata in una singola iniezione avente un volume compreso tra circa 0,6 ml e circa 1,1 ml.
11. Articolo di produzione comprendente un contenitore, una formulazione farmaceutica liquida stabile di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti e istruzioni per il suo uso.
12. L'articolo di produzione della rivendicazione 11, in cui l'articolo è una siringa pre-riempita.

* * * *

Seguono n° 18 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 23 gennaio 2026

In Fede,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

FIG. 1A

Nuovo LDP02 Heavy DNA -- contiene siti di clonazione (minuscolo), sequenza di Kozak (maiuscolo) e Leader (minuscolo)
 gaattctgagatgatCTCACatgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgccactcccag
 gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GGTGTCCTGCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTTGGG
 TGAGGCAGGCGCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
 TGAGAGTAATACTAATACTACAATCAAAATTCAAGGGACGGCTCACATTGACT
 GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
 AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGTTACGACGGATGGGACTA
 TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCTGGTCAACCGTCAAGCTCAGCCTCACA
 CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGACACAGCGCCCTGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGGTGA
 CCGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCCGGC
 TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTTGTGACAAAACTCAC
 ACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAACTCGGGGGGCCACCCGTCAAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGTGTGGACGTGAGCCACGAAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAAGCGTCCCTCACCCGTCTGCACCA
 GGACTGGCTGAATGGC

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACACAGGTGTACACCCCT
 GCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGACAATGGGC
 AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTC
 CTTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAtaatctagaca

Nuovo LDP02 Proteina pesante (spazio tra VHL, VH e IgG1-FcRmut umano)

MGWSCIILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKGSGYFTFSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEDP
SENTNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGGWDY
AIDYWGQGTLVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

FIG. 1B

FIG. 2

Nuovo LDP02 DNA leggero - contiene siti di clonazione (minuscolo), sequenza di Kozak (maiuscolo) e Leader (minuscolo)
 gaatttcgagatcgaCTCACatgggatggagcigtatcctctcttggtagcaacagctacaggtgccactcegat
 GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCGTGTCACCCCTGGAGAACCAGC
 TTCATCTCTTGCAAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT
 ATTTGTCTTGGTACCCTGCAGAAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
 GGGATTTCCAAACAGATTTTCTGGGGTGCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGTT
 CAGGGACAGATTTCACTCAAGATCTCGGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
 AGTGTAATTA CTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGACAGGGG
 ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
 GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTCTGTGTGTGCCCTGCTGA
 ATA ACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
 CCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
 CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
 CACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCA
 CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagagcagc

Nuovo LDP02 Proteina leggera (spazio tra VKL, VK e C kappa umano)
 MGWSCIIILFLVATATGVHS
 DVVMTQSP^LSLP^VTPGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWY^LLQKPGQSPQLLIYGI
 SNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVVY^CCLQ^GTHQPYTFGGQTKVEI
 K
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV^VCLLN^NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSL^SSLT^LLSKADY^EKHKVYACEVTHQGLSSP^VTKSFNRGEC

FIG. 3

PAIRWISE newMLN02-no sig

LDP-02-no sig.txt

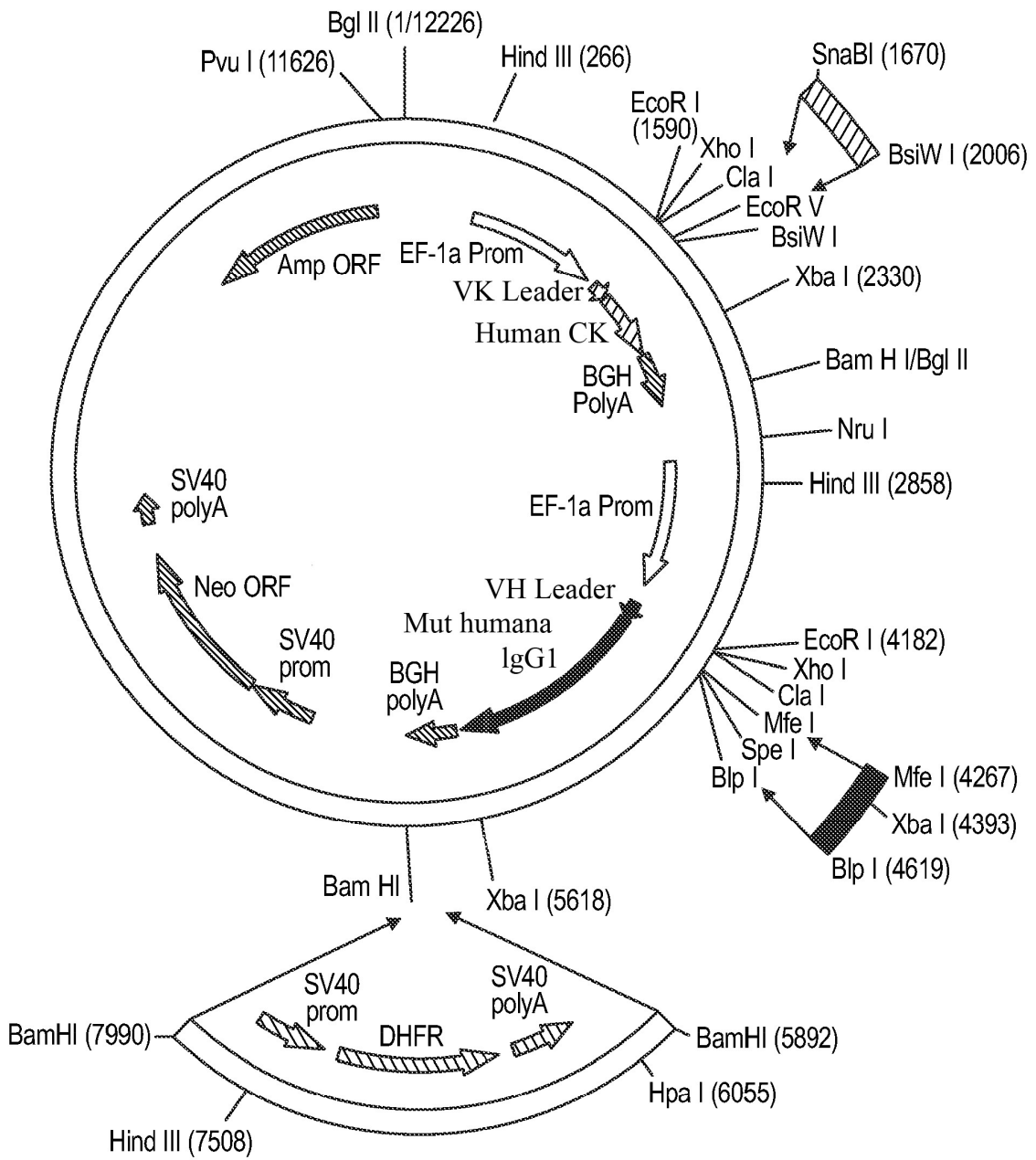
```
A 1 DVVMTQSPFLPVTGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50
  |||
B 1 DVVMTQSPFLPVTGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ 50

51 LLIYGISNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYCLQGTHQP 100
  |||
51 LLIYGISNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYCLQGTHQP 100

101 YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAK 150
  |||
101 YTFGQGTKVEIKRADAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAK 150

151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTSKADYEKHKVYACE 200
  |||
151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSSITLTSKADYEKHKVYACE 200

201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
  |||
201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC 219
```

pLKTOK38D

FIG. 5

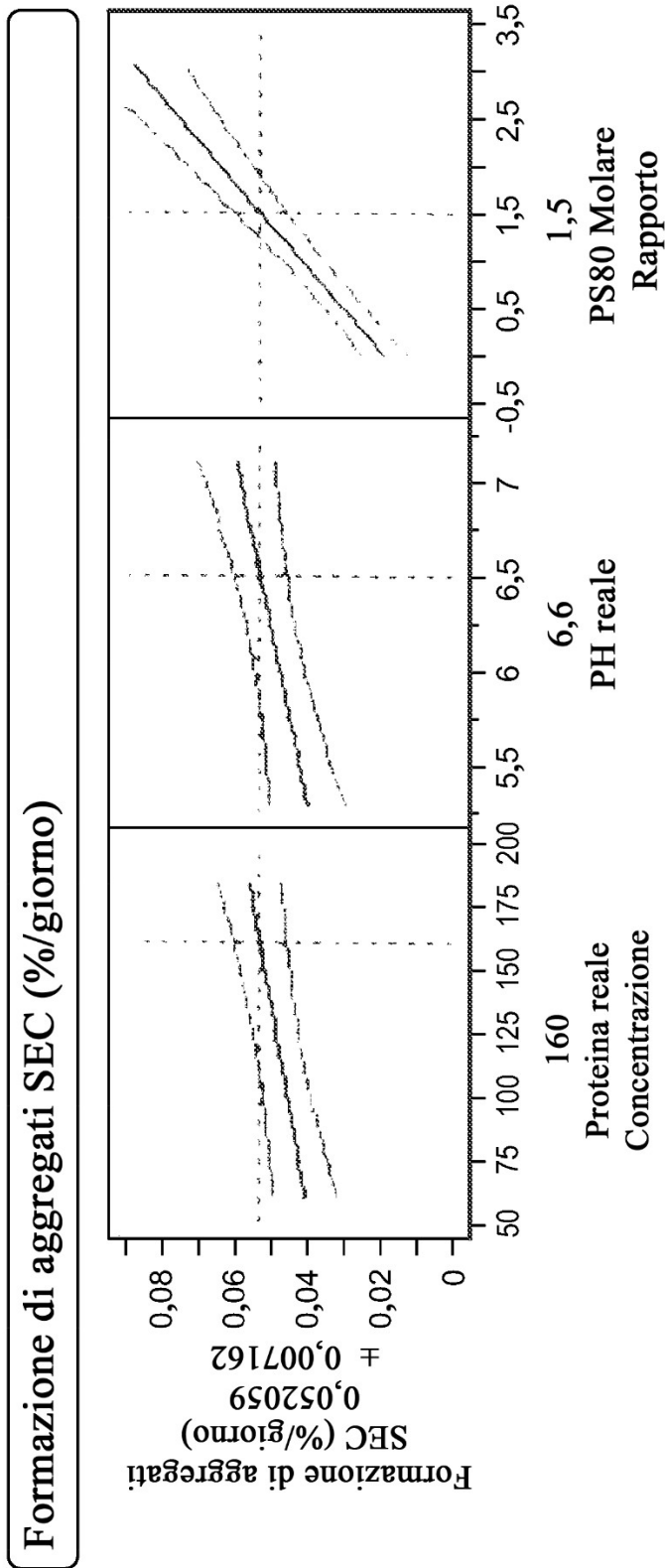


FIG. 6

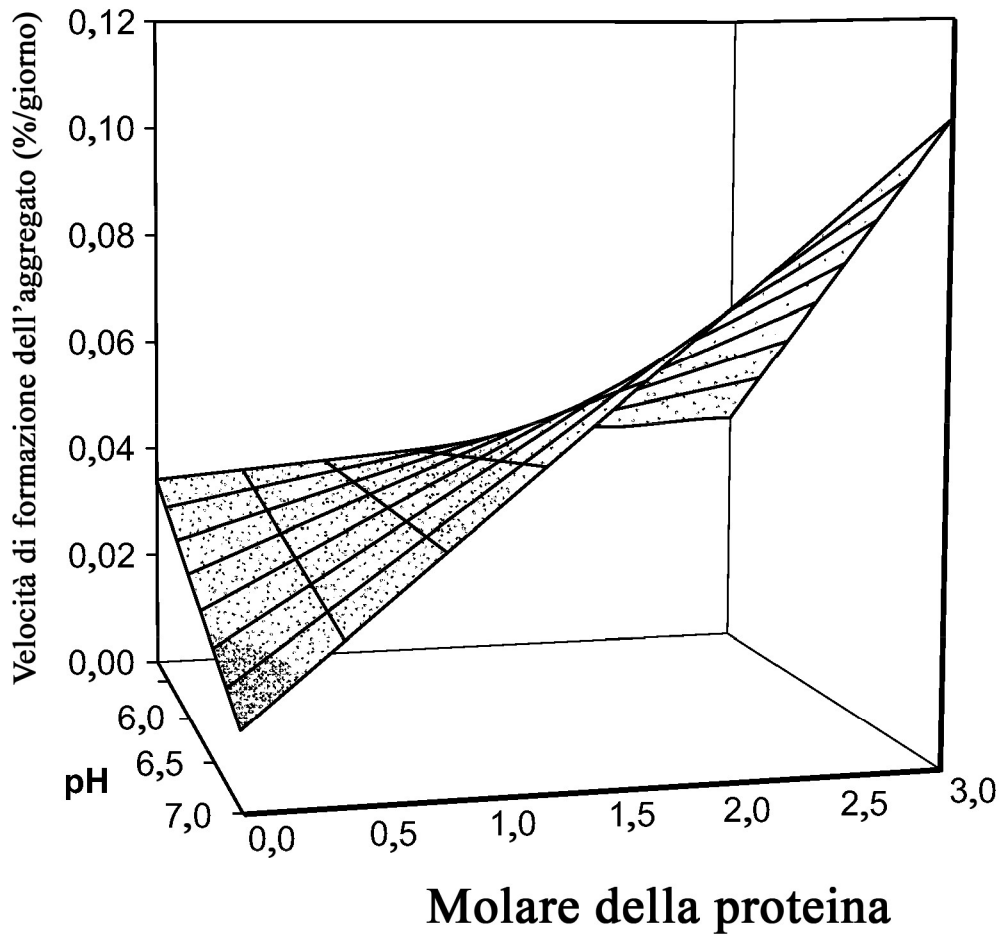
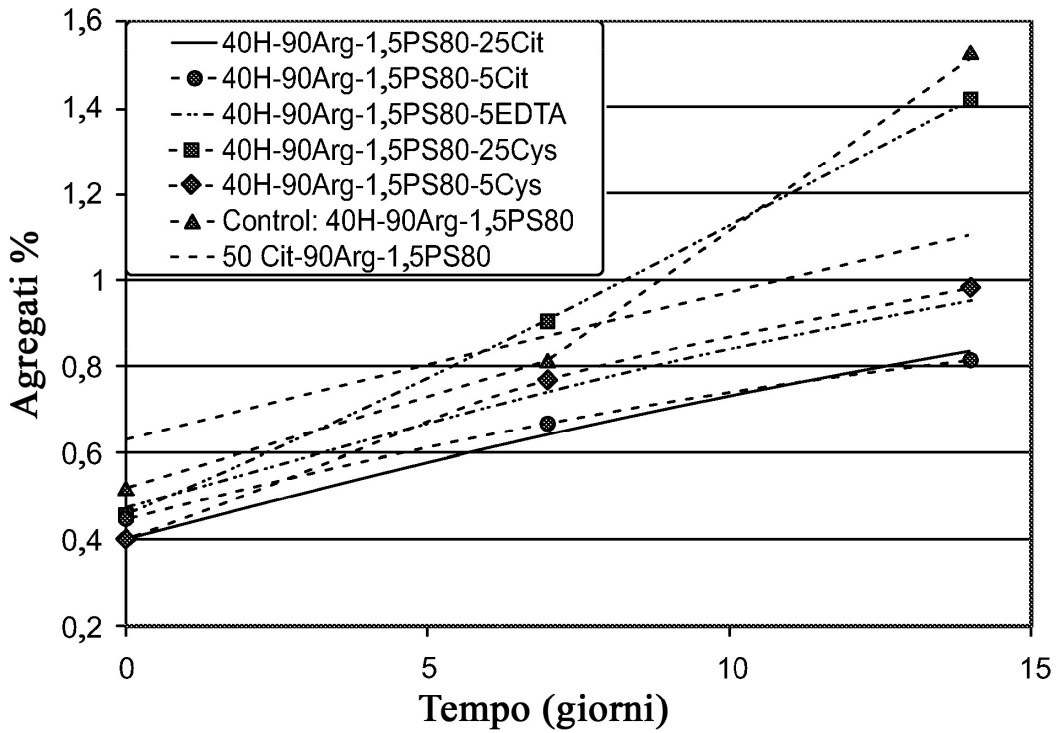


FIG. 7

FIG. 8



Profilo di predizione

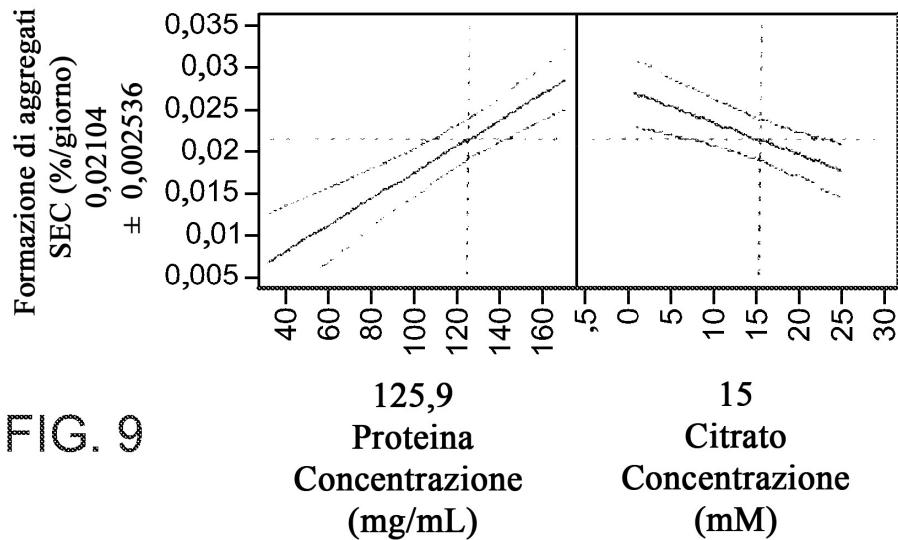


FIG. 9

FIG. 10

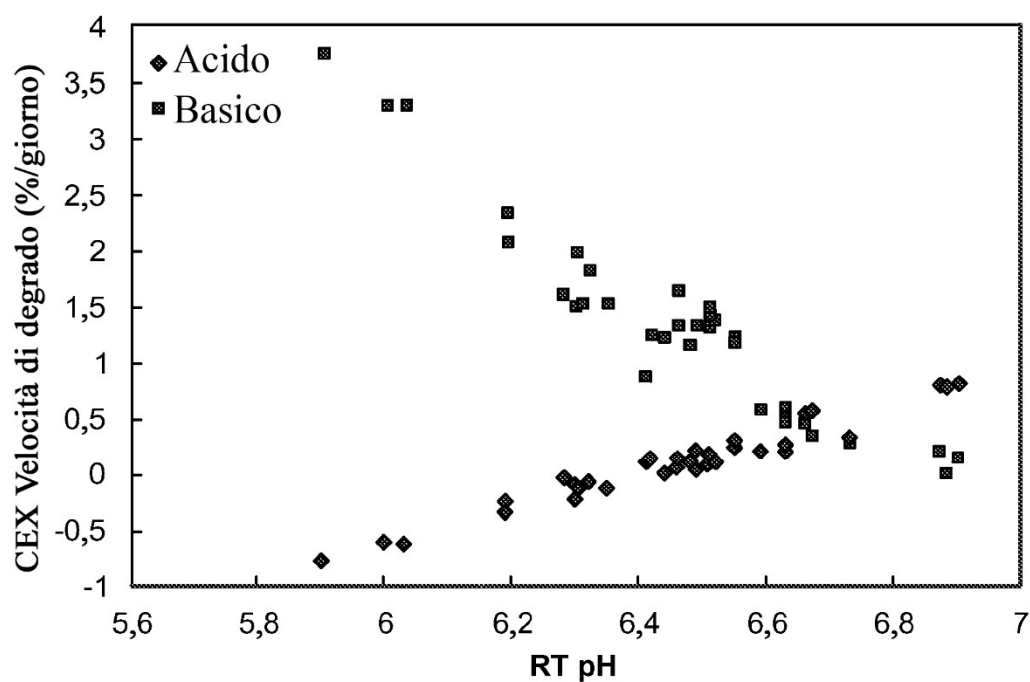


FIG. 11

25 mM Citrato, 50 mM istidina. 125 mM Arginina

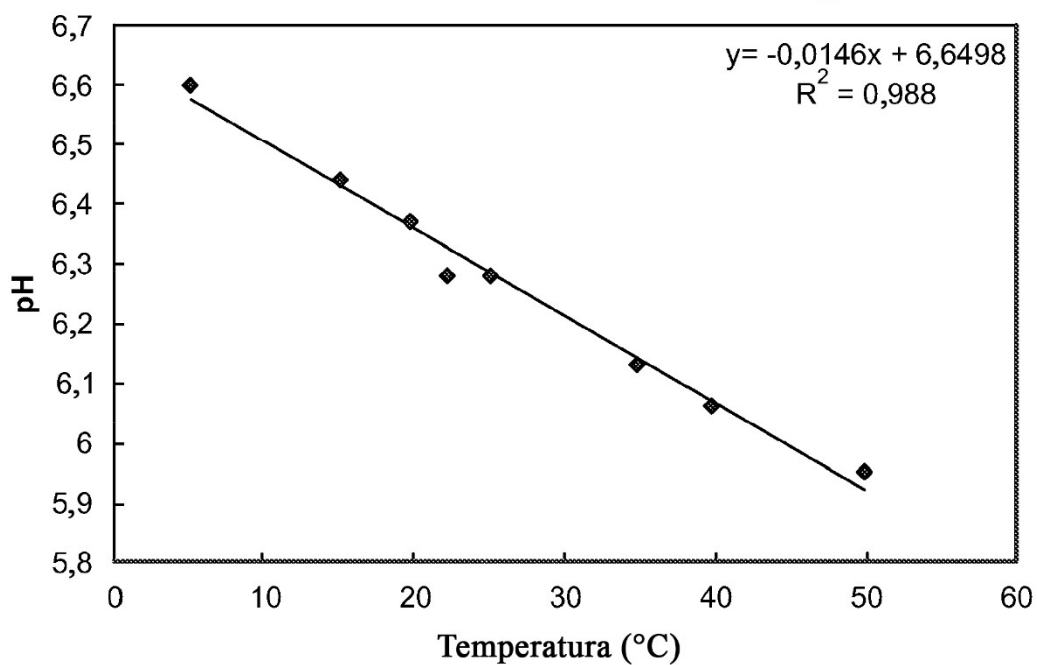


FIG. 12

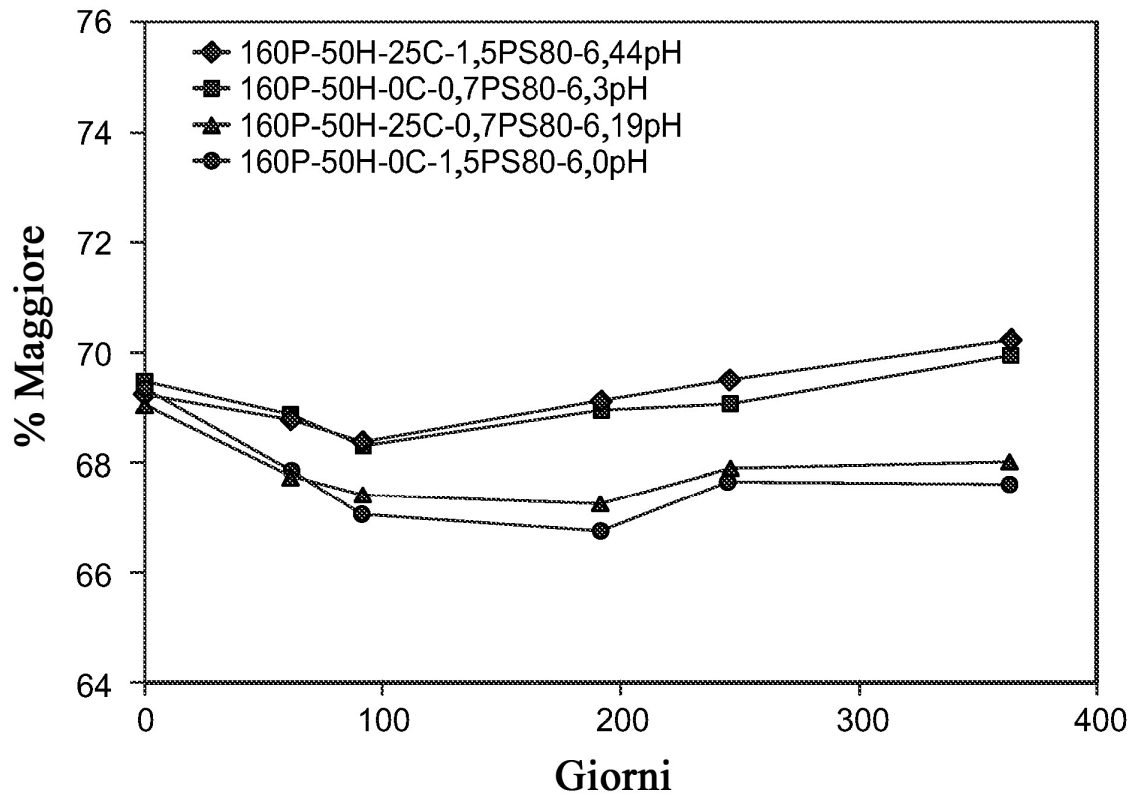


FIG. 13

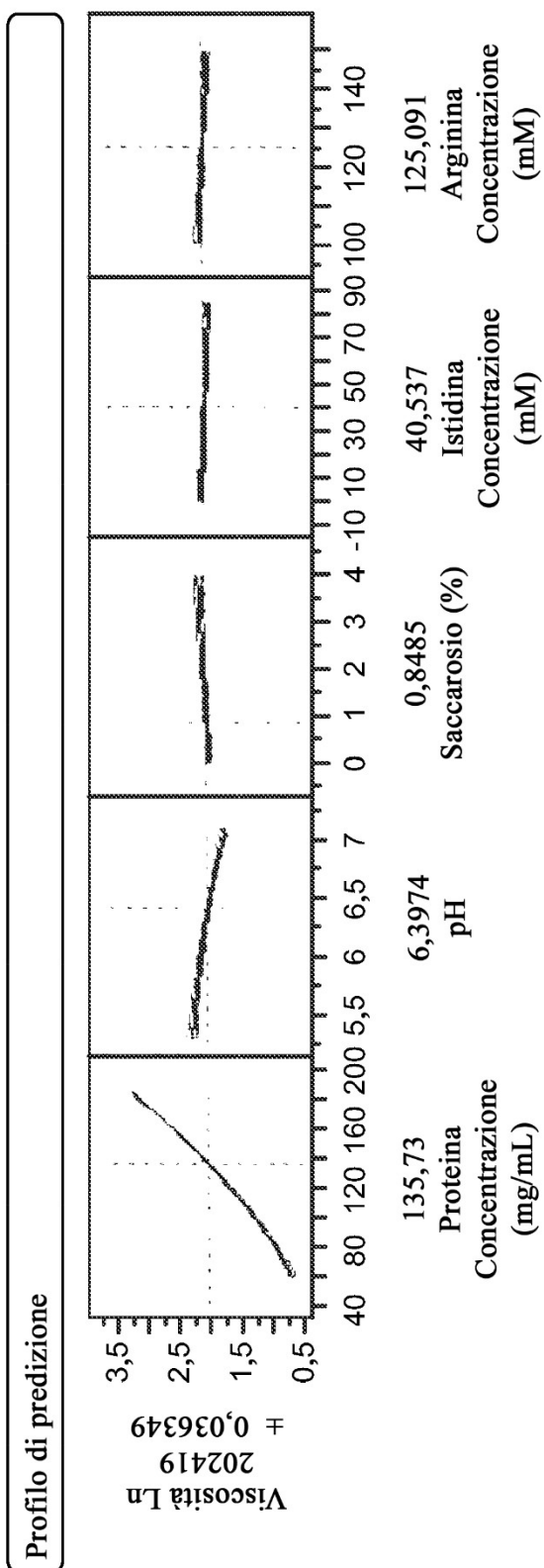


FIG. 14A

**GM607'Cl regione variable
Catena leggera anticorpo Kappa**

SEQ ID NO: 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

FIG. 15

Componenti di un prodotto proteico in una siringa pre-riempita

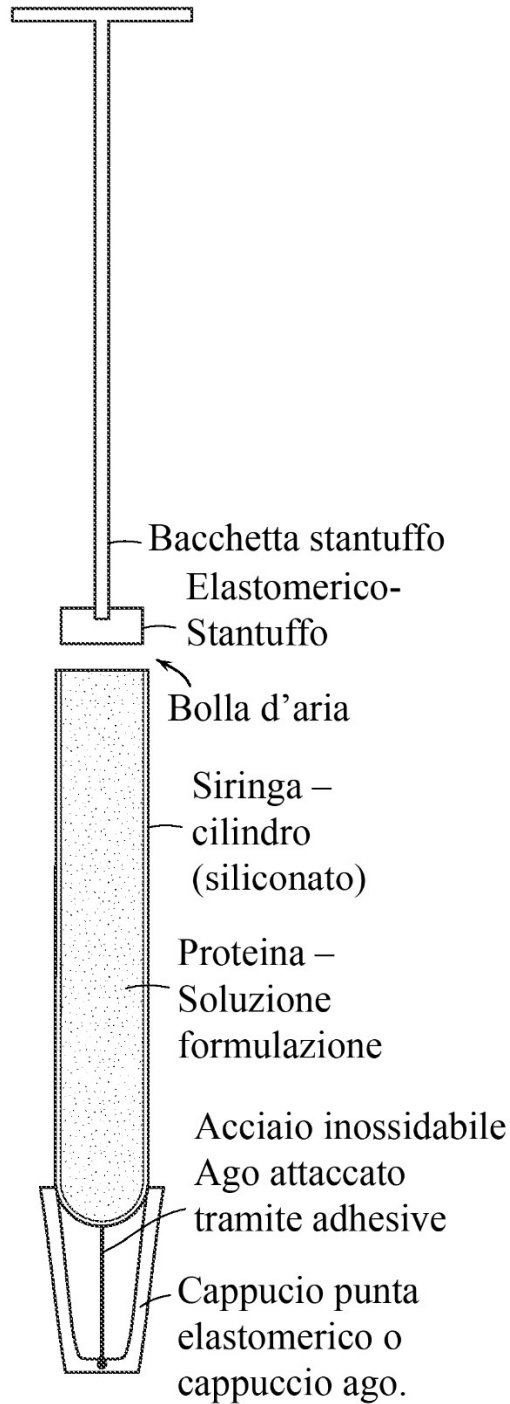


FIG. 16

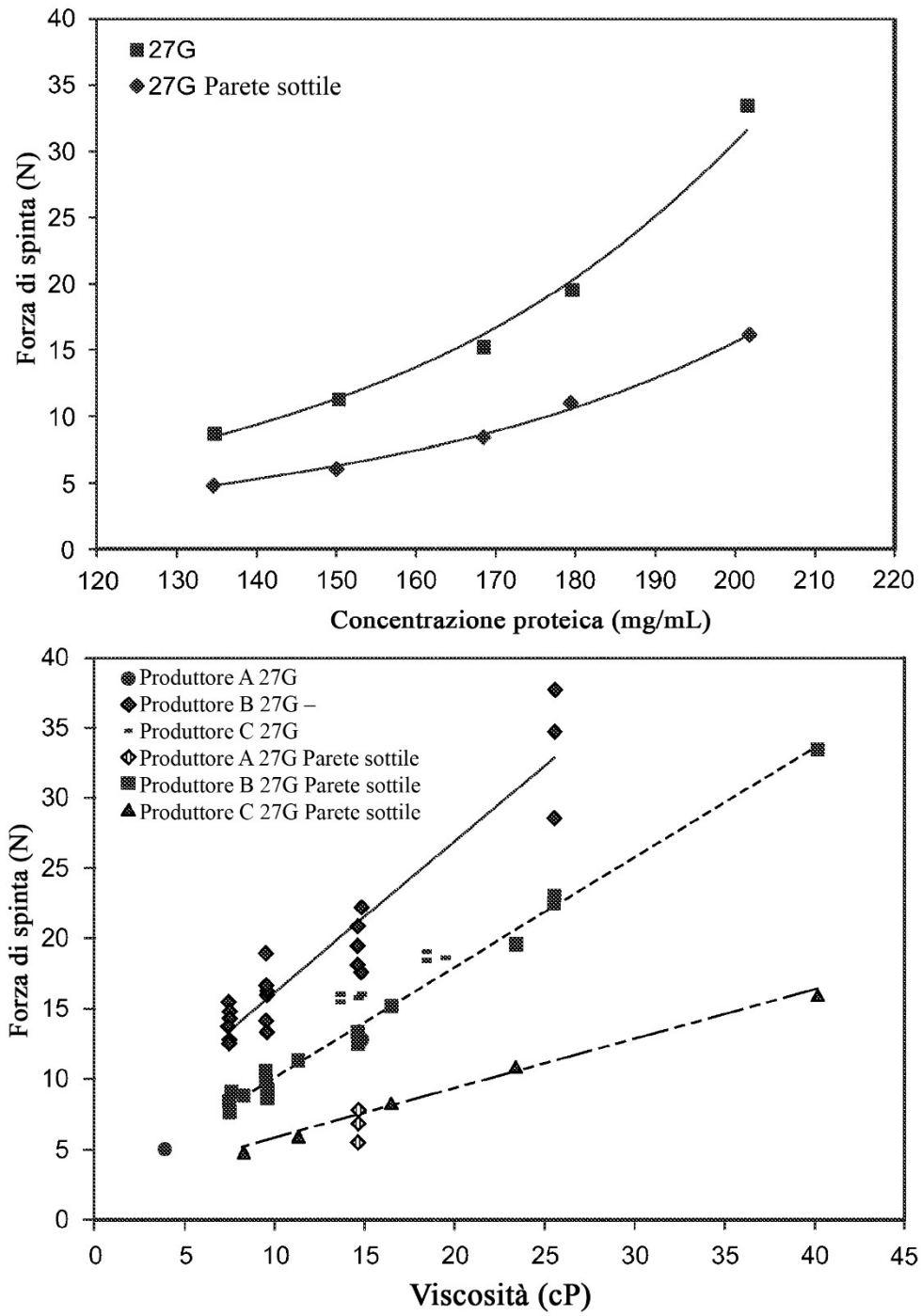


FIG. 17A

Profilo di predizione: Forza di spinta iniziale

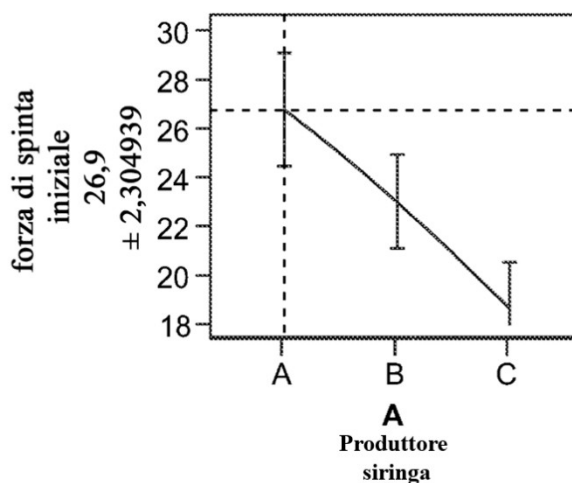


FIG. 17B

Profilo di predizione: Forza di spinta iniziale

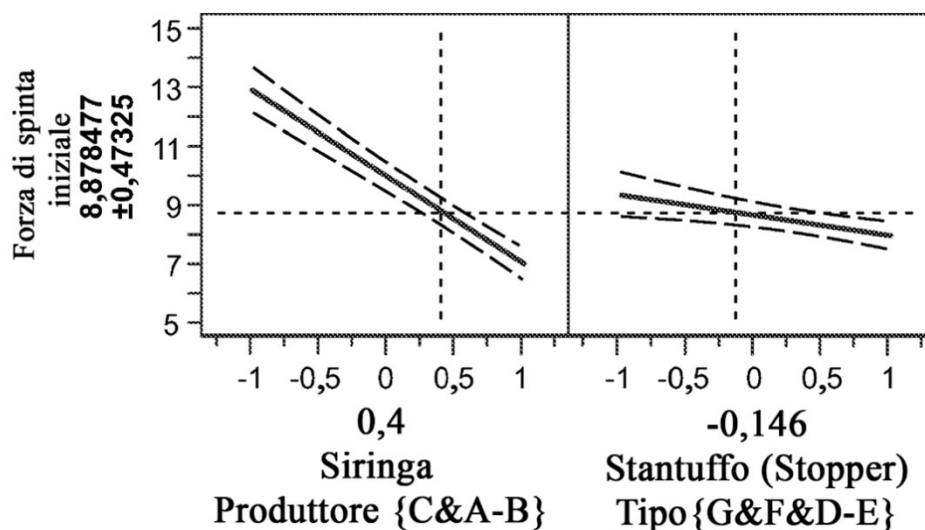


FIG. 18

