

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 187**

51 Int. Cl.:

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012 PCT/US2012/036072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012 E 12721093 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2704798**

54 Título: **Formulación para anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$**

30 Prioridad:

02.05.2011 US 201161481533 P

24.10.2011 US 201161550545 P

12.01.2012 US 201261585859 P

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

04.12.2017

73 Titular/es:

**MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**DILUZIO, WILLOW;
TRUONG, NOBEL T.;
VARGA, CSANAD M.;
PALANIAPPAN, VAITHIANATHAN;
BROWN, JASON;
FOX, IRVING H. y
SCHOLZ, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 645 187 T3

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

Formulación para anticuerpo anti- $\alpha\beta 7$ **DESCRIPCIÓN****5 Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/585.859, presentada el 12 de enero de 2012, la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/550.545, presentada el 24 de octubre de 2011, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/481.533, presentada el 2 de mayo de 2011.

10

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó en formato ASCII mediante EFS-Web y se incorpora en la presente mediante esta referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII creada el 30 de abril de 2012 se denomina 92596615.txt y tiene un tamaño de 17,024 bytes.

15

Antecedentes de la invención

Los avances en biotecnología han hecho posible producir una diversidad de proteínas para aplicaciones farmacéuticas usando técnicas de ADN recombinante. Debido a que las proteínas son de mayor tamaño y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, que poseen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de dichas proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína continúe siendo biológicamente activa, una formulación debe conservar la integridad conformacional de al menos una secuencia de núcleo de los aminoácidos de la proteína, protegiendo al mismo tiempo los múltiples grupos funcionales de la proteína de la degradación. Las proteínas pueden experimentar una falta de estabilidad, y los anticuerpos monoclonales y policlonales en particular pueden ser relativamente inestables (Véase, por ejemplo, Wang, et al., *J. Pharm Sci.* 96: 1-26 (2007)). Están disponibles un gran número de opciones de formulación, y una sola estrategia o sistema no es adecuada para todas las proteínas. Se han descrito varios factores a tener en cuenta (Véase, por ejemplo, Wang et al.).

20

25

Numerosas características pueden afectar la estabilidad de una proteína. De hecho, incluso en el caso de anticuerpos purificados, las estructuras de anticuerpos pueden ser heterogéneas, lo que complica adicionalmente la formulación de dichos sistemas. Además, los excipientes incluidos en formulaciones de anticuerpo preferentemente minimizan cualquier respuesta inmunitaria potencial.

30

En el caso de anticuerpos, la conservación de la integridad conformacional es incluso más importante. Las rutas de degradación para proteínas pueden implicar una inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implique la modificación de la proteína por formación o escisión de enlaces, dando como resultado una nueva entidad química) o una inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química se manifiesta, por ejemplo, en la desamidación, isomerización, hidrólisis, oxidación, fragmentación, eliminación de beta-glicanos o intercambio de disulfuros. La inestabilidad física puede ser el resultado de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Las cuatro rutas de degradación de proteínas más comunes son la fragmentación, la agregación, la desamidación y la oxidación de proteínas. Las consecuencias de la inestabilidad química o física de una proteína terapéutica incluyen una disminución de la dosis administrada eficaz, una seguridad disminuida de la terapia debido a, por ejemplo, irritación o reactividad inmunológica, y una fabricación más frecuente debido a una vida útil corta.

35

40

45

El secado por congelación es una técnica comúnmente utilizada para preservar proteínas; el secado por congelación sirve para eliminar el agua de la preparación de proteínas de interés. El secado por congelación, o liofilización, es un proceso por el cual el material a ser secado en primer lugar, se congela y, luego, se elimina el hielo o solvente congelado mediante sublimación al vacío. Los excipientes pueden incluirse en la formulación preliofilizada para estabilizar las proteínas durante el proceso de liofilización y/o para mejorar la estabilidad de la formulación de proteínas liofilizada (Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) y Arakawa et al., *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991)).

50

Varias publicaciones han descrito en general diversos métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino y han proporcionado esquemas de dosificación para la administración de agentes diseñados para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino. Por ejemplo, el documento WO 96/24673 describe adresas vasculares de la mucosa y el tratamiento de enfermedades asociadas con el reclutamiento de leucocitos hacia el tracto gastrointestinal como resultado de la unión de leucocitos a células que expresan MAdCAM. El documento U.S. 2005/0095238 describe métodos de tratamiento de una enfermedad asociada con la infiltración con leucocitos de tejido mucoso y la administración a un ser humano de una cantidad eficaz de una inmunoglobulina humana o humanizada o fragmento de unión al antígeno que tenga una especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$. El documento U.S. 2005/0095238 describe además diversas dosis (por ejemplo, de 0,15, de aproximadamente 0,5, de aproximadamente 1,0, de aproximadamente 1,5 o de aproximadamente 2,0 mg de inmunoglobulina o fragmento por kg de peso corporal) y diversos intervalos entre dosis (7, 14, 21, 28 o 30 días). Sin embargo, las patentes y publicaciones mencionadas anteriormente no describen formulaciones específicas del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o las dosis y regímenes de dosis específicos descritos y reivindicados en la presente memoria. Lo que es más importante, las patentes mencionadas anteriormente no describen formulaciones, dosis ni regímenes de dosis que hacen posible los métodos de tratamiento (confirmados por datos de ensayos clínicos) descritos

55

60

65

y reivindicados en la presente memoria.

Las formulaciones de anticuerpo de la presente invención pueden ser útiles para inhibir la unión de leucocitos a células que expresan MAdCAM y, por lo tanto, contribuyen al tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino en pacientes. Por consiguiente, existe una necesidad urgente de descubrir dosificaciones y esquemas de dosificación adecuados de estos compuestos, y de desarrollar formulaciones, preferentemente formulaciones intravenosas, que den origen a niveles en sangre constantes terapéuticamente eficaces de las formulaciones de anticuerpos a lo largo de un periodo de tiempo prolongado de una forma conveniente y estable.

10 **Resumen de la invención**

La invención proporciona una formulación como se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 En la presente memoria se describe la identificación de un azúcar no reductor y al menos un aminoácido como excipientes útiles para formular formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, cuya inestabilidad las hace susceptibles a la desamidación, oxidación, isomerización y/o agregación. La formulación mejora su estabilidad, reduce la formación de agregados y retrasa la degradación del anticuerpo en la misma.

20 En la presente memoria se describe una formulación estable que comprende una mezcla de un azúcar no reductor, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y al menos un aminoácido libre, y la relación molar entre azúcar no reductor y anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es mayor que 600:1. La formulación puede ser una formulación líquida o una formulación seca (por ejemplo, liofilizada). La formulación también puede contener un agente tamponador. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el azúcar no reductor es manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa o cualquier combinación de ellas.

25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el aminoácido libre de la formulación es histidina, alanina, arginina, glicina, ácido glutámico o cualquier combinación de los mismos. La formulación puede comprender entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 175 mM de aminoácido libre. La formulación descrita en la presente memoria puede comprender entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 175 mM de aminoácido libre. La proporción de aminoácido libre respecto a la proporción molar de anticuerpo puede ser de al menos 250:1.

30 La formulación descrita en la presente memoria también puede contener un tensioactivo. El tensioactivo puede ser polisorbato 20, polisorbato 80, un poloxámero o cualquier combinación de los mismos.

35 En algunos aspectos, la formulación puede minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

La formulación, por ejemplo, en estado seco, puede mantenerse estable durante al menos tres meses a 40 °C, 75 % de humedad relativa (RH).

40 En otra formulación descrita en la presente memoria, la formulación se liofiliza y comprende al menos alrededor de 5 % a alrededor de 10 % del anticuerpo- $\alpha 4\beta 7$ antes de la liofilización. La formulación puede contener al menos alrededor de 6 % del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ antes de la liofilización. La formulación puede ser reconstituida a partir de una formulación liofilizada (por ejemplo, ser reconstituida para comprender una formulación líquida estable).

45 En otra formulación descrita en la presente memoria, una formulación estable que comprende una mezcla de un azúcar no reductor, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y al menos un aminoácido libre, y la proporción molar de azúcar no reductor respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 600:1 y la proporción de aminoácido libre respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 250:1.

50 En otro aspecto descrito en la presente memoria, la invención se refiere a una formulación líquida estable que comprende en solución acuosa con un azúcar no reductor, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y al menos un aminoácido libre, en la que la proporción molar de azúcar no reductor respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 600:1. En todavía un aspecto más descrito en la presente memoria, una formulación líquida que comprende de al menos aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, al menos aproximadamente 50-175 mM de uno o más aminoácidos y de al menos aproximadamente el 6% a al menos aproximadamente el 10% (p/v) de azúcar. La formulación líquida descrita en la presente memoria también puede contener un agente tamponador. En algunas realizaciones, la formulación líquida también comprende un quelante de metales. En algunas realizaciones, la formulación líquida también comprende un antioxidante.

60 En otra formulación descrita en la presente memoria, una formulación líquida comprende al menos aproximadamente 60 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, al menos aproximadamente el 10% (p/v) de azúcar no reductor y al menos aproximadamente 125 mM de uno o más aminoácidos libres.

65 En otra formulación descrita en la presente memoria, una formulación líquida comprende al menos aproximadamente 60 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, al menos aproximadamente el 10% (p/v) de azúcar no reductor y al menos aproximadamente 175 mM de uno o más aminoácidos libres.

En todavía otra formulación más descrita en la presente memoria, una formulación seca, por ejemplo, liofilizada, comprende una mezcla de un azúcar no reductor, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, histidina, arginina y polisorbato 80, en la que la formulación está en forma sólida y la proporción molar de azúcar no reductor respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 600:1.

5

En todavía otra formulación más descrita en la presente memoria, una formulación liofilizada comprende una mezcla de un azúcar no reductor, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, histidina, arginina y polisorbato 80. En este aspecto, la proporción molar de azúcar no reductor respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 600:1. Además, la proporción molar de arginina respecto a anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) en la formulación es superior a 250:1.

10

Un método de preparación de una formulación descrita en la presente memoria comprende mantener la temperatura de producto por debajo de la temperatura de colapso durante el secado primario. El método también puede contener una etapa de atemperado.

15

En la presente memoria se describe un método para tratar a un paciente humano que padece una enfermedad inflamatoria del intestino, en el que el método comprende la etapa de administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria del intestino una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno comprende una región de unión a antígeno de origen no humano y al menos una parte de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente: (a) una dosis inicial de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa; (b) seguida de una segunda dosis posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa aproximadamente dos semanas después de la dosis inicial; (c) seguida de una tercera dosis posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa aproximadamente seis semanas después de la dosis inicial; (d) seguida de una cuarta dosis y dosis posteriores de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa cada cuatro semanas o cada ocho semanas después de la tercera dosis posterior del anticuerpo humanizado según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y/o la remisión clínica en la enfermedad inflamatoria del intestino del paciente; y en el que además la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno tiene especificidad de unión por el complejo $\alpha 4\beta 7$, en el que la región de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena ligera y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos expuesta a continuación: cadena ligera: CDR1 SEQ ID No: 9, CDR2 SEQ ID No: 10, CDR3 SEQ ID No: 11; cadena pesada: CDR1 SEQ ID No: 12, CDR2 SEQ ID No: 13, CDR3 SEQ ID No: 14.

20

25

30

35

En la presente memoria se describe un régimen de dosificación para el tratamiento terapéutico de la enfermedad inflamatoria del intestino, en el que el régimen de dosificación comprende la etapa de: administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria del intestino una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno comprende una región de unión a antígeno de origen no humano y al menos una parte de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente: (a) una dosis inicial de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa; (b) seguida de una segunda dosis posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa aproximadamente dos semanas después de la dosis inicial; (c) seguida de una tercera dosis posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa aproximadamente seis semanas después de la dosis inicial; (d) seguida de una cuarta dosis y dosis posteriores de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella como una infusión intravenosa cada cuatro semanas o cada ocho semanas después de la tercera dosis posterior del anticuerpo humanizado según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y/o la remisión clínica en la enfermedad inflamatoria del intestino del paciente; y en el que además la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno tiene especificidad de unión por el complejo $\alpha 4\beta 7$, en el que la región de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena ligera y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) de una región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos expuesta a continuación: cadena ligera: CDR1 SEQ ID No: 9, CDR2 SEQ ID No: 10, CDR3 SEQ ID No: 11; cadena pesada: CDR1 SEQ ID No: 12, CDR2 SEQ ID No: 13, CDR3 SEQ ID No: 14.

40

45

50

55

En un método de tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ descrito en la presente memoria, la dosis o el régimen de dosis pueden minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

60

El paciente puede haber tenido una falta de respuesta adecuada con, una pérdida de respuesta a, o haber sido intolerante al tratamiento con al menos uno de un inmunomodulador, un antagonista del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o combinaciones de los mismos.

65

La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La enfermedad inflamatoria del intestino puede ser una colitis ulcerosa de moderada a gravemente activa.

5 El régimen de dosificación puede dar como resultado la cicatrización de la mucosa en pacientes que padecen una colitis ulcerosa de moderada a gravemente activa.

10 El paciente puede haber recibido previamente tratamiento con al menos un corticosteroide para la enfermedad inflamatoria del intestino. El régimen de dosificación puede dar como resultado una reducción, eliminación o reducción y eliminación del uso del corticosteroide por el paciente.

15 La inmunoglobulina humanizada descrita en la presente memoria o fragmento de unión al antígeno de la misma puede administrarse en una forma de dosificación final a una concentración de entre aproximadamente 1,0 mg/ml y aproximadamente 1,4 mg/ml. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma puede administrarse en una forma de dosificación final de aproximadamente 1,2 mg/ml. La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno puede administrarse al paciente en aproximadamente 30 minutos.

La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella puede reconstituirse a partir de una formulación liofilizada.

20 La inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión a antígeno de ella puede reconstituirse para comprender una formulación líquida estable.

25 En algunos aspectos, el régimen de dosificación no altera la proporción de CD4 respecto a CD8 en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes que reciben dicho tratamiento.

El paciente puede ser una persona de 65 años o más de edad y no requiere ningún ajuste del régimen de dosificación.

Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es una ilustración de una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 1) que codifica la cadena pesada de una inmunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizada, y la secuencia de aminoácidos deducida de la cadena pesada (SEQ ID No: 2). La secuencia de nucleótidos contiene sitios de clonación (minúsculas), secuencia de Kozak (mayúsculas, nucleótidos 18-23 de la SEQ ID No: 1) y secuencia líder (minúsculas, nucleótidos 24-86 de la SEQ ID No: 1) en el extremo 5' de la cadena pesada. La fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos son los nucleótidos 24-1433 de la SEQ ID No: 1.

35 La FIG. 2 es una ilustración de una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No: 3) que codifica la cadena ligera de una inmunoglobulina humanizada denominada en la presente memoria vedolizumab, y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID No: 4) de la cadena ligera. La secuencia de nucleótidos contiene sitios de clonación (minúsculas), secuencia de Kozak (mayúsculas, nucleótidos 18-23 de la SEQ ID No: 3) y secuencia líder (minúsculas, nucleótidos 24-80 de la SEQ ID No: 3) en el extremo 5' de la cadena pesada. La fase de lectura abierta de la secuencia de nucleótidos son los nucleótidos 24-737 de la SEQ ID No: 3.

40 La FIG. 3 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de (A) la cadena ligera humanizada madura (aminoácidos 20-238 de la SEQ ID No: 4) de la inmunoglobulina humanizada denominada en la presente memoria vedolizumab y (B) la cadena ligera humanizada madura de la inmunoglobulina humanizada denominada en la presente memoria LDP-02 (SEQ ID No: 5). (En relación con LDP-02, véase el documento WO 98/06248 y Feagan et al., *N. Eng. J. Med.* 352: 2499-2507 (2005)). Feagan et al. describen un estudio clínico de LDP-02, pero en el artículo se refieren al LDP-02 como MLN02). El alineamiento ilustra que las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de vedolizumab y LDP-02 difieren en las posiciones 114 y 115 de las cadenas ligeras maduras.

45 La FIG. 4 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de (A) una región constante de cadena ligera kappa humana genérica (SEQ ID No: 6) y (B) una región constante de cadena ligera kappa murina genérica (SEQ ID No: 7). Los restos de aminoácidos Thr y Val (que están presentes en las posiciones 114 y 115 de la cadena ligera madura de vedolizumab (aminoácidos 133 y 134 de SEQ ID No: 4)) están presentes en la región constante de la cadena ligera kappa humana, mientras que los restos de aminoácidos Ala y Asp (que están presentes en las posiciones 114 y 115 de la cadena ligera madura de LDP-02 (SEQ ID No: 5)) están presentes en la región constante de la cadena ligera kappa de ratón.

50 La FIG. 5 es un mapa del vector pLKTOK38D (también denominado pTOK38MLN02-TV), que codifica la cadena pesada humanizada y la cadena ligera humanizada de MLN02, y es adecuado para producir vedolizumab en células CHO. (Véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2004/0033561 A1 que describe el pLKTOK38. El pLKTOK38D es una variante del pLKTOK38 en la que los sitios de restricción indicados en el mapa flanquean la secuencia que codifica la región variable de cadena ligera).

55 La FIG. 6A muestra los modelos predichos para el cambio en el porcentaje de monómero, el cambio en el porcentaje de agregados y el cambio en el porcentaje de isoforma principal de la formulación liofilizada de anti- $\alpha 4\beta 7$. Los modelos están basados en el análisis estadístico de los datos presentados en el Ejemplo 1. La línea central muestra los resultados para los modelos predictivos y las líneas externas muestran el límite de confianza del 95% para los modelos predictivos. La FIG. 6B muestra modelos alternativos basados en el análisis estadístico

de los datos de 40°C de las Tablas 1-3 cuando los factores de entrada de datos son el pH, la proporción molar de azúcar:proteína y la proporción molar de arginina:proteína. La línea central muestra los resultados para los modelos predictivos y las líneas externas muestran el límite de confianza del 95% para los modelos predictivos.

La FIG. 7 muestra las secuencias de aminoácidos de (A) la región variable de cadena ligera kappa del anticuerpo GM607'CL humano maduro y (B) la región variable de la cadena pesada del 21/28'CL humano.

La FIG. 8 es una gráfica que muestra que los sólidos y la carga afectan al tiempo de secado (los números en las líneas representan el número de minutos de tiempo de secado).

La FIG. 9 es una gráfica que muestra que el vedolizumab no retrasaba la aparición de síntomas clínicos de encefalitis autoinmune experimental (EAE) en comparación con el control de placebo. El natalizumab retrasaba significativamente ($p < 0,05$) la aparición de síntomas clínicos de EAE en comparación con el control de placebo.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a formulaciones que comprenden anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$. Las formulaciones se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que contiene un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en una forma tal para permitir que la actividad biológica del anticuerpo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Una formulación "estable" es una en la que el anticuerpo en la misma conserva sustancialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o su actividad biológica tras el almacenamiento. En un aspecto, la formulación conserva sustancialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras el almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona generalmente basándose en la vida útil deseada de la formulación. Están disponibles en la materia diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo.

Un anticuerpo monoclonal "desamidado" es uno en el que uno o más restos de asparagina o glutamina se han derivatizado, por ejemplo, a un ácido aspártico o a un ácido isoaspártico.

Un anticuerpo que es "susceptible a la desamidación" es uno que comprende uno o más restos que se ha visto que tienen tendencia a desamidarse.

Un anticuerpo que es "susceptible a la oxidación" es un anticuerpo que comprende uno o más restos que se ha visto que tienen tendencia a la oxidación.

Un anticuerpo que es "susceptible a la agregación" es uno que se ha visto que se agrega con otra molécula o moléculas de anticuerpo, especialmente tras la congelación, calentamiento, secado, reconstitución y/o agitación.

Un anticuerpo que es "susceptible a la fragmentación" es uno que se ha visto que se escinde en dos o más fragmentos, por ejemplo, en una región bisagra del mismo.

Por "reducción de la desamidación, oxidación, agregación o fragmentación" se pretende significar prevenir o disminuir (por ejemplo, hasta el 80%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de) la cantidad de desamidación, agregación o fragmentación respecto al anticuerpo monoclonal formulado a un pH diferente o en un tampón diferente.

Un "agregado", "agregado por SEC" o "agregado soluble" es más de uno y menos de o igual a diez proteínas y/o fragmentos de anticuerpo asociados entre sí a través de ya sea interacciones covalentes, iónicas o hidrófobas para formar un cuerpo proteico de mayor tamaño.

Un "agregado insoluble" o "partícula" es más de diez proteínas y/o fragmentos de anticuerpo asociados entre sí a través de ya sea interacciones covalentes, iónicas o hidrófobas para formar un cuerpo proteico de mayor tamaño.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal se refiere a la capacidad del anticuerpo para unirse a antígeno y da como resultado una respuesta biológica medible que puede medirse *in vitro* o *in vivo*. Dicha actividad puede ser antagonista o agonista.

La molécula de superficie celular "integrina $\alpha 4\beta 7$ " o " $\alpha 4\beta 7$ " es un heterodímero de una cadena $\alpha 4$ (CD49D, ITGA4) y una cadena $\beta 7$ (ITGB7). Cada cadena puede formar un heterodímero con una cadena de integrina alternativa para formar $\alpha 4\beta 1$ o $\alpha E\beta 7$. Los genes de $\alpha 4$ y $\beta 7$ humanos (GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) Números de acceso RefSeq NM_000885 y NM_000889, respectivamente) se expresan por linfocitos B y T, particularmente linfocitos CD4+ de memoria. Típico de muchas integrinas, $\alpha 4\beta 7$ puede existir en un estado en reposo o activado. Los ligandos para

$\alpha 4\beta 7$ incluyen la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), la fibronectina y la adhesina de la mucosa (MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1)).

5 Como se usa en la presente memoria, una inmunoglobulina humana o fragmento de unión al antígeno de la misma que tiene "especificidad de unión por el complejo $\alpha 4\beta 7$ " se une a $\alpha 4\beta 7$ pero no a $\alpha 4\beta 1$ ni a $\alpha E\beta 7$.

10 Como se usa en la presente memoria, una formulación "isotónica" tiene sustancialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de tipo congelación de hielo o de presión de vapor, por ejemplo.

15 Como se usa en la presente memoria, un "agente tamponador" se refiere a un tampón que resiste cambios en el pH por acción de sus componentes ácido-base conjugados. El agente tamponador puede estar presente en una formulación líquida o sólida de la invención. El agente tamponador ajusta el pH de la formulación a de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, a de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, a de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 6,5, o a un pH de aproximadamente 6,3. En un aspecto, los ejemplos de agentes tamponadores que controlarán el pH en el intervalo de 5,0 a 7,5 incluyen acetato, succinato, gluconato, histidina, citrato, fosfato, maleato, cacodilato, ácido 2-[N-morfolino]jetanosulfónico (MES), bis(2-hidroxiethyl)iminotris[hidroxiethyl]metano (Bis-Tris), ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético (ADA), glicilglicina y otros tampones ácidos orgánicos. En otro aspecto, el agente tamponador de la presente memoria es histidina o citrato.

20 Un "tampón de histidina" es un tampón que comprende iones histidina. Los ejemplos de tampones de histidina incluyen soluciones de cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. El tampón de histidina o tampón de histidina-HCl tiene un pH de entre aproximadamente pH 5,5 a 6,5, de aproximadamente pH 6,1 a 6,5, o de aproximadamente pH 6,3.

30 Un "sacárido" en la presente memoria es un compuesto que tiene una fórmula general $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y derivados del mismo, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcares, azúcares reductores, azúcares no reductores y similares. En un aspecto, los ejemplos de sacáridos de la presente memoria incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltulosa y similares. Un sacárido puede ser un lioprotector. En otro aspecto, el sacárido de la presente memoria es un disacárido no reductor tal como sacarosa.

35 Un "tensoactivo" en la presente memoria se refiere a un agente que disminuye la tensión superficial de un líquido. El tensoactivo puede ser un tensoactivo no iónico. En un aspecto, los ejemplos de tensoactivos de la presente memoria incluyen polisorbato (monolaurato de polioxietileno sorbitán, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); TRITON (t-Octilfenoxipolietoxietanol, detergente no iónico, Union Carbide subsidiaria de Dow Chemical Co., Midland MI); dodecil sulfato sódico (SDS); lauril sulfato sódico; octil glucósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil-taurato de sodio o metil oleil-taurato disódico; monopalmitato de sorbitán; y la serie MONAQUAT (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.); polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG) y copolímeros de polioxietileno y polioxipropilenglicol (por ejemplo, Plurónicos/Poloxámero, PF68 etc.); etc. En otro aspecto, el tensoactivo es polisorbato 80.

50 El término "anticuerpo" de la presente memoria se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales de longitud completa, inmunoglobulinas, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, cada uno contra un antígeno o epítipo diferente, y fragmentos de unión al antígeno individuales, incluyendo dAb, scFv, Fab, F(ab)₂, Fab', incluyendo anticuerpos humanos, humanizados y de especies no humanas y formas de unión al antígeno recombinantes, tales como monocuerpos y diacuerpos.

55 Las cantidades y proporciones molares de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ respecto a otros excipientes descritos en la presente memoria se calculan suponiendo un peso molecular aproximado de aproximadamente 150.000 daltons para el anticuerpo. El peso molecular real del anticuerpo puede diferir de 150.000 daltons dependiendo de la composición de aminoácidos o de las modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo, que dependen de la línea celular usada para expresar el anticuerpo. El peso molecular real del anticuerpo puede ser de +/- el 5% de 150.000 daltons.

60 La expresión "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que posee una secuencia que procede de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humanos (por ejemplo, ratones obtenidos por ingeniería genética XENOMOUSE (Abgenix, Fremont, CA), HUMAB-MOUSE®, ratones transcrómicos KIRIN TC MOUSE™, KMMOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ)), bibliotecas de presentación en fago humanas, células de mieloma humanas o células B humanas.

65 La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir

de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes generalmente presentes en cantidades minoritarias. Al contrario que las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden generarse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden generarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas en fagos de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable obtenidas de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, simios, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Los “fragmentos de unión al antígeno” de la inmunoglobulina inmunizada preparados en la formulación de la invención comprenden al menos las regiones variables de las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de vedolizumab comprende los restos de aminoácidos 20-131 de la secuencia de cadena ligera humanizada de la SEQ ID No: 4. Los ejemplos de dichos fragmentos de unión al antígeno incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos scFv y F(ab')₂ de una inmunoglobulina humanizada conocida en la técnica. Los fragmentos de unión al antígeno de la inmunoglobulina humanizada de la invención pueden producirse por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, puede usarse escisión con papaína o pepsina para generar fragmentos Fab o F(ab')₂, respectivamente. También pueden producirse anticuerpos en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpo en los que se han introducido uno o más codones de terminación cadena arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, puede diseñarse una construcción recombinante que codifica la cadena pesada de un fragmento F(ab')₂ que incluya secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH₁ y la región bisagra de la cadena pesada. En un aspecto, los fragmentos de unión al antígeno inhiben la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a uno o más de sus ligandos (por ejemplo, la adhesina de la mucosa MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), fibronectina).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un solo sitio de unión al antígeno y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y todavía es capaz de entrecruzar antígeno.

El “Fv” es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en una asociación no covalente.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para un Fab' en el que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes llevan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originariamente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre los mismos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “scFv” comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En un aspecto, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Un “anticuerpo de longitud completa” es uno que comprende una región variable de unión al antígeno, así como un dominio

constante de cadena ligera (C_L) y dominios constantes de cadena pesada C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En un aspecto, el anticuerpo de longitud completa tiene una o más funciones efectoras.

5 Un anticuerpo “variante de secuencia de aminoácidos” en la presente memoria es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de un anticuerpo de especie principal. Generalmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán una homología de al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% con el anticuerpo de especie principal. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o adiciones en ciertas posiciones dentro de o adyacentes a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de especie principal, pero conservan la actividad de unión al antígeno. Las variaciones en la secuencia de las regiones constantes del anticuerpo tendrán menos efecto sobre la actividad de unión al antígeno que las variaciones en las regiones variables. En las regiones variables, las variantes de secuencia de aminoácidos tendrán una homología de al menos aproximadamente el 90%, una homología de al menos aproximadamente el 95%, una homología de al menos aproximadamente el 97%, una homología de al menos aproximadamente el 98% o una homología de al menos aproximadamente el 99% con el anticuerpo de especie principal. El término “homología” se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje de homología máximo. Se conocen bien en la técnica métodos y programas informáticos para el alineamiento.

20 Un “anticuerpo monoclonal terapéutico” es un anticuerpo usado para la terapia de un sujeto humano. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$.

25 Un anticuerpo de “variante de glicosilación” de la presente memoria es un anticuerpo con uno o más restos carbohidrato unidos al mismo, que difieren de uno o más restos carbohidrato unidos a un anticuerpo de especie principal. Los ejemplos de variantes de glicosilación de la presente memoria incluyen un anticuerpo con una estructura de oligosacáridos G1 o G2 en lugar de una estructura de oligosacáridos G0, unida a una región Fc del mismo, un anticuerpo con uno o dos restos carbohidrato unidos a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin carbohidratos unidos a una o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc. y combinaciones de alteraciones de glicosilación.

30 Las “funciones efectoras” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis, regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR) y similares.

35 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa pueden asignarse a “clases” diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulina son bien conocidas.

45 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y la “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes *et al. PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998).

60 Las expresiones “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En un aspecto, el FcR es un FcR humano de secuencia nativa. En otro aspecto, el FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor activador”) y Fc γ RIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase una revisión en

65

M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 33-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se incluyen en el término "FcR" de la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

La expresión "región hipervariable", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Los restos de "región marco" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en la presente memoria. La región hipervariable o las CDR de la misma pueden transferirse de una cadena de anticuerpo a otra o a otra proteína para conferir especificidad de unión al antígeno a la proteína de unión o anticuerpo (compuesto) resultante.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor), en las que restos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales véase Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa o esas alteraciones. En un aspecto, los anticuerpos madurados por afinidad tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de restos de CDR y/o marco se describe por: 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); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de proteína según se determine por el método de Lowry y, como alternativa, más del 99% en peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción de plata o azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

El término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen la enfermedad, así como aquellos en los que se va a prevenir la enfermedad o su recurrencia. Por lo tanto, el paciente a tratar en la presente memoria puede haber sido diagnosticado como que tiene la enfermedad o puede estar predispuesto o ser susceptible a la enfermedad. Los términos "paciente" y "sujeto" se usan de forma intercambiable en la presente memoria.

El anticuerpo que se formula es sustancialmente puro e idealmente sustancialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.). Un anticuerpo "sustancialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 90% de anticuerpo en peso, basándose en el peso total de la proteína en la composición, al menos aproximadamente el 95% o el 97% en peso. Un anticuerpo "sustancialmente homogéneo" significa una composición que comprende proteína en la que al menos aproximadamente el 99% en peso de la proteína es un anticuerpo específico, por ejemplo, anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, basándose en el peso total de la proteína.

La expresión "remisión clínica", como se usa en la presente memoria con referencia a sujetos con colitis ulcerosa, se

refiere a una puntuación de Mayo completa de 2 o menos puntos y ninguna subpuntuación individual superior a 1 punto. La "remisión clínica" de la enfermedad de Crohn se refiere a una puntuación de CDAI de 150 puntos o menos.

5 Una "respuesta clínica", como se usa en la presente memoria con referencia a sujetos con colitis ulcerosa, se refiere a una reducción en la puntuación de Mayo completa de 3 o más puntos y del 30% de la basal (o una puntuación de Mayo parcial de 2 o más puntos y del 25% o más de la basal, si no se realizó la puntuación de Mayo completa en la visita) con una disminución acompañante en la subpuntuación de sangrado rectal de 1 o más puntos o una puntuación de sangrado rectal absoluta de 1 o menos puntos. Una "respuesta clínica", como se usa en la presente memoria con referencia a sujetos con enfermedad de Crohn, se refiere a una disminución de 70 puntos o más en la puntuación de CDAI desde la basal (semana 0).

10 La "cicatrización de la mucosa", como se usa en la presente memoria con referencia a sujetos con colitis ulcerosa, se refiere a una subpuntuación endoscópica de 1 punto o menos.

15 Como se usa en la presente memoria, el "fracaso de tratamiento" se refiere al empeoramiento de la enfermedad, a la necesidad de medicaciones de rescate o intervención quirúrgica para el tratamiento de la colitis ulcerosa o de la enfermedad de Crohn. Una medicación de rescate es cualquier nueva medicación o cualquier aumento en la dosis de una medicación basal necesario para tratar síntomas de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn nuevos o no resueltos (distinta de antidiarreicos para el control de la diarrea crónica).

20 **Formulaciones**

25 Como se describe en la presente memoria, se ha descubierto que los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ son altamente estables cuando están en una formulación seca, por ejemplo, liofilizada, con azúcar no reductor en exceso (en base molar). En particular, se muestra en la presente memoria que las formulaciones liofilizadas en las que la proporción de azúcar no reductor respecto al anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (mol:mol) es superior a 600:1, son estables durante al menos 2 años.

30 La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una formulación como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Si se desea, la formulación puede comprender además un quelante de metal y/o un antioxidante, así como otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Los quelantes de metales adecuados incluyen, por ejemplo, metilamina, etilendiamina, desferoxamina, trientina, histidina, malato, compuestos de fosfonato, por ejemplo, ácido etidróico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y similares. Los antioxidantes adecuados incluyen, por ejemplo, ácido cítrico, ácido úrico, ácido ascórbico, ácido lipoico, glutatión, tocoferol, caroteno, licopeno, cisteína y similares.

40 Las formulaciones líquidas pueden ser soluciones o suspensiones acuosas preparadas en un disolvente acuoso adecuado, tal como agua o una mezcla acuosa/orgánica, tal como mezclas de agua-alcohol. Las formulaciones líquidas pueden tener un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0 o de entre aproximadamente 6,0 y 6,5, tal como de aproximadamente 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5. Las formulaciones líquidas pueden ser refrigeradas (por ejemplo, 2-8°C) o congelarse (por ejemplo, a -20°C o -80°C) para su almacenamiento. Las formulaciones sólidas pueden prepararse de cualquier forma adecuada y puede estar en forma de una torta o polvo, por ejemplo. La formulación sólida se prepara por secado de una formulación líquida como se describe en la presente memoria, por ejemplo, por liofilización, secado por pulverización, secado por aire en una película (por ejemplo para administración transdérmica), mezcla en una emulsión lipídica y secado como esferas para administración oral o película para administración transdérmica. Cuando la formulación es una formulación sólida, la formulación puede tener un contenido de humedad de no más de aproximadamente el 5%, no más de aproximadamente el 4,5%, no más de aproximadamente el 4%, no más de aproximadamente el 3,5%, no más de aproximadamente el 3%, no más de aproximadamente el 2,5%, no más de aproximadamente el 2%, no más de aproximadamente el 1,5%, no más de aproximadamente el 1%, o ser sustancialmente anhidra. Las formulaciones sólidas pueden disolverse, es decir, reconstituirse, en un medio o disolvente adecuado para convertirse en un líquido adecuado para su administración. Los disolventes adecuados para la reconstitución de la formulación sólida incluyen agua, solución salina isotónica, tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer (lactato o dextrosa), medio mínimo esencial, soluciones de alcohol/acuosas, solución de dextrosa, etc. La cantidad de disolvente puede dar como resultado una concentración de proteína terapéutica superior, igual o inferior a la concentración antes del secado. En un aspecto, la concentración de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ reconstituido es la misma concentración que en la formulación líquida previa al secado.

60 La formulación puede ser estéril y esto puede conseguirse de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos para generar formulaciones farmacéuticas estériles adecuadas para su administración a sujetos humanos antes de o después de la preparación de la formulación. La formulación puede esterilizarse como un líquido, por ejemplo, antes del secado y/o después de la reconstitución, por filtración a través de poros pequeños, a través de un procesamiento aséptico o por exposición a radiación ultravioleta. Los tamaños de poro de filtro pueden ser de 0,1 μm o 0,2 μm para filtrar microorganismos o de 10 a 20 nm para filtrar partículas de virus. Como alternativa, o además, la formulación seca puede esterilizarse, por ejemplo, por exposición a radiación gamma. En un aspecto, la formulación líquida de anticuerpo anti-

α 4 β 7 se esteriliza por filtración antes del secado.

La formulación descrita en la presente memoria es estable después de almacenamiento. La formulación descrita en la presente memoria es estable después de almacenamiento en el estado seco. La estabilidad puede ensayarse evaluando la estabilidad física, la estabilidad química y/o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación alrededor del momento de la formulación, así como después del almacenamiento a las temperaturas señaladas. La estabilidad física y/o química de una formulación líquida o un polvo seco reconstituido puede evaluarse cualitativamente y/o cuantitativamente de una diversidad de formas diferentes (véase, por ejemplo, *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodríguez-Díaz *et al.* eds. Informa Healthcare (2005)), incluyendo la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (o filtración en gel) (SEC), espectrometría de masas de ionización por desorción con láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) ultracentrifugación analítica, dispersión de luz (espectroscopía de correlación de fotones, dispersión de luz dinámica (DLS), dispersión de luz láser multiángulo (MALLS)), formación de imágenes microscópicas basada en flujo, recuento de la impedancia electrónica (coulter), oscurecimiento de luz u otro sistema de recuento de partículas líquidas, por medición de la turbidez, por centrifugación en gradiente de densidad y/o por inspección visual); por evaluación de la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico (véase también Vlasak e Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9: 468-481 (2008) y Harris *et al.* *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752: 233-245 (2001)), concentración isoelectrica (IEF), por ejemplo, técnica capilar (cIEF) o electroforesis zonal capilar; análisis de secuencia amino-terminal o carboxi-terminal; análisis espectrométrico de masas; análisis de SDS-PAGE o SEC para comparar el anticuerpo fragmentado, intacto y multimérico (es decir, dimérico, trimérico, etc.); mapa peptídico (por ejemplo, tríptico o LYS y similares); evaluación de la actividad biológica o de la función de unión a antígeno del anticuerpo; y similares. La actividad biológica o la función de unión al antígeno, por ejemplo, la unión del anticuerpo anti- α 4 β 7 a MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) o la inhibición de la unión de una célula que expresa la integrina α 4 β 7 a MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), por ejemplo, MAdCAM inmovilizada (por ejemplo, MAdCAM-1), puede evaluarse usando diversas técnicas disponibles para el experto en la materia (véase, por ejemplo, Soler *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330: 864-875 (2009)).

La estabilidad de una formulación en estado sólido también puede evaluarse cualitativamente y/o cuantitativamente de una diversidad de formas diferentes, incluyendo ensayos directos, tales como identificación de la estructura cristalina por Difracción de Rayos X de Polvo (XRPD); evaluación de la estructura de anticuerpo en el estado sólido usando Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR); y medición de transiciones térmicas en el sólido liofilizado (fusión, transición vítrea, etc.) usando Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), (por ejemplo, para evaluar la desnaturalización) y ensayos indirectos tales como medición del contenido de humedad mediante el ensayo de Karl Fisher, por ejemplo, para extrapolar la probabilidad de inestabilidad química a través de la hidrólisis. La medición del contenido de humedad de una formulación seca puede indicar cómo de probable es que una formulación experimente una degradación química o física, conduciendo una mayor humedad a más degradación.

La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. En un aspecto, una formulación seca (por ejemplo, liofilizada) es estable a aproximadamente 40°C, HR del 75% durante al menos aproximadamente 2-4 semanas, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 12 meses o al menos aproximadamente 18 meses. En otro aspecto, la formulación (líquida o seca (por ejemplo, liofilizada)) es estable a aproximadamente 5°C y/o 25°C y HR del 60% durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 30 meses, al menos aproximadamente 36 meses o al menos aproximadamente 48 meses. En otro aspecto, la formulación (líquida o seca (por ejemplo, liofilizada)) es estable a aproximadamente -20°C durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 30 meses, al menos aproximadamente 36 meses, al menos aproximadamente 42 meses o al menos aproximadamente 48 meses. Además, la formulación líquida puede ser estable en algunas realizaciones después de la congelación (a, por ejemplo, -80°C) y descongelación tal como, por ejemplo, después de 1, 2 o 3 ciclos de congelación y descongelación.

La inestabilidad puede implicar uno o más de cualquiera de: agregación (por ejemplo, agregación soluble no covalente (causada por interacciones hidrófobas o de carga), agregación soluble covalente (por ejemplo, reorganización/desorden de enlaces disulfuro), agregación insoluble (causada por desnaturalización de la proteína en las superficies de contacto líquido/aire y líquido/sólido)), desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), desnaturalización, recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, extensión N-terminal, procesamiento C-terminal, diferencias de glicosilación y similares.

Una formulación estable puede contribuir a una baja inmunogenicidad de un anticuerpo anti- α 4 β 7. Un anticuerpo anti- α 4 β 7 inmunogénico puede conducir a una respuesta de anticuerpo humano anti-humano (HABA) en sujetos o pacientes humanos. Los pacientes que desarrollan una respuesta de HABA contra un anticuerpo anti- α 4 β 7 pueden tener eventos adversos (por ejemplo, reacción de sitio de infusión) tras el tratamiento o pueden eliminar el anticuerpo anti- α 4 β 7 rápidamente, dando como resultado una menor dosis de la planeada por tratamiento. Un informe (Feagen *et al.* (2005) N.

Engl. J. Med. 352: 2499-2507) de estudio temprano de un tratamiento con anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ indicó que se desarrollaban anticuerpos humanos anti-humano hacia la semana 8 en el 44% de los pacientes tratados. El anticuerpo en este estudio se almacenó como un líquido y no contenía ningún polisorbato.

5 En algunas realizaciones, la formulación puede aumentar la proporción de pacientes negativos para HABA a al menos el 40%, a al menos el 50%, a al menos el 60%, a al menos el 70%, a al menos el 80% o al menos el 90% de los pacientes en comparación con los resultados de HABA de una formulación menos estable.

10 En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene $\geq 50\%$ de isoforma principal cargada, $\geq 55\%$ de isoforma principal cargada o del 65 al 70% de isoforma principal cargada. En otros aspectos, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene $\leq 45\%$ de isoformas cargadas ácidas, $\leq 40\%$ de isoformas cargadas ácidas, $\leq 30\%$ de isoformas cargadas ácidas o del 22 al 28% de isoformas ácidas. En otros aspectos más, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene $\leq 25\%$ de isoformas básicas, $\leq 20\%$ de isoformas básicas, $\leq 15\%$ de isoformas básicas, aproximadamente el 5% de isoformas básicas o aproximadamente el 10% de isoformas básicas. En un aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene $\geq 55\%$ de isoforma principal, $\leq 30\%$ de isoformas ácidas y/o $\leq 20\%$ de isoformas básicas, por ejemplo, según se determinó por CEX. En otro aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene $\geq 50\%$ de isoforma principal, $\leq 45\%$ de isoformas ácidas y/o $< 10\%$ de isoformas básicas, por ejemplo, según se determinó por cIEF.

20 En algunos aspectos, una formulación sólida seca de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene $\leq 10\%$ de contenido de humedad, $\leq 5\%$ de contenido de humedad o $< 2,5\%$ de contenido de humedad. El tiempo necesario para la reconstitución es ≤ 60 minutos, ≤ 50 minutos o ≤ 40 minutos o ≤ 30 minutos o ≤ 20 minutos.

25 El contenido monomérico y/o contenido de agregados (por ejemplo, como dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros, oligómeros y agregados de orden superior), es decir, en la formulación líquida o en la formulación seca después de la reconstitución puede medirse por SEC, MALDI-TOF MS, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz (DLS o MALLS) o medición a nanoescala, tal como análisis de seguimiento de nanopartículas NTA, NanoSight Ltd, Wiltshire, Reino Unido). La resolución, caracterización y cuantificación de agregados puede conseguirse de varias formas, incluyendo aumentar la longitud de la separación de la columna de SEC, por ejemplo, mediante una columna más larga o por unión en serie de una segunda o más columnas de SEC en línea con la columna de SEC analítica inicial, complementando la cuantificación por SEC de monómeros con dispersión de luz o usando NTA.

35 En una realización, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene $\geq 90\%$ de anticuerpo monomérico, $\geq 95\%$ de anticuerpo monomérico o del 97 al 99% de anticuerpo monomérico. En otra realización, la mayoría del material en una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene un radio promedio de ≤ 20 nm, ≤ 15 nm, ≤ 10 nm, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 nm. En un aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene $\geq 80\%$ de cantidad de cadena pesada más ligera por análisis de proteína. En un aspecto, existe $\geq 90\%$ de cadena pesada más ligera. En otro aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene $\leq 10\%$ de agregado, $\leq 5\%$ de agregado, $\leq 2,5\%$ de agregado, $\leq 1,5\%$ de agregado, $\leq 1,0\%$ de agregado o $\leq 0,5\%$ de agregado. En otro aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene $\geq 96\%$ de monómero y/o $\leq 2,5\%$ de agregado. En otro aspecto más, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable tiene aproximadamente el 99% de monómero y/o aproximadamente $< 1\%$ de agregado.

45 Los tamaños de partícula, por ejemplo, de agregados o excipiente no disuelto, es decir, en la formulación reconstituida pueden medirse por oscurecimiento de luz (por ejemplo, sistema de recuento de partículas líquidas (HIAC) por Hach Ultra Analytics (Grants Pass, OR)), microscopía, contador coulter, o un sistema basado en formación de imágenes microscópicas (por ejemplo, basado en flujo) digitales, tal como formación de imagen microfluidica (MFI) por Brightwell (Ottawa, CA) o analizador de partículas por imagen FLOWCAM® por Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME). En un aspecto, el tamaño de partícula en una preparación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 30 μm , aproximadamente 25 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 2 μm o 1 μm o menos. La cantidad de partículas debería minimizarse en las formulaciones de anticuerpo. En un aspecto, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene menos de 6.000 partículas de ≥ 10 μm y menos de 600 partículas de ≥ 25 μm de diámetro en una dosis (Farmacopea de los Estados Unidos Cap. 788, método de recuento por oscurecimiento de luz; la mitad de las cantidades por un método de cuantificación microscópica). En otro aspecto más, una cantidad de partículas por mililitro, por ejemplo, por medición mediante MFI, en una dosis de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo, una formulación reconstituida es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000 o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 3.000 de partículas de 2-10 μm por ml, de aproximadamente 50 a aproximadamente 350 de partículas ≥ 10 μm por ml y de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 de partículas ≥ 25 μm por ml.

60 En una realización, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene una afinidad de unión de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 140% del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ patrón de referencia. En un aspecto, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en una formulación descrita en la presente memoria se une a $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo, en una célula (documento WO98/06248 o Patente de Estados Unidos No. 7.147.851), a un valor de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 120% del patrón de referencia. En otra realización, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene la capacidad de inhibir al menos el 50%, o al menos el 60% de la unión de una célula que expresa la integrina $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM, por ejemplo, MAdCAM-

1, una quimera de MAdCAM-Ig (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20070122404, también para ejemplos de patrón de referencia).

5 Como se ha señalado anteriormente, la congelación de la formulación se contempla específicamente en la presente memoria. Por lo tanto, la formulación puede ensayarse para determinar su estabilidad a la congelación y descongelación. Por consiguiente, el anticuerpo en una formulación líquida puede ser estable tras la congelación y descongelación de la formulación, por ejemplo, el anticuerpo puede ser estable después de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más ciclos de congelación/descongelación.

10 Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables distintos tales como los descritos en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a Edición, Hendrickson, R. Ed. (2005) pueden incluirse en la formulación con tal de que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponadores adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; conservantes y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

Anticuerpos $\alpha 4\beta 7$

20 Los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ descritos en la presente memoria incluyen anticuerpos de cualquier fuente deseada, tales como anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos murinos, anticuerpos de conejo y similares, y cualquier anticuerpo obtenido por ingeniería genética deseado, tal como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y similares. Los fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de estos tipos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂ también son adecuados para su uso en las formulaciones.

25 El anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede unirse a un epítipo en la cadena $\alpha 4$ (por ejemplo, MAb 21.6 humanizado (Bendig *et al.*, Patente de Estados Unidos No. 5.840.299)), en la cadena $\beta 7$ (por ejemplo, FIB504 o un derivado humanizado (por ejemplo, Fong *et al.*, Patente de Estados Unidos No. 7.528.236)), o a un epítipo combinatorio formado por la asociación de la cadena $\alpha 4$ con la cadena $\beta 7$. En un aspecto, el anticuerpo se une a un epítipo combinatorio en el complejo $\alpha 4\beta 7$, pero no se une a un epítipo en la cadena $\alpha 4$ o la cadena $\beta 7$ a menos que las cadenas estén asociadas entre sí. La asociación de la integrina $\alpha 4$ con la integrina $\beta 7$ puede crear un epítipo combinatorio, por ejemplo, aproximando los restos presentes en ambas cadenas que en conjunto comprenden el epítipo, o exponiendo conformacionalmente en una cadena, por ejemplo, la cadena de integrina $\alpha 4$ o la cadena de integrina $\beta 7$, un sitio de unión epitépico que sea inaccesible a la unión de anticuerpo en ausencia del compañero de integrina apropiado o en ausencia de la activación de integrina.

30 En otro aspecto, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ se une tanto a la cadena de integrina $\alpha 4$ como a la cadena de integrina $\beta 7$ y, por lo tanto, es específico para el complejo de integrina $\alpha 4\beta 7$. Dichos anticuerpos pueden unirse a $\alpha 4\beta 7$ pero no unirse a $\alpha 4\beta 1$ y/o no unirse a $\alpha \epsilon \beta 7$, por ejemplo. En otro aspecto, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ se une al mismo o sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo 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 línea celular de hibridoma murino ACT-1, que produce el anticuerpo monoclonal Act-1 murino, se depositó bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest el 22 de agosto de 2001, en nombre de Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, Estados Unidos, en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, Estados Unidos, con el No. de Acceso PTA-3663. En otro aspecto, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es un anticuerpo humano o una proteína de unión a $\alpha 4\beta 7$ que usa las CDR proporcionadas en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2010/0254975.

35 En un aspecto, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ inhibe la unión de $\alpha 4\beta 7$ a uno o más de sus ligandos (por ejemplo, la adresina de la mucosa, por ejemplo, MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), fibronectina y/o adresina vascular (VCAM)). Se describen MAdCAM de primate en la publicación PCT WO 96/24673, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria mediante esta referencia. En otro aspecto, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ inhibe la unión de $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) y/o fibronectina sin inhibir la unión de VCAM.

40 Los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ descritos en la presente memoria son versiones humanizadas del anticuerpo Act-1 de ratón. Se conocen bien en la técnica métodos adecuados para preparar anticuerpos humanizados. En general, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizado contendrá una cadena pesada que contiene las 3 regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR, CDR1, SEQ ID No: 8, CDR2, SEQ ID No: 9 y CDR3, SEQ ID No: 10) del anticuerpo Act-1 de ratón y regiones marco de cadena pesada humana adecuadas; y también contiene una cadena ligera que contiene las 3 CDR de cadena ligera (CDR1, SEQ ID No: 11, CDR2, SEQ ID No: 12 y CDR3, SEQ ID No: 13) del anticuerpo Act-1 de ratón y regiones marco de cadena ligera humana adecuadas. El anticuerpo Act-1 humanizado puede contener cualquier región marco humana adecuada, incluyendo regiones marco de consenso, con o sin sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, uno o más de los aminoácidos de región marco pueden sustituirse con otro aminoácido, tal como el aminoácido en la posición correspondiente en el anticuerpo Act-1 de ratón. La región constante humana o porción de la misma, si está presente, puede proceder de las cadenas ligeras κ o λ y/o las cadenas pesadas γ (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ , α , (por ejemplo, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ o ϵ de anticuerpos humanos, incluyendo variantes alélicas. Puede seleccionarse una región constante particular (por ejemplo, IgG1), variante o porciones de la misma para confeccionar la función efectora. Por ejemplo, puede

incorporarse una región constante mutada (variante) en una proteína de fusión para minimizar la unión a receptores de Fc y/o la capacidad para fijar el complemento (véase por ejemplo, Winter *et al.*, documento GB 2.209.757 B; Morrison *et al.*, documento WO 89/07142; Morgan *et al.*, documento WO 94/29351, 22 de diciembre de 1994). Se describieron versiones humanizadas de anticuerpo Act-1 en las publicaciones PCT nos. WO98/06248 y WO07/61679.

Los anticuerpos humanizados anti- $\alpha 4\beta 7$ descritos en la presente memoria comprenden una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID No: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 20 a 131 de la SEQ ID No: 4, o los aminoácidos 21 a 132 de la SEQ ID No: 5. Si se desea, puede estar presente una región o regiones constantes humanas adecuadas. Por ejemplo, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizado puede comprender una cadena pesada que comprende los aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID No: 2 y una cadena ligera que comprende los aminoácidos 21 a 239 de la SEQ ID No: 5. En otro ejemplo, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizado puede comprender una cadena pesada que comprende los aminoácidos 20 a 470 de la SEQ ID No: 2 y una cadena ligera que comprende los aminoácidos 20 a 238 de la SEQ ID No: 4. La Figura 4 muestra un alineamiento que compara las cadenas ligeras genéricas de los anticuerpos humanos con los anticuerpos murinos. El alineamiento ilustra que la cadena ligera humanizada del vedolizumab (por ejemplo, número de Registro del Chemical Abstract Service (CAS, American Chemical Society) 943609-66-3), con dos restos de ratón cambiados por restos humanos, es más humana que la cadena ligera de LDP-02 (Figura 3). Además, el LDP-02 tiene la alanina flexible algo hidrófoba 114 y un sitio hidrófilo (Aspartato 115) que se sustituye en el vedolizumab con la treonina que contiene hidroxilo ligeramente hidrófila 114 y el resto de valina hidrófobo potencialmente de cara hacia el interior 115.

Las sustituciones adicionales en la secuencia de anticuerpo pueden ser, por ejemplo, mutaciones en las regiones marco de cadena pesada y ligera, tales como una mutación de isoleucina a valina en el resto 2 de la SEQ ID No: 14; una mutación de metionina a valina en el resto 4 de la SEQ ID No: 14; una mutación de alanina a glicina en el resto 24 de la SEQ ID No: 15; una mutación de arginina a lisina en el resto 38 de la SEQ ID No: 15; una mutación de alanina a arginina en el resto 40 de la SEQ ID No: 15; una mutación de metionina a isoleucina en el resto 48 de la SEQ ID No: 15; una mutación de isoleucina a leucina en el resto 69 de la SEQ ID No: 15; una mutación de arginina a valina en el resto 71 de la SEQ ID No: 15; una mutación de treonina a isoleucina en el resto 73 de la SEQ ID No: 15; o cualquier combinación de las mismas; y sustitución de las CDR de cadena pesada con las CDR (CDR1, SEQ ID No: 8, CDR2, SEQ ID No: 9 y CDR3, SEQ ID No: 10) del anticuerpo Act-1 de ratón; y sustitución de las CDR de cadena ligera con las CDR de cadena ligera (CDR1, SEQ ID No: 11, CDR2, SEQ ID No: 12 y CDR3, SEQ ID No: 13) del anticuerpo Act-1 de ratón.

Los anticuerpos humanizados anti- $\alpha 4\beta 7$ descritos en la presente memoria comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con los aminoácidos 20 a 140 de la SEQ ID No: 2, y una región variable de cadena ligera que tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con los aminoácidos 20 a 131 de la SEQ ID No: 4 o los aminoácidos 21 a 132 de la SEQ ID No: 5. La identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse usando un algoritmo de alineamiento de secuencias adecuado, tal como el sistema Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), usando los parámetros por defecto. En una realización, el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ para su uso en la formulación es vedolizumab (número de Registro de CAS, American Chemical Society, 943609-66-3).

También pueden usarse otros anticuerpos de $\alpha 4\beta 7$ en las formulaciones y regímenes de dosificación descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos de $\alpha 4\beta 7$ descritos en el documento US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), son adecuados para su uso en las formulaciones y métodos de tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino en un individuo.

El anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ descrito en la presente memoria puede producirse por expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican cada cadena en células vivas, por ejemplo, células en cultivo. Pueden utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de hospedador-expresión representan vehículos mediante los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ *in situ*. Estas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con vectores de expresión recombinantes de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K de virus vaccinia). Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal de citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking *et al.*, *Gene* 45: 101 (1986); Cockett *et al.*, *BioTechnology* 8: 2 (1990)).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso deseado para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, *EMBO J.* 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante de anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en fase de lectura con la región codificante de lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a perlas de agarosa con glutatión de matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión por proteasas de trombina o factor Xa, de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insecto, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la poliedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

En células hospedadoras de mamífero pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés puede ligarse con un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan y Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 355-359 (1984)). También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción y codones de inicio exógenos pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de expresión puede aumentarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153: 51-544 (1987)).

Además, puede seleccionarse una cepa de célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación post-traducciona de proteínas y productos génicos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Con este fin pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para un procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), NS0, HeLa, VERY, de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón de mono (COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y línea celular de glándula mamaria normal tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

La maquinaria de glicosilación de diferentes tipos celulares puede producir anticuerpos con diferente composición de glicosilación que, en otro tipo celular, o ninguna glicosilación, como con células bacterianas. En un aspecto, los tipos celulares para la producción del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ son células de mamífero, tales como células NS0 o CHO. En un aspecto, las células de mamífero pueden comprender la eliminación de una enzima implicada en el metabolismo celular y el gen de interés exógeno puede unirse operativamente a una enzima de sustitución, por ejemplo, en una construcción o vector para su introducción en las células, por ejemplo, por transformación o transfección. La construcción o vector con el gen exógeno confiere a las células que alojan la construcción o vector una ventaja de selección para fomentar la producción del polipéptido codificado por el gen exógeno. En una realización, las células CHO son células DG44 (Chasin y Urlaub (1980) PNAS USA 77: 4216), que comprenden la eliminación o inactivación del gen de la dihidrofolato reductasa. En otra realización, las células CHO son células CHO K1 que comprenden la eliminación o inactivación del gen de la glutamina sintasa (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.122.464 o 5.827.739).

60 Formulaciones Sólidas

Las formulaciones sólidas descritas en la presente memoria se preparan generalmente por secado de una formulación líquida. Puede usarse cualquier método de secado adecuado, tal como liofilización o secado por pulverización. La liofilización implica congelar una formulación líquida, habitualmente en el recipiente que se usará para almacenar, enviar y distribuir la formulación (por ejemplo, un vial) (Véase, por ejemplo, Gatlin y Nail en Protein Purification Process Engineering, ed. Roger G. Harrison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994)). Una vez que se congela la formulación, la presión atmosférica se reduce y la temperatura se ajusta para permitir la eliminación del disolvente congelado, por ejemplo, por

sublimación. Esta etapa del proceso de liofilización se denomina a veces secado primario. Si se desea, la temperatura puede aumentarse entonces para eliminar cualquier disolvente que esté todavía unido a la formulación seca por evaporación. Esta etapa de proceso de liofilización se denomina a veces secado secundario. Cuando la formulación ha alcanzado el grado de sequedad deseado, el proceso de secado se concluye y los recipientes se cierran herméticamente. La formulación sólida final se denomina a veces una "formulación liofilizada" o una "torta". El proceso de liofilización puede realizarse usando cualquier equipamiento adecuado. Está disponible un equipamiento de liofilización adecuado de varias fuentes comerciales (por ejemplo, SP Scientific, Stone Ridge, NY).

Pueden usarse una diversidad de aparatos adecuados para secar formulaciones líquidas para producir una formulación sólida (por ejemplo, liofilizada). En general, los expertos en la materia preparan formulaciones liofilizadas usando una cámara cerrada herméticamente que contiene baldas sobre las que se ponen viales de la formulación líquida a secar. La temperatura de las baldas, así como la velocidad de enfriamiento y calentamiento pueden controlarse, al igual que la presión en el interior de la cámara. Se entenderá que diversos parámetros de proceso analizados en la presente memoria se refieren a procesos realizados usando este tipo de aparato. Los expertos en la materia pueden adaptar fácilmente los parámetros descritos en la presente memoria a otros tipos de aparatos de secado si se desea.

Las temperaturas y la cantidad de vacío adecuados para el secado primario y secundario pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia. En general, la formulación se congela a una temperatura de aproximadamente -30°C o menos, tal como -40°C o -50°C . La velocidad de enfriamiento puede afectar la cantidad y al tamaño de los cristales de hielo en la matriz. El secado primario se realiza generalmente a una temperatura que es aproximadamente 10°C , aproximadamente 20°C , aproximadamente 30°C , aproximadamente 40°C o aproximadamente 50°C más cálida que la temperatura de congelación. En un aspecto, las condiciones de secado primario pueden ajustarse para mantener el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ por debajo de la temperatura de transición vítrea o temperatura de colapso de la formulación. Por encima de la temperatura de colapso, la matriz congelada amorfa puede fluir (colapsar), dando como resultado que las moléculas de proteína puedan no estar rodeadas por una matriz sólida rígida y que las moléculas de proteína puedan no ser estables en la matriz colapsada. Además, la formulación puede ser difícil de secar completamente si se produce el colapso. Las mayores cantidades de humedad resultantes en la formulación pueden conducir a mayores velocidades de degradación de proteína y a una disminución en la cantidad de tiempo que el producto liofilizado puede almacenarse antes de que su calidad disminuya hasta niveles inaceptables. En un aspecto, la temperatura de balda y la presión de la cámara se seleccionan para mantener la temperatura del producto por debajo de la temperatura de colapso durante el secado primario. La temperatura de transición vítrea de una formulación congelada puede medirse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por calorimetría diferencial de barrido (DSC). La temperatura de colapso puede medirse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, microscopía de secado por congelación. La proporción de azúcar no reductor respecto a proteína (mol:mol) y las cantidades de otros componentes de la formulación afectarán a la temperatura de transición vítrea y a la temperatura de colapso. En algunas realizaciones, una temperatura de transición vítrea para una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -35°C a aproximadamente -10°C , de aproximadamente -35°C a aproximadamente -25°C o de aproximadamente -35°C a aproximadamente -29°C . En otra realización, la temperatura de transición vítrea de una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -29°C . En algunas realizaciones, la temperatura de transición vítrea de una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -30°C , aproximadamente -31°C , aproximadamente -32°C , aproximadamente -33°C , aproximadamente -34°C , aproximadamente -35°C o aproximadamente -36°C . En algunas realizaciones, una temperatura de colapso de una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -30°C a aproximadamente 0°C , de aproximadamente -28°C a aproximadamente -25°C o de aproximadamente -20°C a aproximadamente -10°C . En otra realización, la temperatura de colapso de una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -26°C . Sin limitarse a ninguna teoría en particular, cuanto más rápida sea la velocidad de aumento gradual, mayor será la temperatura de colapso del producto. La etapa de secado primario puede eliminar al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70% o más del disolvente. En un aspecto, la etapa de secado primario elimina más del 80% del disolvente de la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

El secado primario depende de la temperatura de balda y de la presión. Las condiciones para el secado primario pueden determinarse empíricamente con la liofilización bajo parámetros de proceso diferentes. El secado primario también puede modelarse matemáticamente basándose en la temperatura de producto. Las ecuaciones de transferencia de masa y de calor (Milton, et al. (1997) *PDA J of Pharm Sci & Tech*, 51: 7-16), acopladas con los conocimientos de R_p y K_v , permiten comprender la combinación e interacción de las variables de entrada, incluyendo variables de entrada de proceso tales como la temperatura de balda y la presión, y las variables de formulación que están capturadas en el valor R_p . Estos modelos pueden contribuir a determinar los parámetros a usar para un proceso eficaz basándose en las limitaciones de la temperatura de producto por la temperatura de colapso y la capacidad del equipo.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A_p (P_o - P_c)}{R_p}$$

Ecuación 1

$$\ln P_o = -6144,96/T_p + 24,0185$$

Ecuación 2

$$\frac{dQ}{dt} = A_v K_v (T_s - T_p)$$

Ecuación 3

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H_s \frac{dm}{dt}$$

Ecuación 4

La Ecuación 1 se refiere a la velocidad de sublimación (dm/dt) durante el secado primario respecto al área transversal interna del recipiente (A_p), la presión de vapor de hielo (P_o), la presión de la cámara (P_c) y una resistencia de transferencia de masa normalizada por el área para la torta y el tapón (R_p). La P_o en la superficie de contacto de sublimación puede determinarse a partir de la Ecuación 2, en la que P_o se refiere a la temperatura del hielo de producto en la superficie de contacto de sublimación, que es una aproximación de la temperatura de producto (T_p), que puede medirse con un termopar en la parte inferior del vial o puede obtenerse de las ecuaciones anteriores cuando se determinan las otras variables. La Ecuación 3 se refiere a la velocidad de transferencia de calor de la balda a los viales, en la que A_v es el área del vial, K_v es el coeficiente de transferencia de calor del vial, T_s es la temperatura de la balda y T_p es la temperatura de producto. La Ecuación 4 acopla las ecuaciones de transferencia de calor y de masa, en la que ΔH_s es el calor de sublimación.

Como se observa a partir de las ecuaciones para el secado primario, la temperatura de balda (T_s), la temperatura de producto (T_p), la presión de la cámara (P_c), la resistencia de transferencia de masa de la torta (R_p) y el coeficiente de transferencia de calor (K_v) pueden afectar a la velocidad de sublimación.

Una etapa opcional después de la congelación y antes del secado primario es el atemperado. En esta etapa la temperatura de balda del liofilizador se aumenta por encima de la transición vítrea de la formulación durante un periodo de tiempo corto, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 6 horas, de aproximadamente 3 a 5 horas, o de aproximadamente 4 horas, después la temperatura de balda se disminuye de nuevo por debajo de la temperatura de transición vítrea de la formulación. El atemperado puede usarse para cristalizar agentes formadores de volumen y para formar cristales de hielo más grandes y más uniformes. El proceso de atemperado puede afectar al tiempo de reconstitución porque la torta seca atemperada tiene un área superficial superior que la torta seca no atemperada. Una etapa de atemperado de una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ puede ser a de aproximadamente -30°C a aproximadamente -10°C o de aproximadamente -25°C a aproximadamente -15°C . En un aspecto, una temperatura de atemperado para una formulación de anticuerpo de $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente -20°C .

El secado secundario se realiza generalmente a una temperatura que está por encima de la temperatura de congelación de la formulación líquida. Por ejemplo, el secado secundario puede realizarse a aproximadamente 10°C , aproximadamente 20°C , aproximadamente 30°C , aproximadamente 40°C o aproximadamente 50°C . En un aspecto, la temperatura para el secado secundario es la temperatura ambiental, por ejemplo, $20-30^\circ\text{C}$. El tiempo para el secado secundario debería ser suficiente para reducir la cantidad de humedad hasta $<5\%$.

El ciclo de liofilización puede incluir incluye congelación a aproximadamente -45°C , atemperado a aproximadamente -20°C , recongelación a aproximadamente -45°C , secado primario a aproximadamente -24°C y 150 mTorr y secado secundario a aproximadamente 27°C y 150 mTorr.

La R_p se ve afectada por el contenido de sólidos del DP congelado y por el historial térmico del DP (fases de congelación, atemperado y recongelación) que afecta a la estructura de poro de la torta. El historial térmico también puede afectar a la fase de secado secundario, en la que un área superficial mayor puede contribuir a la desorción de agua (Pikal, et al. (1990) Int. J. Pharm., 60: 203-217). Pueden ser parámetros de proceso útiles para controlar durante las fases de liofilización primaria y secundaria la temperatura de balda y la presión de la cámara durante cada fase del ciclo de secado. Para el aumento a escala, la carga de la secadora por congelación y el contenido de sólidos pueden afectar al ciclo de secado. El tiempo de secado primario puede verse afectado por el contenido de sólidos en la formulación. A mayor contenido de sólidos, por ejemplo, cuando las concentraciones de sólidos globales (excipientes y/o proteína) varían más del 10% p/v o más del 15% p/v, por ejemplo, una varianza del 50 al 100% de formulaciones cuyo tiempo de secado se determina, el tiempo de secado puede verse afectado. Por ejemplo, una formulación de alto contenido de sólidos puede tener un tiempo de secado más prolongado que una formulación de bajo contenido de sólidos. En algunas realizaciones, el porcentaje de uso de la capacidad de la secadora por congelación puede variar de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 100%. A mayor % de capacidad de carga, el tiempo de secado primario puede aumentar hasta 2 veces en comparación con un % de capacidad de carga menor. Las diferencias entre los tiempos de secado primario a diferente % de carga aumentan a medida que aumenta el contenido de sólidos. En una realización, el contenido de sólidos es menor del 20-25% y la carga es del 25-100%.

El tamaño del vial puede seleccionarse basándose en el área superficial que estará expuesta a la balda y al vacío durante la liofilización. El tiempo de secado es directamente proporcional a la altura de la torta, por lo tanto, el tamaño del vial puede seleccionarse basándose en lo que se determine que es una altura de torta razonable. Un vial con un gran diámetro respecto al volumen puede proporcionar una cantidad elevada de contacto con la balda para una transferencia de calor eficaz durante el ciclo de liofilización. Una solución de anticuerpo diluida en un gran volumen de líquido requerirá más tiempo para el secado. Debe encontrarse un equilibrio en el tamaño del vial frente al volumen de formulación, porque los viales de mayor tamaño pueden ser más caros de almacenar y enviar y pueden tener una mayor proporción de espacio de cabeza respecto a la formulación y pueden exponer una elevada proporción de la formulación a los efectos degradantes de la humedad durante el almacenamiento a largo plazo. Para una dosis de 300 mg, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede tener un volumen de 3 ml, 5 ml, 6 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml o 100 ml antes de la liofilización. En un aspecto, el tamaño de vial es de 20 ml para una solución de 60 mg/ml en una dosis de 300 mg.

Después de la liofilización, el vial puede cerrarse herméticamente, por ejemplo, taponarse, al vacío. Como alternativa, puede introducirse un gas, por ejemplo, aire seco o nitrógeno, en el vial antes del cierre hermético. Cuando preocupa la oxidación, el gas introducido en la cámara de liofilización puede comprender un gas que retrase o prevenga la oxidación del producto liofilizado. En un aspecto el gas es un gas no oxigenado, por ejemplo, nitrógeno o un gas inerte, por ejemplo, helio, neón, argón, kriptón o xenón. En otro aspecto, el gas es nitrógeno o argón.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el volumen de la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ pre-liofilización es el mismo que el volumen de solución reconstituida pre-administración. Por ejemplo, una formulación que es de aproximadamente 5,5 ml pre-liofilización puede reconstituirse hasta un volumen de aproximadamente 5,5 ml mediante la adición de una cantidad de líquido, por ejemplo, agua o solución salina, que tiene en cuenta el volumen de los sólidos secos. En otras realizaciones, puede ser deseable liofilizar la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en un volumen diferente que el volumen de solución reconstituido. Por ejemplo, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede liofilizarse como una solución diluida, por ejemplo 0,25x, 0,5x o 0,75x y reconstituirse hasta 1x mediante la adición de menos líquido, por ejemplo, el 75% menos, la mitad o el 25% menos que el volumen pre-liofilización. En una realización, una dosis de 300 mg puede liofilizarse como una solución de anticuerpo 30 mg/ml en sacarosa al 5% y reconstituirse hasta una solución de anticuerpo 60 mg/ml en sacarosa al 10%. Como alternativa, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ liofilizada puede reconstituirse en una solución más diluida que la formulación pre-liofilizada.

Tratamiento con la formulación de anticuerpo

Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto comprende administrar a un sujeto la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ descrita en la presente memoria en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o trastorno, por ejemplo, en seres humanos. El sujeto humano puede ser un adulto (por ejemplo, de 18 o más años de edad), un adolescente o un niño. El sujeto humano puede ser una persona de 65 o más años de edad. Al contrario que los regímenes de dosificación terapéuticos alternativos, un sujeto humano de 65 o más años de edad no requiere ninguna modificación del régimen de dosificación descrito en la presente memoria, y se le puede administrar la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ convencional descrita en la presente memoria.

El sujeto puede haber tenido una falta de respuesta adecuada con, una pérdida de respuesta a, o haber sido intolerante al tratamiento con un inmunomodulador, un antagonista de TNF- α o combinaciones de los mismos. El paciente puede haber recibido previamente tratamiento con al menos un corticosteroide (por ejemplo, prednisona) para la enfermedad inflamatoria del intestino. Una respuesta inadecuada a corticosteroides se refiere a signos y síntomas de enfermedad persistentemente activa a pesar de un historial de al menos un régimen de inducción de 4 semanas, que incluía una dosis equivalente a 30 mg de prednisona diaria por vía oral durante 2 semanas o por vía intravenosa durante 1 semana. Una pérdida de respuesta a corticosteroides se refiere a dos intentos fallidos de disminuir progresivamente los corticosteroides hasta por debajo de una dosis equivalente a 10 mg de prednisona diaria por vía oral. La intolerancia de corticosteroides

incluye un historial de síndrome de Cushing, osteopenia/osteoporosis, hiperglucemia, insomnio y/o infección.

Un inmunomodulador puede ser, por ejemplo, azatioprina oral, 6-mercaptopurina o metotrexato. Una respuesta inadecuada a un inmunomodulador se refiere a signos y síntomas de enfermedad persistentemente activa a pesar de un historial de al menos un régimen de 8 semanas o azatioprina oral ($\geq 1,5$ mg/kg), 6-mercaptopurina ($\geq 0,75$ mg/kg) o metotrexato ($\geq 12,5$ mg/semana). La intolerancia de un inmunomodulador incluye, pero sin limitación, náuseas/vómitos, dolor abdominal, pancreatitis, anomalías de LFT, linfopenia, mutación genética de TPMT y/o infección.

El sujeto puede haber tenido una falta de una respuesta adecuada con, pérdida de respuesta a, o haber sido intolerante al tratamiento con un antagonista de TNF- α . Un antagonista de TNF- α es, por ejemplo, un agente que inhibe la actividad biológica de TNF- α y preferentemente se une a TNF- α , tal como un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, REMICADE (infliximab), HUMIRA (adalimumab), CIMZIA (certolizumab pegol), SIMPONI (golimumab) o una proteína de fusión con receptor circulante tal como ENBREL (etanercept). Una respuesta inadecuada a un antagonista de TNF- α se refiere a signos y síntomas de enfermedad persistentemente activa a pesar de un historial de al menos un régimen de inducción de 4 semanas de infliximab 5 mg/kg IV, 2 dosis separadas por al menos 2 semanas; una dosis subcutánea de 80 mg de adalimumab, seguida de una dosis de 40 mg separada por al menos dos semanas; o 400 mg por vía subcutánea de certolizumab pegol, 2 dosis separadas por al menos 2 semanas. Una pérdida de respuesta a un antagonista de TNF- α se refiere a la reaparición de los síntomas durante la dosificación de mantenimiento después de un beneficio clínico previo. La intolerancia de un antagonista de TNF- α incluye, pero sin limitación, una reacción relacionada con la infusión, desmielinización, insuficiencia cardíaca congestiva y/o infección.

Una pérdida del mantenimiento de la remisión, como se usa en la presente memoria para sujetos con colitis ulcerosa, se refiere a un aumento en la puntuación de Mayo de al menos 3 puntos y una Puntuación de Baron Modificada de al menos 2.

Las formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ descritas en la presente memoria pueden comprender anticuerpo que (1) puede unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*; y (2) puede modular una actividad o función de una integrina $\alpha 4\beta 7$, tal como (a) la función de unión (por ejemplo, la capacidad de la integrina $\alpha 4\beta 7$ para unirse a MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), fibronectina y/o VCAM-1) y/o (b) la función de infiltración con leucocitos, incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en tejidos (por ejemplo, la capacidad para inhibir la migración de linfocitos hacia el tejido de la mucosa intestinal). En una realización, un anticuerpo en la formulación puede unirse a una integrina $\alpha 4\beta 7$ y puede inhibir la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a uno o más de sus ligandos (por ejemplo, MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), VCAM-1, fibronectina), inhibiendo de este modo la infiltración con leucocitos de tejidos (incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en tejidos). En otra realización, un anticuerpo en la formulación puede unirse a una integrina $\alpha 4\beta 7$ y puede inhibir selectivamente la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a uno o más de sus ligandos (por ejemplo, MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), VCAM-1, fibronectina), inhibiendo de este modo la infiltración con leucocitos de tejidos (incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en tejidos). Dichas formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ pueden inhibir la adhesión celular de células que llevan una integrina $\alpha 4\beta 7$ a células endoteliales vasculares en tejidos mucosos, incluyendo tejidos asociados al intestino, órganos linfoides o leucocitos (especialmente linfocitos tales como células T o B) *in vitro* y/o *in vivo*. En otra realización más, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de la presente invención puede inhibir la interacción de $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) y/o fibronectina. En todavía otra realización más, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de la presente invención puede inhibir la interacción de $\alpha 4\beta 7$ con MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) y/o fibronectina selectivamente, por ejemplo, sin inhibir la interacción de $\alpha 4\beta 7$ con VCAM.

Las formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ descritas en la presente memoria pueden usarse para modular (por ejemplo, inhibir (reducir o prevenir)) la función de unión y/o la función de infiltración con leucocitos (por ejemplo, linfocitos, monocitos) de la integrina $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, pueden administrarse inmunoglobulinas humanizadas que inhiben la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando (es decir, uno o más ligandos) de acuerdo con el método en el tratamiento de enfermedades asociadas con la infiltración con leucocitos (por ejemplo, linfocitos, monocitos) de tejidos (incluyendo el reclutamiento y/o la acumulación de leucocitos en tejidos), particularmente de tejidos que expresan la molécula MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1).

Una cantidad eficaz de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (es decir, una o más) puede administrarse a un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano u otro primate) para tratar dicha enfermedad. Por ejemplo, enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedades que están asociadas con la infiltración con leucocitos del tracto gastrointestinal (incluyendo el endotelio asociado al intestino), otros tejidos mucosos o tejidos que expresan la molécula MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) (por ejemplo, tejidos asociados al intestino tales como vénulas de la lámina propia del intestino delgado y grueso; y glándula mamaria (por ejemplo, glándula mamaria en lactación)), pueden tratarse de acuerdo con el presente método. De forma similar, un individuo que tenga una enfermedad asociada con la infiltración con leucocitos de tejidos como resultado de la unión de leucocitos a células (por ejemplo, células endoteliales) que expresen MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) puede tratarse de acuerdo con la presente invención.

Las enfermedades que pueden tratarse incluyen por consiguiente la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, ileítis, enfermedad celíaca, Sprue no tropical, enteropatía asociada con artropatías

seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis eosinófila o bursitis resultante después de proctocolectomía y anastomosis ileoanal. Preferentemente, la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa puede ser una colitis ulcerosa de moderada a gravemente activa. El tratamiento puede dar como resultado la cicatrización de la mucosa en pacientes que padecen una colitis ulcerosa de moderada a gravemente activa. El tratamiento también puede dar como resultado una reducción, eliminación o reducción y eliminación del uso de corticosteroides por el paciente.

La pancreatitis y la diabetes mellitus insulino dependiente son otras enfermedades que pueden tratarse usando las formulaciones de la invención. Se ha descrito que el MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) se expresa por algunos vasos en el páncreas exocrino de ratones NOD (diabéticos no obesos), así como de ratones BALB/c y SJL. La expresión de MAdCAM-1 se inducía según se dice en el endotelio en islotes inflamados del páncreas de los ratones NOD, y el MAdCAM-1 era la adhesina predominante expresada por el endotelio de islotes de NOD en fases tempranas de insulinitis (Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)). El tratamiento de ratones NOD con anticuerpos anti-MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) o anti $\beta 7$ prevenía el desarrollo de diabetes (Yang *et al.*, *Diabetes*, 46: 1542-1547 (1997)). Además, se observó la acumulación de linfocitos que expresaban $\alpha 4\beta 7$ dentro de los islotes, y el MAdCAM-1 estaba implicado en la unión de células de linfoma mediante $\alpha 4\beta 7$ a vasos de islotes inflamados (Hanninen, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)) o al tracto gastrointestinal en el linfoma de células del manto (Geissmann *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 153: 1701-1705 (1998)).

Los ejemplos de enfermedades inflamatorias asociadas con tejidos mucosos que pueden tratarse usando una formulación de la invención incluyen colecistitis, colangitis (Adams y Eksteen *Nature Reviews* 6: 244-251 (2006) Grant *et al.*, *Hepatology* 33: 1065-1072 (2001)), por ejemplo, colangitis esclerosante primaria, enfermedad de Behcet, por ejemplo, del intestino, o pericolangitis (conductos biliares y tejido circundante del hígado) y enfermedad de injerto contra huésped (por ejemplo, en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, después de un trasplante de médula ósea) (Petrovic *et al.* *Blood* 103: 1542-1547 (2004)). Como se observa en la enfermedad de Crohn, la inflamación con frecuencia se extiende más allá de la superficie de la mucosa, por consiguiente, enfermedades inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, gastritis crónica, por ejemplo, gastritis autoinmunitaria (Katakai *et al.*, *Int. Immunol.*, 14: 167-175 (2002)) y otras afecciones idiopáticas pueden ser susceptibles de tratamiento.

En la presente memoria se describe un método para inhibir la infiltración con leucocitos del tejido mucoso. En la presente memoria se describe un método para tratar el cáncer (por ejemplo, un tumor positivo para $\alpha 4\beta 7$, tal como un linfoma). Otros ejemplos de enfermedades inflamatorias asociadas con tejidos mucosos que pueden tratarse usando una formulación de la invención incluyen mastitis (glándula mamaria) y síndrome de intestino irritable.

Las enfermedades o patógenos cuyas etiologías aprovechan la interacción de MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) con $\alpha 4\beta 7$ pueden tratarse con un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en una formulación descrita en la presente memoria. Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen trastornos de inmunodeficiencia, tales como los causados por el virus de la inmunodeficiencia humana (véase, por ejemplo, el documento WO2008140602).

Una formulación de la invención se administra en una cantidad eficaz que inhibe la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a un ligando de la misma. Para terapia, una cantidad eficaz será suficiente para conseguir el efecto terapéutico (incluyendo profiláctico) deseado (tal como una cantidad suficiente para reducir o impedir la unión y/o la señalización mediada por la integrina $\alpha 4\beta 7$, inhibiendo de este modo la adhesión y la infiltración de leucocitos y/o las respuestas celulares asociadas). Una cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo, un título eficaz suficiente para mantener la saturación, por ejemplo, neutralización de integrina $\alpha 4\beta 7$ puede inducir la respuesta clínica o la remisión en la enfermedad inflamatoria del intestino. Una formulación de la invención puede administrarse en una dosis unitaria o en múltiples dosis. La dosificación puede determinarse por métodos conocidos en la técnica y puede depender, por ejemplo, de la edad, sensibilidad, tolerancia y bienestar global del individuo. Los ejemplos de modos de administración incluyen vías tópicas tales como la administración nasal o por inhalación o transdérmica, vías enterales, tales como mediante una sonda nasogástrica o supositorio, y vías parenterales, tales como la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal o intravítrea. Las dosificaciones adecuadas para anticuerpos pueden ser de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal por tratamiento, por ejemplo, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, o de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5 mg/kg. En realizaciones particulares, la dosis administrada es de aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 8 mg/kg, de aproximadamente 9 mg/kg o de aproximadamente 10 mg/kg.

Una dosis de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de 300 mg puede diluirse en una solución de dextrosa al 5% o solución salina de 250 ml para su administración.

En algunos aspectos, el régimen de dosificación tiene dos fases, una fase de inducción y una fase de mantenimiento. En la fase de inducción, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se administra de tal manera que proporciona rápidamente una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo adecuada para

ciertos fines, tales como inducir inmunotolerancia al anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o para inducir una respuesta clínica y mitigar los síntomas de la enfermedad inflamatoria del intestino. Se puede administrar a un paciente un tratamiento de fase de inducción cuando se trata en primer lugar mediante un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, cuando se trata después de una larga ausencia de la terapia, por ejemplo, más de tres meses, más de cuatro meses, más de seis meses, más de nueve meses, más de un año, más de dieciocho meses o más de dos años desde una terapia con anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o durante la fase de mantenimiento de la terapia con anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ si ha habido una reaparición de los síntomas de la enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, una recidiva de la remisión de la enfermedad. En algunas realizaciones, el régimen de fase de inducción da como resultado una mayor concentración en suero valle media, por ejemplo, la concentración justo antes de la siguiente dosis, que la concentración en suero valle en estado estacionario media mantenida durante el régimen de mantenimiento.

En la fase de mantenimiento, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se administra de tal manera que continúa la respuesta conseguida mediante la terapia de inducción con un nivel estable de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Un régimen de mantenimiento puede evitar la reaparición de los síntomas o la recidiva de la enfermedad inflamatoria del intestino. Un régimen de mantenimiento puede proporcionar comodidad al paciente, por ejemplo, ser un régimen de dosificación simple o requerir desplazamientos infrecuentes para el tratamiento. En algunas realizaciones, el régimen de mantenimiento puede incluir la administración del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, en una formulación descrita en la presente memoria mediante una estrategia seleccionada entre el grupo que consiste en dosis baja, administración infrecuente, autoadministración y una combinación de cualquiera de los anteriores.

En una realización, por ejemplo, durante una fase de inducción de la terapia, el régimen de dosificación proporciona una cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o fragmento de unión al antígeno en una formulación descrita en la presente memoria para inducir la remisión de una enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente humano. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es suficiente para conseguir de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 60 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 15 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 45 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 25 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 35 $\mu\text{g/ml}$ de concentración en suero valle media del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ al final de la fase de inducción. La duración de la fase de inducción puede ser aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente cinco semanas, aproximadamente seis semanas, aproximadamente siete semanas o aproximadamente ocho semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, el régimen de inducción puede utilizar una estrategia seleccionada entre el grupo que consiste en dosis alta, administración frecuente y una combinación de dosis alta y administración frecuente del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ o fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, en una formulación descrita en la presente memoria. La dosificación de inducción puede ser una vez o una pluralidad de más de una dosis, por ejemplo, al menos dos dosis. Durante la fase de inducción, una dosis se puede administrar una vez al día, día sí día no, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada diez días, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En algunas realizaciones, las dosis de inducción se administran en el intervalo de las primeras dos semanas de terapia con el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En una realización, la dosificación de inducción puede ser una vez al inicio del tratamiento (día 0) y una vez aproximadamente dos semanas después del inicio del tratamiento. En otra realización, la duración de la fase de inducción es de seis semanas. En otra realización, la duración de la fase de inducción es de seis semanas y se administra una pluralidad de dosis de inducción durante las primeras dos semanas.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando se inicia el tratamiento de un paciente con enfermedad grave inflamatoria del intestino (por ejemplo, en pacientes en los que ha fracasado la terapia anti- $\text{TNF}\alpha$), la fase de inducción necesita tener una duración más larga que para pacientes con una enfermedad leve o moderada. En algunas realizaciones, la fase de inducción para un paciente con enfermedad grave puede tener una duración de al menos 6 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 12 semanas o al menos 14 semanas. En una realización, un régimen de dosificación de inducción para un paciente con enfermedad grave puede incluir una dosis en la semana 0 (inicio del tratamiento), una dosis en la semana 2 y una dosis en la semana 6. En otra realización, un régimen de dosificación de inducción para un paciente con enfermedad grave puede comprender una dosis en la semana 0 (inicio del tratamiento), una dosis en la semana 2, una dosis en la semana 6 y una dosis en la semana 10.

En una realización, por ejemplo, durante una fase de mantenimiento de la terapia, el régimen de dosificación mantiene una concentración en suero valle en estado estacionario media, por ejemplo, la concentración de meseta justo antes de la siguiente dosis, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 9 a aproximadamente 13 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En otra realización, el régimen de dosificación, por ejemplo, durante una fase de mantenimiento de la terapia, mantiene una concentración en suero valle en estado estacionario media de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 20 a aproximadamente 55 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

La dosis puede administrarse una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada 10 semanas. Una dosis superior o más

frecuente, por ejemplo, una vez por semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez cada 4 semanas puede ser útil para inducir la remisión de una enfermedad activa o para tratar a un nuevo paciente, por ejemplo, para inducir tolerancia al anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Una dosis menos frecuente, por ejemplo, una vez cada 4 semanas, una vez cada 5 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 8 semanas o una vez cada 10 semanas puede ser útil para una terapia preventiva, por ejemplo, para mantener la remisión de un paciente con una enfermedad crónica. En un aspecto, el régimen de tratamiento es el tratamiento a día 0, aproximadamente en la semana 2, aproximadamente en la semana 6 y cada 4 u 8 semanas después de eso. En una realización, el régimen de mantenimiento incluye una dosis cada 8 semanas. En una realización, en la que un paciente en un régimen de mantenimiento de una dosis cada ocho semanas experimenta una vuelta de un o más síntomas de enfermedad, por ejemplo, tiene una recaída, la frecuencia de dosificación puede aumentarse, por ejemplo, a una vez cada 4 semanas.

La dosis puede administrarse al paciente en aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos o aproximadamente 40 minutos.

El régimen de dosificación puede optimizarse para inducir una respuesta clínica y la remisión clínica en la enfermedad inflamatoria del intestino del paciente. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación no altera la proporción de CD4 respecto a CD8 en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes que reciben tratamiento.

En algunos aspectos, puede conseguirse una remisión clínica duradera, por ejemplo, una remisión clínica que se mantiene durante al menos dos, al menos tres, al menos cuatro visitas con un médico adjunto en un periodo de seis meses o un año después de comenzar el tratamiento, con un régimen de dosificación optimizado.

En algunos aspectos, puede conseguirse una respuesta clínica duradera, por ejemplo, una respuesta clínica que se mantiene durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos un año después del inicio del tratamiento, con un régimen de dosificación optimizado.

En una realización, el régimen de dosificación comprende una dosis inicial de 300 mg, una segunda dosis posterior de 300 mg a aproximadamente dos semanas después de la dosis inicial, una tercera dosis posterior de 300 mg a aproximadamente seis semanas después de la dosis inicial, seguida de una cuarta dosis y dosis posteriores de 300 mg cada cuatro semanas o cada ocho semanas después de la tercera dosis posterior.

En algunas realizaciones, el método de tratamiento, la dosis o el régimen de dosificación reduce la probabilidad de que un paciente desarrolle una respuesta de HAHA contra el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. El desarrollo de HAHA, por ejemplo, según se mide por anticuerpos reactivos al anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, puede aumentar el aclaramiento del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo, reducir la concentración en suero del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, por ejemplo, disminuir el número de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ unido a integrina $\alpha 4\beta 7$, haciendo, por lo tanto, el tratamiento menos eficaz. En algunas realizaciones, para prevenir HAHA, el paciente se puede tratar con un régimen de inducción seguido por un régimen de mantenimiento. En algunas realizaciones no existe interrupción entre el régimen de inducción y el régimen de mantenimiento. En algunas realizaciones, el régimen de inducción comprende administrar una pluralidad de dosis de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ al paciente. Para prevenir HAHA, el paciente puede tratarse con una dosis inicial elevada, por ejemplo, de al menos 1,5 mg/kg, al menos 2 mg/kg, al menos 2,5 mg/kg, al menos 3 mg/kg, al menos 5 mg/kg, al menos 8 mg/kg, al menos 10 mg/kg o de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 mg/kg, o administraciones iniciales frecuentes, por ejemplo, aproximadamente una vez por semana, aproximadamente una vez cada dos semanas o aproximadamente una vez cada tres semanas, de la dosis convencional cuando se comienza la terapia con un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En algunas realizaciones, el método de tratamiento mantiene al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de los pacientes como negativos para HAHA. En otras realizaciones, el método de tratamiento mantiene a los pacientes como negativos para HAHA durante al menos 6 semanas, al menos 10 semanas, al menos 15 semanas, al menos seis meses, al menos 1 año, al menos 2 años o durante la duración de la terapia. En algunas realizaciones, los pacientes, o al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50% o al menos el 60% de los pacientes que desarrollan HAHA mantienen un bajo título, por ejemplo, ≤ 125 de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En una realización, el método de tratamiento mantiene a al menos el 70% de los pacientes como negativos para HAHA durante al menos 12 semanas después del comienzo de la terapia con un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

La formulación puede administrarse a un individuo (por ejemplo, un ser humano) en solitario o junto con otro agente. Una formulación de la invención puede administrarse antes, junto con o posterior a la administración del agente adicional. En una realización, se administra más de una formulación que inhibe la unión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ a sus ligandos. En dicha realización, puede administrarse un agente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal anti-MAdCAM (por ejemplo, anti-MAdCAM-1) o anti-VCAM-1. En otra realización, el agente adicional inhibe la unión de leucocitos a un ligando endotelial en una ruta diferente de la ruta de $\alpha 4\beta 7$. Dicho agente puede inhibir la unión, por ejemplo, de linfocitos que expresan receptor de quimiocina (motivo C-C) 9 (CCR9) a quimiocina expresada en timo (TECK o CCL25), o ser un agente que impide la unión de LFA-1 a la molécula de adhesión intercelular (ICAM). Por ejemplo, un anticuerpo anti-TECK o anti-CCR9 o un inhibidor molecular pequeño de CCR9, tales como los inhibidores descritos en la publicación PCT WO03/099773 o WO04/046092, o un anticuerpo anti-ICAM-1 o un oligonucleótido que impide la expresión de ICAM, se administra además de una formulación de la presente invención. En otra realización más, puede administrarse un ingrediente activo adicional (por ejemplo, un compuesto antiinflamatorio, tal como sulfasalazina,

azatioprina, 6-mercaptopurina, antiinflamatorios que contienen ácido 5-aminosalicílico, otro compuesto antiinflamatorio no esteroideo, un compuesto antiinflamatorio esteroideo o antibióticos comúnmente administrados para el control de la IBD (por ejemplo, ciprofloxacino, metronidazol) u otro agente biológico (por ejemplo, antagonistas de TNF alfa) junto con una formulación de la presente invención.

5

En una realización, la dosis de la medicación coadministrada puede disminuirse con el tiempo durante el periodo de tratamiento mediante la formulación que comprende el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, un paciente que se está tratando con un esteroide (por ejemplo, prednisona, prednisolona) al comienzo, o antes del tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ experimentaría un régimen de dosis decrecientes de esteroide comenzando tan pronto como a las 6 semanas de tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La dosis de esteroide se reducirá en aproximadamente el 25% en el plazo de 4-8 semanas de iniciarse la disminución progresiva, en el 50% a las aproximadamente 8-12 semanas y el 75% a las aproximadamente 12-16 semanas de la disminución progresiva durante el tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En un aspecto, hacia aproximadamente las 16-24 semanas de tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, la dosis de esteroide puede eliminarse. En otro ejemplo, un paciente que se está tratando con un compuesto antiinflamatorio, tal como 6-mercaptopurina al comienzo o antes del tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ experimentaría un régimen de dosis decrecientes de compuesto antiinflamatorio similar al régimen de disminución progresiva para la dosificación de esteroide que se ha señalado anteriormente.

10

15

20

25

En una realización, el método comprende administrar una cantidad eficaz de una formulación de la invención a un paciente. Si la formulación está en un estado sólido, por ejemplo, seco, el proceso de administración puede comprender una etapa de convertir la formulación en un estado líquido. En un aspecto, una formulación seca puede reconstituirse, por ejemplo, mediante un líquido como se ha descrito anteriormente, para su uso en la inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En otro aspecto, una formulación sólida o seca puede administrarse por vía tópica, por ejemplo, en un parche, crema, aerosol o supositorio.

La invención también se refiere a un método para tratar una enfermedad asociada con la infiltración con leucocitos de tejidos que expresan la molécula MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1). El método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de la invención. En una realización, la enfermedad es la enfermedad de injerto contra huésped. En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad asociada con la infiltración con leucocitos de tejidos como resultado de la unión de leucocitos que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ al endotelio asociado al intestino que expresa la molécula MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1). En otras realizaciones, la enfermedad es gastritis (por ejemplo, gastritis eosinófila o gastritis autoinmunitaria), pancreatitis o diabetes mellitus insulino dependiente. En otras realizaciones más, la enfermedad es colecistitis, colangitis o pericolangitis. En la presente memoria se describe un método para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente. En una realización, el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de la invención. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria del intestino es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En otras realizaciones, la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad celíaca, enteropatía asociada con artropatías seronegativas, colitis microscópica o colagenosa, gastroenteritis (por ejemplo, gastroenteritis eosinófila) o bursitis.

30

35

40

En algunas realizaciones, el tratamiento con un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ no altera la proporción de linfocitos CD4:CD8. Las proporciones de CD4:CD8 pueden medirse en sangre, aspirado de ganglio linfático y líquido cefalorraquídeo (LCR). Las proporciones de linfocitos CD4+:CD8+ en LCR en individuos sanos son típicamente superiores a o iguales a aproximadamente 1. (Svenningsson et al., J. Neuroimmunol. 1995; 63: 39-46; Svenningsson et al., Ann Neurol. 1993; 34: 155-161). Un inmunomodulador puede alterar la proporción de CD4:CD8 a menos de 1.

45

Artículos de fabricación

En la presente memoria se describe un artículo de fabricación que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención y proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara, un vial de formulación líquida con o sin una aguja, un vial de formulación sólida con o sin un vial de líquido de reconstitución con o sin una aguja), jeringas (tales como jeringas de doble cámara, jeringas precargadas) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado por una diversidad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. El recipiente contiene la formulación, y una etiqueta en o asociada con el recipiente puede indicar instrucciones para su uso. En otra realización, la formulación puede prepararse para su autoadministración y/o contener instrucciones para su autoadministración. En un aspecto, el recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de un solo uso. En otro aspecto, el recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita una administración repetida (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación, por ejemplo, usando más de una porción de una formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso, como se ha señalado en la sección anterior.

50

55

60

Análisis clínico y de calidad

65

En la presente memoria se describe un método para determinar que una formulación farmacéutica satisface las normas de calidad de producto. El método puede comprender la evaluación de una formulación farmacéutica liofilizada (por ejemplo, anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado), que comprende inspeccionar la formulación para evaluar su aspecto, determinar el tiempo reconstitución, determinar el contenido de humedad de la formulación liofilizada, medir agregados en la formulación liofilizada, medir la fragmentación, medir la oxidación/desamidación y, opcionalmente, evaluar la actividad y potencia biológica, en el que la obtención de patrones predeterminados demuestra que el producto está indicado para uso clínico.

Los niveles de calidad aceptables incluyen $\leq 5,0\%$ de humedad, ≤ 40 minutos de tiempo de reconstitución, pH $6,3 \pm 0,3$ de líquido reconstituido, concentración de anticuerpo de 54,0 a 66,0 mg/ml, $\geq 55,0\%$ de isoforma principal por CEX, $\geq 96,0\%$ de monómero por SEC, $\leq 2,5\%$ de alto peso molecular (agregados), $\geq 90\%$ de cadenas H+L por SDS-PAGE, 60-140% de la adhesión patrón de referencia.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

PROTOCOLO DE DESARROLLO PARA PREPARAR LA FORMULACIÓN

A. Solución de anticuerpo anti- α 4 β 7

B.

Se descongelan a temperatura ambiente durante 16-24 horas frascos de preparación de anticuerpo anti- α 4 β 7 de alta concentración congelada (vedolizumab, histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3). Los frascos descongelados se combinan en un recipiente de preparación de compuesto de acero inoxidable y se mezclan. La preparación se diluye después con Tampón de Dilución A (histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3) hasta 80 mg/ml de vedolizumab y se mezcla. Después se añade sacarosa por dilución de la preparación con Tampón de Dilución B, que contiene sacarosa (histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 40%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3). Esta etapa diluye la preparación de anticuerpo anti- α 4 β 7 hasta una formulación líquida de vedolizumab 60 mg/ml, histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 10%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3.

C. Liofilización

D.

Una formulación líquida de anticuerpo anti- α 4 β 7 a 60 mg/ml en histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, sacarosa al 10%, a pH 6,3 se carga en viales de vidrio de 20 ml con 5,52 ml por vial y los tapones se ponen en la posición de liofilización. Los viales se cargan sobre baldas ajustadas a aproximadamente 20°C en un liofilizador. Después de cargar todos los viales y de cerrar la puerta, la temperatura de balda se disminuye para congelar la solución, aproximadamente -45°C. Después de 3 horas a esta temperatura, la temperatura de las baldas se aumenta hasta -20°C para el atemperado. Después del atemperado durante cuatro horas, la temperatura de las baldas se disminuye para volver a congelar la solución, aproximadamente -45°C. Después del equilibrado de los viales a esta temperatura, el aire se evacúa de la cámara. Cuando la presión es de 150 mTorr, la temperatura de balda se aumenta gradualmente hasta la temperatura de secado primario, aproximadamente -24°C. El secado primario se desarrolla hasta que todo el hielo cristalino se ha sublimado de los viales. Después, la temperatura de balda se aumenta hasta 27°C para el secado secundario durante 16 horas, hasta que la humedad es aproximadamente inferior al 2,5% de la formulación liofilizada. Cuando se completa el secado secundario, se rellena el gas nitrógeno en la cámara hasta que se alcanza la presión ambiental. Los viales se taponan y se retiran del liofilizador.

C. Almacenamiento y uso de anticuerpo anti- α 4 β 7 liofilizado

Viales liofilizados de anticuerpo anti- α 4 β 7 se almacenan a -70°C, -20°C, 2-8°C o 25°C durante periodos de tiempo deseados. Cuando está listo para usarse, un vial se equilibra a temperatura ambiente. Después el contenido del vial se reconstituye con una jeringa que contiene agua para inyección ("WFI") usando una aguja de 21 G. La cantidad de WFI se determina de modo que el volumen final de la solución de anticuerpo reconstituido sea el mismo volumen que la solución preliofilizada. Para un volumen de preliofilización de 5,52 ml, se añaden 4,8 ml de WFI. Al vial se le dan vueltas suavemente y después se mantiene durante 10-30 minutos para permitir que la formulación se reconstituya, después se retira la solución de anticuerpo usando una jeringa y se añade a una bolsa IV para su infusión IV a un paciente.

EJEMPLIFICACIÓN

EJEMPLO 1

DATOS COMPARATIVOS PARA VARIAR EL % DE AZÚCAR Y AMINOÁCIDOS EN FORMULACIONES LIOFILIZADAS

Se realizó una estrategia de diseño de experimentos para examinar el efecto de variar la proporción molar de azúcar (sacarosa y manitol) respecto a proteína, la proporción molar de arginina respecto a proteína y la cantidad molar de tampón de histidina. Se sabe que la histidina y la arginina no cristalizan durante el proceso de liofilización, haciendo que sean crío- o lio-protectores potenciales. Se cargaron 1,5 ml de formulación en viales de 5 ml liofilizados con Secado Primario a -30°C, 150 mT y Secado Secundario a 20°C, 150 mT. La estabilidad de las formulaciones liofilizadas

5 reconstituidas hasta 1,5 ml después de condiciones de almacenamiento diferentes se muestra en las Tablas 1-3 (que recopilan resultados de 60 mg/ml de dos experimentos). La Figura 6A muestra los modelos predictivos para cambios en el Porcentaje de Monómeros, el Porcentaje de Agregados y el Porcentaje de Isoforma Principal cuando se almacena a 40°C cuando se variaban el pH y la proporción molar de azúcar y arginina. La estabilidad de la formulación era mejor a pH bajo y alta proporción molar de (azúcar + arginina) respecto a proteína. A las cantidades molares de histidina examinadas, la histidina no afectaba a la estabilidad de la formulación. Todas las formulaciones tenían una humedad del 1-2% durante el almacenamiento.

10 Tabla 1: Cambio en el Porcentaje de Monómero cuando se almacena a 5°C, 25°C/HR del 60% y 40°C/HR del 75% durante 3 meses. El Porcentaje de Monómero se midió usando Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC).

Formulación vedolizumab 60 mg/ml +	% Monómeros por SEC			
	t=0	5°C 3 meses	25°C HR 60% 3 meses	40°C HR 75% 3 meses
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,3	98,1	98,1	97,8	96,5
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	98,0	98,2	98,0	97,5
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,7	98,0	98,3	98,1	97,4
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	98,0	98,3	98,1	97,4
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 6%, manitol al 1,5%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	98,7	98,4	98,4	98,1
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 9%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	98,7	98,3	98,1	98,3

15 Tabla 2: Cambio en el Porcentaje de Agregados cuando se almacena a 5°C, 25°C/HR del 60% y 40°C/HR del 75% durante 3 meses. El Porcentaje de Monómero se midió usando Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC).

Formulación vedolizumab 60 mg/ml +	% Agregados por SEC			
	t=0	5°C 3 meses	25°C HR 60% 3 meses	40°C HR 75% 3 meses
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,3	0,42	0,53	0,89	1,99
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	0,41	0,51	0,62	1,15
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,7	0,42	0,47	0,60	1,23
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	0,36	0,44	0,52	0,82
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 6%, manitol al 1,5%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	0,53	0,49	0,51	0,56
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 9%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	0,51	0,51	0,59	0,56

Tabla 3: Cambio en el Porcentaje de Isoforma Principal cuando se almacena a 5°C, 25°C/HR del 60% y 40°C/HR del 75% durante 3 meses. La Isoforma Principal se midió usando Cromatografía de Intercambio Catiónico (CEX).

Formulación vedolizumab 60 mg/ml +	% Isoforma Principal por CEX			
	t=0	5°C 3 meses	25°C HR 60% 3 meses	40°C HR 75% 3 meses
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,3	70,5	68,8	67,4	66,3
histidina 25 mM, arginina 75 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	70,8	98,9	68,0	67,7
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,7	70,5	68,9	67,8	66,5
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 4%, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,9	70,6	68,9	68,0	67,4
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 6%, manitol al 1,5%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	69,6	69,5	69,3	67,4
histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 9%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3	69,5	69,3	69,2	68,1

5 La FIG. 6A muestra los modelos esperados basándose en el análisis estadístico de datos de 40°C de las Tablas 1-3. El modelo para el cambio en el porcentaje de monómeros por mes a 40°C mediante análisis de SEC es de $-3,10 + (0,386)*pH + 0,000516*((\text{moles de azúcar} + \text{moles de arginina})/\text{moles de proteína})$. El modelo para el cambio en el porcentaje de agregados por mes a 40°C mediante análisis de SEC es de $2,43 - (0,263)*pH - 0,000787*((\text{moles de azúcar} + \text{moles de arginina})/\text{moles de proteína})$. El modelo para el cambio en el porcentaje de isoforma principal por mes a 40°C mediante análisis de CEX es de $-2,54 + (0,109)*pH - 0,00130*((\text{moles de azúcar} + \text{moles de arginina})/\text{moles de proteína})$. La línea central muestra los resultados para los modelos predictivos y las líneas externas muestran el límite de confianza del 95% para los modelos predictivos.

15 La FIG. 6B muestra modelos alternativos basados en el análisis estadístico de los datos de 40°C de las Tablas 1-3 cuando los factores de entrada son el pH, la proporción molar de azúcar:proteína y la proporción molar de arginina:proteína. El modelo para el cambio en el porcentaje de monómeros por mes a 40°C mediante análisis de SEC es de $-3,02 + (0,370)*pH + 0,000482*((\text{moles de azúcar})/(\text{moles de proteína})) + 0,000657*((\text{moles de arginina})/(\text{moles de proteína}))$. El modelo para el cambio en el porcentaje de agregados por mes a 40°C mediante análisis de SEC es de $2,35 - (0,244)*pH - 0,000727*((\text{moles de azúcar})/(\text{moles de proteína})) - 0,00102*((\text{moles de arginina})/(\text{moles de proteína}))$. El modelo para el cambio en el porcentaje de isoforma principal por mes a 40°C mediante análisis de CEX es de $-2,92 + (0,210)*pH + 0,00164*((\text{moles de azúcar})/(\text{moles de proteína})) - 0,000220*((\text{moles de arginina})/(\text{moles de proteína}))$. La línea central muestra los resultados para los modelos predictivos y las líneas externas muestran el límite de confianza del 95% para los modelos predictivos.

25 **Ejemplo 2**

Datos de estabilidad

30 Se ensayaron tres lotes de estabilidad primarios de la formulación (Lote A, B y C) para determinar la estabilidad después del almacenamiento a la condición de almacenamiento prescrita (5 y 25°C/HR del 60% durante hasta 24 meses). Los tres lotes contienen la misma formulación líquida que se liofilizó: anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ 60 mg/ml, histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 10%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3. Para el Lote A, se cargaron 3,5 ml de solución en viales de 20 ml y se liofilizaron, para los Lotes B y C, se cargaron 5,52 ml de solución en viales de 20 ml y se liofilizaron.

35 En un estudio distinto, se liofilizó una sola formulación farmacológica de 60 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, histidina 50 mM, arginina 125 mM, sacarosa al 10%, polisorbato 80 al 0,06%, pH 6,3 en dos volúmenes, 3,5 ml y 9,5 ml, respectivamente, para proporcionar los Lotes R y S para muestras de estabilidad, que se analizaron durante 38 meses. Los controles son NT (sin ensayar).

40 Los datos (Tablas 4-19) mostraron que las formulaciones de anticuerpo permanecían estables cuando se almacenaban durante hasta 38 meses a 5°C y hasta 30 meses a 25°C/HR del 60%. Todos los atributos de producto permanecían dentro de las especificaciones a lo largo del punto temporal de 38 meses.

Tabla 4: Cambio en el Porcentaje de Monómeros por SEC cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,8	99,2
3	99,8	99,1	99,1	98,8	98,8
6	99,8	99,8	99,8	98,9	99,0
9	99,1	99,2	99,2	99,2	99,1
12	99,4	99,0	99,0	98,8	98,9
15	99,4	99,1	99,1		
18	99,5	99,4	99,4	98,9	98,9
24	99,4	99,2	99,2	99,0	99,0
30		99,2	99,2		
38				99,3	99,3

Tabla 5: Cambio en el Porcentaje de Agregados por SEC cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
9	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
15	0,2	0,2	0,2		
18	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
30		0,2	0,2		
38				0,2	0,2

5 Tabla 6: Cambio en el Porcentaje de Isoforma Principal por CEX cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,5	68,9	68,8	71,2	72,0
3	68,7	68,8	68,7	70,4	70,3
6	67,7	68,2	68,2	71,9	71,9
9	70,0	68,3	67,8	69,2	69,7
12	67,8	68,3	68,1	70,8	70,9
15	66,9	67,5	67,5		
18	67,4	67,0	66,7	71,0	70,8
24	68,1	69,6	69,1	71,3	70,9
30		68,5	68,6		
38				73,6	73,1

Tabla 7: Cambio en el Porcentaje de Isoformas Ácidas por CEX cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,7	22,3	21,6	20,3
3	21,7	22,2	22,8	22,0	22,0
6	22,9	23,1	23,6	21,1	21,4
9	19,8	22,2	22,9	21,8	21,8
12	22,9	21,3	22,1	21,2	21,2
15	22,7	22,3	22,8		
18	22,8	22,3	22,6	21,1	21,5
24	21,7	22,1	22,9	20,6	20,7
30		22,8	23,2		
38				18,9	19,1

ES 2 645 187 T3

Tabla 8: Cambio en el Porcentaje de Isoformas Básicas por CEX cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,7	9,4	8,9	7,3	7,7
3	9,7	9,0	8,5	7,6	7,8
6	9,5	8,7	8,2	7,0	6,7
9	10,2	9,6	9,3	9,0	8,4
12	9,3	10,3	9,9	8,0	7,9
15	10,4	10,1	9,7		
18	9,8	10,7	10,7	7,9	7,7
24	10,2	8,3	8,1	8,1	8,3
30		8,7	8,2		
38				7,5	7,7

Tabla 9: Cambio en el % de (H+L) por SDS Page Reducida cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	98	98	98	96	96
1	98	94	98	98	98
3	98	98	98	98	98
6	98	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	97	98	98
15	97	98	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	98	98	99	99
30		97	97		
38				99	99

5 Tabla 10: Cambio en la Eficacia de Unión cuando se almacena a 5°C.

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	107	106	105	93	102
1	106	106	103	103	111
3	101	109	108	91	98
6	97	106	105	114	121
9	100	93	88	102	102
12	103	101	87	119	116
15	105	90	94		
18	86	101	96	95	104
24	92	82	95	81	101
30		87	94		
38				89	91

Tabla 11: Cambio en el % de Humedad por KF cuando se almacena a 5°C

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,4	0,6		
3	0,5	0,6	0,6		
6	0,6	0,7	0,5	0,8	1,3
12	0,6	0,6	0,7	0,9	0,9
24	0,5	0,7	0,7	0,9	0,9
30		0,7	0,7		

Tabla 12: Cambio en el Porcentaje de Monómeros por SEC cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,7	98,7
3	99,8	99,0	99,0	98,6	98,5
6	99,8	99,7	99,7	98,9	98,9
9	99,0	99,1	99,1	99,1	99,1
12	99,3	98,9	98,9	98,8	98,9
15	99,3	99,0	99,0		
18	99,4	99,3	99,3	98,7	98,9
24	99,2	99,1	99,1	98,9	98,9
30		99,0	99,0		

Tabla 13: Cambio en el Porcentaje de Agregados por SEC cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
9	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
15	0,3	0,3	0,3		
18	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
30		0,4	0,3		

5 Tabla 14: Cambio en el Porcentaje de Isoforma Principal por CEX cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,2	68,4	68,6	71,2	71,0
3	68,1	68,6	68,2	70,3	70,3
6	65,9	67,8	67,8	71,5	71,1
9	69,3	67,5	66,3	68,6	69,0
12	66,7	67,5	67,4	70,1	70,2
15	66,2	66,6	66,8		
18	66,1	65,8	64,9	70,0	70,3
24	66,7	68,4	68,2	70,6	70,1
30		67,2	67,2		

Tabla 15: Cambio en el Porcentaje de Isoformas Ácidas por CEX cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,8	22,2	21,4	21,6
3	21,7	22,2	22,8	21,8	22,0
6	22,6	22,9	23,5	21,1	21,4
9	19,9	22,1	23,1	21,8	21,8
12	23,0	21,4	22,0	21,3	21,3
15	22,5	22,1	22,7		
18	22,6	22,1	22,6	21,3	21,5
24	21,7	21,9	22,6	20,7	20,7
30		22,7	23,2		

Tabla 16: Cambio en el Porcentaje de Isoformas Básicas por CEX cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,8	9,8	9,2	7,4	7,3
3	10,3	9,3	9,0	7,8	7,7
6	11,5	9,3	8,7	7,4	7,5
9	10,8	10,4	10,6	9,7	9,3
12	10,3	11,1	10,7	8,7	8,5
15	11,3	11,2	10,6		
18	11,2	12,1	12,5	8,7	8,2
24	11,6	9,7	9,1	8,7	9,2
30		10,2	9,6		

Tabla 17: Cambio en el % (H+L) por SDS Page Reducida cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	98	98	98	96	96
1	98	98	98	98	98
3	97	98	98	98	98
6	97	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	96	98	98
15	97	97	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	97	98	99	99
30		97	98		

5 Tabla 18: Cambio en la Eficacia de Unión cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	107	106	105	93	102
1	115	103	109		
3	92	113	100	96	94
6	109	89	97	101	114
9	97	89	85	97	102
12	83	91	123		
15	96	91	96		
18	106	123	87	92	102
24	103	82	90	98	94
30		84	114		

Tabla 19: Cambio en el % de Humedad por KF cuando se almacena a 25°C/HR del 60%

Tiempo (meses)	Lote A	Lote B	Lote C	Lote R	Lote S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,6	0,5		
3	0,5	0,7	0,6		
6	0,5	0,7	0,7	1,3	1,2
12	0,6	0,8	0,6	0,9	1,0
24	0,7	0,8	0,6	1,1	1,0
30		0,8	0,7		

10 Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

Se usa un gradiente de fosfato/cloruro sódico en una columna de intercambio catiónico débil en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento para separar especies cargadas en formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y determinar la composición de carga de las especies de anticuerpo. Las isoformas ácidas se eluyen antes que la isoforma principal y las isoformas básicas se eluyen después de la isoforma principal.

15

Los datos de estabilidad para todos los lotes de vedolizumab generados usando un ensayo de CEX se presentan en las Tablas 3, 6-8 y 14-16. Las Tablas muestran que, en estas condiciones de almacenamiento, no había tendencia de reducción del % de Isoforma Principal por debajo del 55,0%.

20

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La SEC se realiza usando una columna de SEC analítica (Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA). La fase móvil es una solución salina tamponada con fosfato y la absorbancia se controla a 280 nm.

5 Los datos de estabilidad generados usando un ensayo de SEC se presentan en las Tablas 1, 2, 4, 5, 12 y 13. Las Tablas muestran que ninguna de las condiciones de almacenamiento enumeradas daba como resultado una disminución del % de Monómeros por debajo del 96,0%. De forma similar, el % de Agregados permanecía $\leq 2,5\%$ para todos los lotes a todas las condiciones de almacenamiento enumeradas.

10 Ensayo de SDS-PAGE

10 El SDS-PAGE se realizó usando un gel de Tris-Glicina de Invitrogen (Carlsbad, CA), al 4-20% para la condición reductora y al 4-12% para la condición no reductora. La muestra de formulación de anticuerpo reconstituida se diluye en tampón de formulación líquida que después se diluye uno a dos con Tampón de Muestras de SDS de Tris-Glicina (2X, Invitrogen) con 2-mercaptoetanol al 10% (tampón de muestras reductor) o sin 2-mercaptoetanol (tampón de muestras no reductor).
15 Las muestras se calientan brevemente y se cargan en comparación con un marcador de pesos moleculares (Invitrogen). Los geles se tiñen con azul de coomassie coloidal (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bandas de proteína se analizan por densitometría para identificar el % de cadena pesada y ligera para los geles reducidos y el % de IgG para los geles no reducidos.

20 Los datos de estabilidad generados usando un ensayo de SDS-PAGE reducido se presentan en las Tablas 9 y 17. No se observaron cambios perceptibles para el % de cadenas Pesada + Ligera (H+L) a todas las condiciones de almacenamiento enumeradas para todos los lotes de estabilidad. El patrón de formación de bandas era similar al del patrón de referencia y el % (H+L) permanecía a un nivel $\geq 90\%$.

25 Eficacia de unión

Células HuT78 (células de linfoma de células T humanas, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) suspendidas en BSA al 1% en PBS, azida sódica al 0,01% se ponen en contacto con diluciones seriadas de anticuerpo de ensayo primario. Después de la incubación en hielo, las células se lavan y se tratan con anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. Después de un lavado adicional, las células se fijan y se suspenden en reactivo de FACS para su análisis por citometría de flujo (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ); véase también la Patente de Estados Unidos No. 7.147.851.

30 La eficacia de unión del vedolizumab se midió respecto al patrón de referencia y se describió como % de Patrón de Referencia y CE50. Los datos de estabilidad se presentan en las Tablas 10 y 18. Los datos para el % de Patrón de Referencia mostraban variabilidad pero permanecían dentro de los límites de especificación a todas las condiciones de almacenamiento. Ningún lote de vedolizumab evaluado presentaba una tendencia a una eficacia de unión disminuida a las condiciones de almacenamiento enumeradas.

40 Humedad por Karl Fischer

La formulación se valora con metanol para una determinación de la humedad de Karl Fischer coulométrica. Los datos de humedad se presentan en las Tablas 11 y 19. Todos los lotes de vedolizumab evaluados tenían una humedad inferior al 5% a todas las condiciones de almacenamiento enumeradas.

45 Enfoque isoeléctrico capilar (cIEF)

50 El cIEF se realiza usando un sistema de cIEF de detección de columna completa iCE280 (Convergent Biosciences, Toronto, Ontario). La elección del anfolito puede ser según recomienda el fabricante o puede ser una combinación de anfolitos disponibles en el mercado. Una combinación útil es una mezcla de 3-10 y 5-8 PHARMALYTE™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Ejemplo 3: Modelado del aumento a escala del proceso de liofilización

55 Se usó la calidad por diseño al tiempo que se manipulaba la carga en la secadora por congelación y el contenido de sólidos de la formulación. La carga se varió del 33 al 100%. El contenido de sólidos de la formulación se varió del 9 al 27% por inclusión en las cargas de una formulación que era 0,5x, 1,0x y 1,5x de la formulación diana. Estas formulaciones tenían una T_g similar. Con mayor % de sólidos aumentaba el tiempo de secado primario. Además, a mayor contenido de sólidos, la temperatura de producto aumentaba debido a una mayor R_p . La carga también tiene un efecto sobre ambas fases de secado (FIG. 8).
60

Ejemplo 4: Estudio de seguridad no clínico

65 Se diseñó un estudio para comparar el efecto del natalizumab y del vedolizumab sobre la inmunovigilancia del SNC en EAE de Rhesus. A ocho animales se les administró un control de placebo una vez por semana. A siete animales se les administró 30 mg/kg una vez por semana de natalizumab. A siete animales se les administró 30 mg/kg una vez por semana

de vedolizumab. Se observaron los síntomas clínicos de EAE; se midió la frecuencia y la proporción de subconjuntos de leucocitos en LCR por citometría de flujo; la carga de lesión T2 total en el cerebro se midió usando MRI; y la carga de lesión y la desmielinización del cerebro se midieron usando histopatología.

5 El vedolizumab no retrasaba la aparición de los síntomas clínicos de EAE en comparación con el control de placebo. No inhibía la incidencia de EAE ni la magnitud de las puntuaciones clínicas. El natalizumab retrasaba significativamente ($p < 0,05$) la aparición de síntomas clínicos de EAE en comparación con el control de placebo. Inhibía la incidencia de EAE y la magnitud de las puntuaciones clínicas (FIG. 9).

10 El vedolizumab no impedía la infiltración del LCR por leucocitos, linfocitos T (linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos), linfocitos B, células asesinas naturales o monocitos. Por el contrario, el natalizumab inhibía la infiltración del LCR.

15 El vedolizumab no inhibía la acumulación de lesiones cerebrales, según se detectó por valores de T2 aumentados y de MTR disminuidos mediante MRI. El natalizumab evitaba la formación de lesiones en todos los animales menos en uno. La inhibición significativa ($p < 0,05$) en infiltrados cerebrales y la desmielinización se midieron por histología.

20 La integrina $\alpha 4\beta 7$ se saturaba por vedolizumab durante la investigación, como se muestra por un ensayo de unión competitiva entre vedolizumab administrado *in vivo* y un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 4\beta 7$ analítico añadido *ex vivo*. El mAb anti- $\alpha 4\beta 7$ analítico no se une a linfocitos T auxiliares de memoria en animales a los que se administró vedolizumab. La ausencia de efecto de vedolizumab en el SNC se debe por lo tanto a la biología de tropismo gastrointestinal de la integrina $\alpha 4\beta 7$.

25 En resumen, el vedolizumab (un antagonista de $\alpha 4\beta 7$) no inhibe la EAE. Por el contrario, el natalizumab (antagonista de $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$) inhibe la EAE. La integrina $\alpha 4\beta 1$ media la infiltración del SNC en la EAE. Por lo tanto, el vedolizumab puede tener un menor riesgo de predisponer a los pacientes a PML que el natalizumab porque no antagoniza la integrina $\alpha 4\beta 1$ ni altera la inmunovigilancia del SNC en la EAE de Rhesus.

Ejemplo 5: Estudio clínico de fase I con vedolizumab

30 Cuarenta y nueve sujetos sanos se aleatorizaron y recibieron una sola dosis de medicación de estudio: 39 sujetos recibieron vedolizumab (anticuerpo 5 mg/ml, citrato/ácido cítrico 20 mM, cloruro sódico 125 mM, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,0 (almacenado a -70°C a largo plazo y hasta 3 meses a -20°C) y 10 sujetos recibieron placebo. De los 39 sujetos que recibieron vedolizumab, 8 sujetos recibieron cada uno una dosis a 0,2, 2,0, 6,0 y 10,0 mg/kg y 7 sujetos recibieron vedolizumab a 0,5 mg/kg. Los 49 sujetos completaron el estudio.

35 No hubo diferencias notables a lo largo de las cohortes de vedolizumab para ninguna característica demográfica o basal. La edad media variaba de 35,4 a 51,0 años, las edades de sujetos individuales variaban de 21 a 63 años.

Resultados de PK

40 El vedolizumab se administró como una infusión intravenosa de 30 minutos de 0,2 a 10,0 mg/kg. Los valores de $C_{\text{máx}}$ y área bajo la curva de concentración (AUC) de fármaco en suero-tiempo aumentaban con una dosis creciente. La $C_{\text{máx}}$ corregida por la dosis era aproximadamente la misma a lo largo de las cohortes, indicando una proporcionalidad de dosis para este parámetro. El área normalizada por la dosis bajo el valor de concentración de fármaco en suero del tiempo cero al infinito ($AUC_{0-\text{inf}}$) aumentaba con dosis crecientes hasta 2,0 mg/kg, indicando que había un aumento no lineal en la $AUC_{0-\text{inf}}$ con dosis crecientes a lo largo del intervalo inferior de dosis administradas en este estudio. Después de eso, la $AUC_{0-\text{inf}}$ aumentaba proporcionalmente con la dosis, indicando una linealidad de la $AUC_{0-\text{inf}}$ a lo largo del intervalo de dosis de 2,0 a 10,0 mg/kg. El aumento en la $AUC_{0-\text{inf}}$ era aproximadamente 2,4 veces superior al esperado a la dosis de 10,0 mg/kg en comparación con la dosis de 0,2 mg/kg.

50 De forma similar, las estimaciones del aclaramiento, volumen de distribución y semivida terminal eran dependientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis de 0,2 a 2,0 mg/kg. A medida que aumentaba la dosis, se reducía el aclaramiento, aumentaba el volumen de distribución y, por consiguiente, se prolongaba la semivida de eliminación terminal. Sin embargo, de 2 a 10,0 mg/kg no había un cambio aparente en estos parámetros, lo que sugiere una saturación de un proceso de eliminación rápida para el vedolizumab a bajas concentraciones. Los procesos de eliminación lineales más lentos probablemente representan una gran fracción de aclaramiento del vedolizumab a dosis mayores.

55 En algunos sujetos que desarrollaron HAMA contra el vedolizumab se observó un aclaramiento más rápido del vedolizumab en comparación con los sujetos negativos para HAMA dentro del nivel de dosis respectivo.

60 Tabla 20: Visión de conjunto de la PK del vedolizumab por cohorte de dosis después de la administración IV de 0,2-10,0 mg/kg de vedolizumab en sujetos sanos (conjunto de análisis de PK)

ES 2 645 187 T3

Parámetro	Dosis VDZ	N	Media	DT	Media geométrica	%CV	Mediana	Mín	Máx
C _{máx} (µg/ml)	0,2 mg/kg	4	5,65	0,629	5,62	11,1	5,45	5,13	6,56
	0,5 mg/kg	4	10,6	2,09	10,4	19,7	10,6	8,07	13,1
	2,0 mg/kg	7	59,3	11,6	58,4	19,6	58,4	47,6	78,4
	6,0 mg/kg	6	151	19,1	150	12,6	157	120	168
	10,0 mg/kg	7	243	22,1	243	9,07	242	213	281
AUC _{0-túlt} (día*µg/ml)	0,2 mg/kg	4	31,6	4,98	31,3	15,8	31,6	25,7	37,5
	0,5 mg/kg	4	127	48,0	119	37,9	129	70,9	178
	2,0 mg/kg	7	964	147	955	15,2	972	772	1170
	6,0 mg/kg	6	3.090	749	3.020	24,2	2.830	2.360	4.100
	10,0 mg/kg	7	4.870	624	4.840	12,8	4.750	4.120	5.870
AUC _{0-inf} (día*µg/ml)	0,2 mg/kg	4	39,5	5,79	39,1	14,7	40,2	31,7	45,7
	0,5 mg/kg	4	134	48,9	127	36,5	134	79,2	188
	2,0 mg/kg	7	979	146	969	14,9	993	784	1.180
	6,0 mg/kg	6	3.100	750	3.030	24,2	2.840	2.390	4.110
	10,0 mg/kg	7	4.880	637	4.850	13,0	4.750	4130	5.920
V _z (L)	0,2 mg/kg	4	4,02	0,151	4,02	3,76	4,03	3,83	4,18
	0,5 mg/kg	4	4,92	0,620	4,89	12,6	4,66	4,52	5,84
	2,0 mg/kg	7	3,34	0,665	3,28	19,9	3,23	2,29	4,27
	6,0 mg/kg	6	2,98	0,644	2,92	21,6	2,98	2,06	3,98
	10,0 mg/kg	7	2,89	1,02	2,73	35,2	2,98	1,49	4,58
CL (L/día)	0,2 mg/kg	4	0,413	0,042	0,412	10,1	0,395	0,388	0,476
	0,5 mg/kg	4	0,310	0,106	0,297	34,3	0,291	0,212	0,446
	2,0 mg/kg	7	0,165	0,018	0,164	10,7	0,162	0,145	0,194
	6,0 mg/kg	6	0,140	0,031	0,136	22,0	0,145	0,083	0,166
	10,0 mg/kg	7	0,140	0,024	0,139	16,9	0,135	0,103	0,171
t _{1/2} (día)	0,2 mg/kg	4	6,79	0,736	6,76	10,8	6,95	5,79	7,47
	0,5 mg/kg	4	11,7	2,83	11,4	24,2	11,4	9,09	14,8
	2,0 mg/kg	7	14,1	2,67	13,9	18,9	14,3	10,6	17,5
	6,0 mg/kg	6	15,1	3,15	14,8	20,9	14,0	11,9	20,3
	10,0 mg/kg	7	14,8	7,38	13,7	49,8	12,5	8,26	30,7

Parámetro	Dosis VDZ	N	Media	DT	Media geométrica	%CV	Mediana	Mín	Máx
Abreviaturas: AUC_{0-inf} = área bajo la curva de concentración de fármaco-tiempo, extrapolada hasta el infinito; $AUC_{0-túlt}$ = área bajo la curva de concentración de fármaco-tiempo desde el momento de la administración hasta el último punto temporal de medición en el que la concentración estaba por encima del límite inferior de cuantificación; CL = aclaramiento total; $C_{máx}$ = concentración máxima de fármaco; $t_{1/2}$ = semivida terminal; V_z = volumen de distribución basado en la fase terminal.									

Después de alcanzar la $C_{máx}$, las concentraciones en suero de Vedolizumab disminuyeron de una forma generalmente monoexponencial hasta que las concentraciones alcanzaron de aproximadamente 1 a 10 mg/L. Después de eso, las concentraciones parecían disminuir de una forma no lineal.

5

Los valores de $C_{máx}$ y AUC aumentaban con dosis crecientes. Para los datos disponibles, la $C_{máx}$ corregida por la dosis era aproximadamente la misma a lo largo de las cohortes, indicando una proporcionalidad de la dosis para este parámetro. La AUC_{0-inf} normalizada por la dosis aumentaba con dosis crecientes hasta 2,0 mg/kg, indicando que había un aumento no lineal en la AUC_{0-inf} con dosis crecientes a lo largo del intervalo inferior de dosis administradas en este estudio. Después de eso, la AUC_{0-inf} aumentaba proporcionalmente con la dosis, indicando la linealidad de la AUC_{0-inf} a lo largo del intervalo de dosis de 2,0 a 10,0 mg/kg. El aumento en la AUC_{0-inf} era aproximadamente 2,4 veces superior al esperado a la dosis de 10,0 mg/kg en comparación con la dosis de 0,2 mg/kg.

10

Resultados de PD

15

Los parámetros de PD del Vedolizumab después de una infusión intravenosa de 30 minutos de 0,2 a 10,0 mg/kg de vedolizumab por cohorte se resumen en la Tabla 21 y la Tabla 22 para Act-1 y MAdCAM respectivamente.

Tabla 21: Visión de conjunto de la farmacodinámica del vedolizumab, porcentaje de inhibición de %Act-1+ [CD4+ CD45RO^{elevado}], por cohorte de dosis después de la administración IV de 0,2-10,0 mg/kg de vedolizumab en sujetos sanos (conjunto de análisis de PD)

Parámetro	Dosis VDZ	N	Media	DT	Media geométrica	%CV	Mediana	Mín	Máx
E _{máx} (%Inhibición)	0,2 mg/kg	4	99,6	0,387	99,6	0,388	99,6	99,1	100
	0,5 mg/kg	4	99,5	0,599	99,5	0,602	99,5	98,9	100
	2,0 mg/kg	6	99,9	0,172	99,9	0,172	100	99,6	100
	6,0 mg/kg	6	100	0,000	100	0,000	100	100	100
	10,0 mg/kg	6	99,7	0,326	99,7	0,327	99,8	99,3	100
AUEC _{0-inf} (%Inhibición*d)	0,2 mg/kg	4	4.030	1.010	3.920	25,2	4.090	2.760	5.160
	0,5 mg/kg	4	6.430	1.450	6.300	22,6	6530	4.860	7.810
	2,0 mg/kg	6	13.200	623	13.200	4,72	12900	12.800	14.500
	6,0 mg/kg	6	16.700	3030	16.500	18,1	16300	13.300	20.100
	10,0 mg/kg	6	19.300	644	19.300	3,33	19600	18.200	19.900

AUEC_{0-inf} = área bajo la curva de efecto farmacológico frente al tiempo del tiempo 0 al tiempo de la última concentración distinta de cero; E_{máx} = efecto farmacológico máximo

5 Tabla 22: Visión de conjunto de la farmacodinámica del vedolizumab, porcentaje de inhibición de %MADCAM+ [CD4+ CD45RO^{elevado}], por cohorte de dosis después de la administración IV de 0,2-10,0 mg/kg de vedolizumab en sujetos sanos (conjunto de análisis de PD)

Parámetro	Dosis VDZ	N	Media	DT	Media geométrica	%CV	Mediana	Mín	Máx
E _{máx} (%Inhibición)	0,2 mg/kg	4	99,2	0,537	99,2	0,542	99,4	98,4	99,6
	0,5 mg/kg	4	99,6	0,323	99,6	0,324	99,5	99,3	100
	2,0 mg/kg	6	99,7	0,365	99,7	0,366	99,7	99,2	100
	6,0 mg/kg	6	99,8	0,279	99,8	0,280	100	99,4	100
	10,0 mg/kg	6	100	0,000	100	0,000	100	100	100
AUEC _{0-inf} (%Inhibición*d)	0,2 mg/kg	4	4.000	576	3.970	14,4	4.210	3.160	4.440
	0,5 mg/kg	4	6.770	1.400	6.660	20,6	6.840	5.170	8.230
	2,0 mg/kg	6	13.000	796	13.000	6,12	13.000	11.700	13.900
	6,0 mg/kg	6	16.200	3.320	15.900	20,5	15.800	11.800	20.000
	10,0 mg/kg	6	17.700	1.330	17.700	7,5	17.700	16.500	19.000

AUEC_{0-inf} = área bajo la curva de efecto farmacológico frente al tiempo del tiempo 0 al tiempo de la última concentración distinta de cero; E_{máx} = efecto farmacológico máximo

10 El vedolizumab inhibía los parámetros PD, Act-1 y MAdCAM-1-Fc, casi al máximo en todos los puntos temporales en los que el vedolizumab era medible en suero. Una vez que las concentraciones de vedolizumab disminuían por debajo del límite de detección del ensayo, la inhibición de Act-1 y MAdCAM-1-Fc volvía a aproximadamente el nivel basal.

15 En algunos sujetos que desarrollaron HAHA contra el vedolizumab se observó una pérdida más rápida de saturación de receptor de $\alpha 4\beta 7$ en comparación con los sujetos negativos para HAHA en el nivel de dosis respectivo.

Resultados de seguridad

20 El vedolizumab era en general seguro y se toleraba bien a dosis IV individuales de hasta 10,0 mg/kg. No se produjeron muertes, eventos adversos graves (SAE) ni AE que condujeran a la interrupción del estudio durante el estudio.

Inmunogenicidad/Formación de anticuerpo humano anti-humano (HAHA)

Un sujeto (10%) en el grupo de placebo y 21 sujetos (54%) en los grupos de dosis de vedolizumab combinados tenían un positivo para HAHA en algún momento durante el estudio. Aunque se observaron muestras positivas para HAHA en todas

las cohortes de dosis, se descubrieron títulos de HAHA >125 solamente en los 2 grupos de menor dosis de vedolizumab. La supresión dependiente de la dosis de la formación de HAHA se ha observado previamente con el vedolizumab. Diecinueve de los 22 sujetos tratados con vedolizumab que eran positivos para HAHA tenían HAHA neutralizantes presentes.

5

Tabla 23: Visión de conjunto de los hallazgos de anticuerpos humanos anti-humano: población de seguridad

	Placebo N = 10	VDZ 0,2 mg/kg N = 8	VDZ 0,5 mg/kg N = 7	VDZ 2,0 mg/kg N = 8	VDZ 6,0 mg/kg N = 8	VDZ 10,0 mg/kg N = 8	VDZ combinado N = 39
Sujetos analizados	10	8	7	8	8	8	39
Cualquier positivo para HAHA, n(%)	1 (10)	6 (75)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	21 (54)
Mayor título de HAHA <125, n(%)	1 (10)	4 (50)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	17 (44)
Mayor título de HAHA ≥125, n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)
Cualquier positivo para HAHA neutralizante, n(%)	0	5 (63)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	19 (49)
Mayor título de HAHA neutralizante <125, n(%)	0	3 (38)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	15 (38)
Mayor título de HAHA neutralizante ≥125, n(%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

Un sujeto en el grupo de placebo y 11 sujetos en el grupo de vedolizumab eran persistentemente positivos para HAHA.

Tabla 24: Estado de anticuerpo humano anti-humano global (población de seguridad)

	Placebo N = 10	VDZ 0,2 mg/kg N = 8	VDZ 0,5 mg/kg N = 7	VDZ 2,0 mg/kg N = 8	VDZ 6,0 mg/kg N = 8	VDZ 10,0 mg/kg N = 8	VDZ combinado N = 39
Negativo para HAHA ^a n(%)	9 (90)	2 (25)	3 (43)	6 (75)	5 (63)	2 (25)	18 (46)
HAHA aislado ^b n(%)	0	2 (25)	1 (14)	1 (13)	1 (13)	5 (63)	10 (26)
HAHA persistente ^c n(%)	1 (10)	4 (50)	3 (43)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	11 (28)
a Negativo para HAHA: Sujetos sin resultados de HAHA positivos							
b HAHA aislado: Sujetos con 1 sola muestra positiva para HAHA con título <25							
c HAHA persistente: Sujetos con 2 o más muestras positivas para HAHA o 1 muestra positiva con título ≥25							

10

Conclusiones

Este estudio de fase 1 caracterizaba la PK/PD y los perfiles de seguridad iniciales del vedolizumab derivado de células CHO. Los resultados de este estudio se usaron para apoyar la selección de dosis para ensayos fundamentales de fase 3 en enfermedad inflamatoria del intestino.

15

El vedolizumab demostró proporcionalidad de dosis a lo largo del intervalo de dosis ensayado para el parámetro de C_{máx}; sin embargo, se observaron cambios dependientes de la dosis en la AUC_{0-inf}, CL, Vz y t_{1/2} de 0,2 a 2,0 mg/kg, sugiriendo un comportamiento PK no lineal del vedolizumab. A niveles de dosis superiores a 2,0 mg/kg no se observaron cambios adicionales en estos parámetros, lo que sugiere una saturación de un proceso de eliminación rápida para el vedolizumab a bajas concentraciones. Los procesos de eliminación lineales más lentos probablemente representan una gran fracción de aclaramiento del vedolizumab a dosis mayores.

20

El vedolizumab inhibía los parámetros PD, Act-1 y MAdCAM-1-Fc, a niveles máximos o casi en todos los puntos temporales cuando el vedolizumab era medible en el suero. Una vez que las concentraciones de vedolizumab disminuían por debajo del límite de detección del ensayo, la inhibición de Act-1 y MAdCAM-1-Fc volvía a aproximadamente el nivel basal.

25

En algunos sujetos que desarrollaron HAHA contra vedolizumab se observó un aclaramiento más rápido de vedolizumab y pérdida de saturación de receptor de α4β7 en comparación con los sujetos negativos para HAHA dentro del nivel de dosis respectivo.

30

El vedolizumab se toleraba bien. No se produjeron muertes, SAE ni AE que condujesen a la interrupción de la administración del fármaco de estudio durante el estudio, ni se observó ninguna relación de dosis-toxicidad. No se describieron infecciones oportunistas sistémicas (incluyendo PML) ni neoplasias.

35

A diferencia de los antagonistas de $\alpha 4$ inespecíficos, el vedolizumab no estaba asociado con linfocitosis o aumentos medios en los eosinófilos, basófilos o monocitos circulantes, ni hay ninguna prueba de reducción del número de linfocitos. El vedolizumab generaba la formación de HAHA, pero los mayores títulos (>125) se observaron solamente en los 2 grupos de menor dosis, un hallazgo que confirma las observaciones previas de una reducción dependiente de la dosis en la inmunogenicidad. Estos datos muestran que la administración de mayores dosis de vedolizumab puede minimizar la formación de HAHA clínicamente significativos.

En conclusión, el vedolizumab era en general seguro y se toleraba bien cuando se administraba en dosis individuales de 0,2 a 10,0 mg/kg a sujetos sanos.

Ejemplo 6: Determinación del efecto del vedolizumab sobre la proporción de CD4:CD8

Sujetos sanos de edades de 18-45 se trataron con una sola dosis de 450 mg de vedolizumab reconstituido a partir de una formulación liofilizada de sacarosa al 10% y diluido en un sistema de infusión de solución salina al 0,9%. Se recogió el líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar antes (basal) y 5 semanas después de la dosis de 450 mg individual de vedolizumab. Cada sujeto sirvió como su propio control.

Se seleccionó un punto temporal de 5 semanas basándose en un estudio previo que mostraba que pacientes con EM tratados con natalizumab demostraban efectos sobre la proporción de linfocitos CD4+:CD8+ en LCR y reducción en el número de lesiones cerebrales después de una sola dosis (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); y también porque a las 5 semanas, una dosis de 450 mg de vedolizumab es suficiente para saturar la diana y proporciona concentraciones en suero que superan los niveles valle en estado estacionario estimados asociados con el régimen de dosis de fase 3 de 300 mg cada 4 semanas. Se obtuvieron aproximadamente 15 ml de LCR a partir de cada sujeto para inmunofenotipado. Las muestras de LCR se incluyeron para análisis si cumplían los criterios siguientes: ≤ 10 RBC/ μ l por muestra (para minimizar la contaminación con sangre periférica); resultado de cultivo de LCR negativo; números de linfocitos T adecuado en cada muestra de citometría de flujo; y no detección de anticuerpos en suero contra el vedolizumab.

Las concentraciones de vedolizumab en suero de sujetos individuales (intervalo 24,9-47,9 μ g/ml) y la mediana de la semana 5 (34,80 μ g/ml) eran superiores que la concentración valle en estado estacionario proyectada (~24 μ g/ml) para el régimen de dosis de fase 3. Se observó un alto grado (>90%) de saturación de receptor de $\alpha 4\beta 7$ a la semana 5 según se midió por MAdCAM-1-Fc, indicando la saturación por el vedolizumab de su diana en el momento de evaluación de criterio de valoración.

No se detectó vedolizumab en ninguna muestra de LCR (límite de detección = 0,125 μ g/ml).

Efecto sobre el número y la proporción de linfocitos T CD4+ y CD8+

El vedolizumab no reducía significativamente la proporción de CD4+:CD8+ (Tabla 25). Ninguno de los sujetos tenía una proporción de CD4+:CD8+ postdosis <1 ($p < 0,0001$ (prueba t unilateral). El vedolizumab no reducía significativamente el número de linfocitos T CD4+ o CD8+ en el LCR. Además, no había cambios significativos en el % de linfocitos T CD4+ y % CD8+ en LCR (Tabla 26). Además, no se observaron cambios significativos en WBC, linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ de sangre periférica (Tabla 27).

Tabla 25: Efecto del tratamiento sobre la proporción de CD4+:CD8+ en LCR (población evaluable, n = 13)

Basal	Basal	Semana 5	Diferencia† de proporción CD4+:CD8+
Proporción CD4+:CD8+ Media (ET) Intervalo	3,59 (0,273) 1,53-5,67	3,60 (0,265)* 1,42-5,15	0,01 (0,197)
IC bilateral del 90% para proporción	3,00-4,19	3,132, 4,077	
IC bilateral del 90% para diferencia			-0,337, 0,363
IC= intervalo de confianza *p < 0,0001 (prueba t de una muestra unilateral para H0: $\mu < 1$ frente a H1: $\mu > 1$). † La diferencia se define como proporción de semana 5 menos proporción basal			

Tabla 26: Efecto del tratamiento sobre el recuento de linfocitos CD4+ y CD8+ en LCR (población evaluable, n = 13)

	Basal	Semana 5
CD4+ como % de linfocitos, media (DT)	75,160 (7,3831)	74,215 (6,3732)
CD8+ como % de linfocitos, media (DT)	22,272 (5,4320)	22,007 (6,1624)

Tabla 27: Recuentos de linfocitos T de memoria en sangre periférica (RO+) (población evaluable, n = 13)

	Basal	Semana 5
	Media (DT)	Media (DT)
CD4+CD45RO+	27,85 (4,98)	27,06 (5,02)
CD8+CD45RO+(%)	11,24 (3,40)	10,78 (2,98)

Resumen

5 El vedolizumab no afectaba a los recuentos de células CD4+ y CD8+ del LCR o a la proporción de CD4+:CD8+ en voluntarios sanos después de una sola dosis de 450 mg. Ninguno de los sujetos tenía una reducción en la proporción de CD4+:CD8+ en LCR postdosis inferior a 1. El vedolizumab no se detectaba en LCR. Además, no se observaron cambios en los WBC totales o en los subconjuntos CD4+ y CD8+ de linfocitos T de memoria en sangre periférica. La saturación de la diana ($\alpha 4\beta 7$) en sangre se producía en todos los sujetos en el momento de la evaluación del criterio de valoración. Los niveles y la proporción de linfocitos CD4+ y CD8+ en LCR eran similares a los descritos previamente en la bibliografía.

Estos resultados concuerdan con la ausencia de efecto del vedolizumab sobre tanto la inmunovigilancia del SNC fisiológica como la inflamación patológica del SNC de monos (Véase el Ejemplo 4).

15 Ejemplo 7: Experiencia clínica a largo plazo con vedolizumab para el tratamiento de IBD

Se completó un estudio de extensión de seguridad sin ocultación de fase 2 para evaluar la farmacocinética (PK), farmacodinamia (PD), seguridad y eficacia de vedolizumab a largo plazo. Los pacientes tenían de 18 a 75 años de edad y habían participado previamente en un estudio previo de PK/PD/seguridad en pacientes con colitis ulcerosa o habían tenido síntomas de IBD durante al menos 2 meses confirmados endoscópica y/o histopatológica y/o radiológicamente en el intervalo de 36 meses desde el cribado.

25 Todos los pacientes recibieron un régimen de dosificación intravenoso de 2 mg/kg o 6 mg/kg de vedolizumab (5 mg/ml de anticuerpo, citrato/ácido cítrico 20 mM, cloruro sódico 125 mM, polisorbato 80 al 0,05%, pH 6,0 (almacenado a largo plazo -70°C y hasta 3 meses -20°C)) los días 1, 15 y 43, seguido de una dosis cada 8 semanas durante hasta un total de 78 semanas. Los pacientes eran pacientes con colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn sin tratamiento previo o pacientes con colitis ulcerosa que habían participado en un experimento clínico previo.

30 Se usaron la eficacia/calidad de vida (QoL); puntuación parcial de Mayo (PMS), índice de actividad de enfermedad de Crohn (CDAI) y el Cuestionario de Enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBDQ) para evaluar los resultados del estudio.

Resultados de PK

35 Las concentraciones de vedolizumab pre-infusión medias eran proporcionales a la dosis y permanecieron estables y detectables a lo largo del estudio.

Resultados de PD

40 Los receptores (% ACT-1 + [CD4+CD45RO ELEVADO] y % MAdCAM+ [CD4+CD45RO ELEVADO] se inhibieron prácticamente de forma completa a lo largo del periodo de estudio a todos los niveles de dosis.

Puntuación parcial de Mayo

45 La PMS media basal era mayor para pacientes con colitis ulcerosa sin tratamiento previo (5,4) que para pacientes de continuación con colitis ulcerosa (2,3). El día 43, la PMS media mostró una disminución pronunciada para pacientes con colitis ulcerosa tanto de continuación como sin tratamiento previo. Sobre el día 155, las puntuaciones medias de los dos grupos fueron similares. La PMS media continuó disminuyendo hasta el día 267 y se estabilizó después de esto. Índice de actividad de la enfermedad de Crohn

50 El CDAI medio de pacientes con CD disminuyó de 294,6 en el nivel basal a 237,7 el día 43 y continuó disminuyendo hasta el día 155 (156,1).

IBDQ

55 Los pacientes de continuación con colitis ulcerosa tuvieron las mayores puntuaciones de IBDQ medias en el nivel basal. Sobre día 43, las puntuaciones de IBDQ medias habían aumentado en los tres grupos de enfermedad. Las puntuaciones de IBDQ medias continuaron aumentando a lo largo del tiempo en los 3 grupos de enfermedad, alcanzando un máximo el día 155 para pacientes con enfermedad de Crohn y el día 491 para pacientes con colitis ulcerosa sin tratamiento previo y pacientes de continuación con colitis ulcerosa.

60 Proteína C reactiva

Los pacientes tanto de continuación con colitis ulcerosa como de enfermedad de Crohn mostraron niveles de CRP medios disminuidos hasta el día 155 y después se estabilizaron. Los pacientes con colitis ulcerosa sin tratamiento previo tenían un menor nivel de CRP medio en el nivel basal que los pacientes de continuación con colitis ulcerosa (2,28 frente a 7,09).

- 5 Los niveles de CRP medios de los pacientes con colitis ulcerosa sin tratamiento previo permanecieron relativamente constantes en todos los puntos de tiempo evaluados.

Otros resultados de seguridad

- 10 No se informaron infecciones oportunistas sistemáticas (incluyendo PML) durante el estudio. Un paciente dio positivo para viremia de JC en un único punto de tiempo, aunque dio negativo para JCV en todos los demás puntos de tiempo. Tres de 72 pacientes (4%) tuvieron resultados de HABA positivos (dos de estos fueron temporalmente positivos). El estudio no mostró pruebas de toxicidad hepática, linfocitosis o linfopenia o cualquier otro cambio de laboratorio asociado a fármaco.

- 15 Conclusiones

El vedolizumab administrado a 2,0 o 6,0 mg/kg una vez cada 8 semanas durante hasta 78 semanas consiguió saturaciones de receptor diana, se asoció con disminuciones medias duraderas en la actividad de la enfermedad y mejoró las puntuaciones de IBDQ, fue generalmente seguro y bien tolerado y demostró inmunogenicidad aceptable.

- 20 Ejemplo 8: Inducción de respuesta y remisión en pacientes con enfermedad de Crohn de moderada a gravemente activa
Se completó un estudio multicéntrico controlado con placebo doblemente a ciegas aleatorizado para evaluar el efecto de inducción del vedolizumab a dosis de 300 mg (reconstituido a partir de una formulación de anticuerpo 60 mg/ml en histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, sacarosa al 10%, a pH 6,3 que estaba liofilizado) en pacientes en los que fracasó el antagonista de TNF α a la semana 6 (después de 2 dosis - 0 y 2 semanas) y a la semana 10 (después de 3 dosis). El estudio consistió en 416 pacientes, en el 75% de los cuales fracasó el antagonista de TNF α y el 25% de los cuales no había recibido tratamiento previo con TNF α . Las características demográficas y la medicación de IBD concomitante se equilibraron a lo largo de los grupos de tratamiento. Las características basales de enfermedad también se equilibraron a lo largo de los grupos de tratamiento, excepto para la actividad de enfermedad basal.

- 30 El criterio de valoración primario designado por el estudio era la remisión en semana 6 (%) en la población en la que fracasó el antagonista anti-TNF α . Los criterios de valoración secundarios clave que se evaluaron (procedimiento de ensayo secuencial) fueron: remisión en semana 6 (%) en la población global, remisión en semana 10 (%) en la población global y en la que fracasó el antagonista anti-TNF- α (usando el procedimiento de Hochberg), remisión mantenida en semana 6 y 10 (%) en la población global y en la que fracasó el antagonista anti-TNF- α (usando el procedimiento de Hochberg) y respuesta aumentada en semana 6 (%) en la población en la que fracasó el antagonista anti-TNF- α .

Tabla 28: CDAI Basal:

	Placebo	Vedolizumab	valor p
ITT TNF: Media (Desv. Típ.)	306,1 (55,43)	316,1 (52,63)	0,0945
ITT Global: Media (Desv. Típ.)	301,3 (54,97)	313,9 (53,17)	0,0153

40 Tabla 29: Resultados del estudio de inducción: criterios de valoración primarios y secundarios clave

Criterios de valoración	ITT TNF (N = 315)				ITT Global (N = 416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	Dif. (RR)	Valor P	PLA N=207	VDZ N=209	Dif. (RR)	Valor P
Remisión primaria sem 6	12,1%	15,2%	3,0% (1,2)	0,4332				
1ª Remisión secundaria sem 6					12,1%	19,1%	6,9% (1,6)	0,0478
2ª Remisión secundaria sem 10	12,1%	26,6%	14,4% (2,2)	0,0012	13%	28,7%	15,5% (2,2)	<0,0001
Remisión mantenida (tanto sem 6 como 10)	8,3%	12,0%	3,7% (1,4)	0,2755	8,2%	15,3%	7% (1,9)	0,0249
Respuesta aumentada (CDAI100)	22,3%	39,2%	16,9% (1,8)	0,0011				

Tabla 30: Resultados en pacientes sin tratamiento previo con antagonista anti-TNF- α (n = 101, 24% de global)

	Placebo %	Vedolizumab %	Diferencia %	IC 95%
Remisión semana 6	12	31,4	19,1	(3,3, 35,0)
Remisión semana 10	16	35,3	19,2	(2,4, 35,8)

Tabla 31: Resultados de estudio: remisión clínica a las semanas 6 y 10, subgrupo clave - fracasos de tratamiento previo, ITT global

Subgrupo	Variable	Placebo	VDZ	Dif	IC 95%
Cualquier fracaso previo de anti-TNF (75% de ITT)	N	156	155		
	Sem 6 Rem (%)	12,8	14,8	2	(-5,7, 9,7)
	Sem 10 Rem (%)	12,8	26,5	13,6	(4,9, 22,3)
Fracaso previo de inmunomodulador pero no fracaso de anti-TNF (21% ITT)	N	45	44		
	Sem 6 Rem (%)	11,1	31,8	20,7	(-0,5, 39,7)
	Sem 10 Rem (%)	15,6	31,8	16,3	(-1,1, 33,6)
Fracaso previo de corticosteroides solamente (3% ITT)	N	5	9		
	Sem 6 Rem (%)	0	33,3	33,3	(-23,9, 75,7)
	Sem 10 Rem (%)	0	44,4	44,4	(-13,4, 85,3)

5

El estudio demostró que los pacientes con fracaso de antagonista de TNF- α requerían 3 dosis para la inducción de la remisión. Los índices de remisión en los pacientes con fracaso de antagonista de TNF- α aumentaban entre la semana 6 y la semana 10, pero sólo para el grupo con vedolizumab (no placebo). Los índices de remisión para los pacientes sin tratamiento previo con antagonista de TNF- α no aumentaban sustancialmente entre la semana 6 y 10. De las poblaciones con fracaso del antagonista de TNF- α con un alto grado de gravedad de la enfermedad, el 43% no respondieron nunca a un antagonista de TNF- α y el 45% perdieron la respuesta.

10

Ejemplo 9: Inducción y mantenimiento de respuesta y remisión en pacientes con colitis ulcerosa de moderadamente a gravemente activa

15

Un solo ensayo que comprende dos estudios multicéntricos doblemente a ciegas aleatorizados diseñados para evaluar la inducción y el mantenimiento de la respuesta y la remisión en pacientes con colitis ulcerosa de moderadamente a gravemente activa. Las características demográficas y de enfermedad basal eran comparables en todos los grupos de tratamiento.

20

El estudio de inducción, usando administración intravenosa, comparaba el placebo frente a vedolizumab a una dosis de 300 mg reconstituida a partir de una formulación liofilizada de anticuerpo 60 mg/ml en histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, sacarosa al 10% a pH 6,3, con un criterio de valoración a las 6 semanas después de 2 dosis de vedolizumab.

25

El estudio de mantenimiento, usando la misma formulación y vía de administración que el estudio de inducción, comparaba el placebo frente a vedolizumab dosificado cada cuatro semanas y el placebo frente a vedolizumab dosificado cada ocho semanas. Cada paciente tenía entre 18-80 años, se le había diagnosticado colitis ulcerosa de moderadamente a gravemente activa; se demostró que en el periodo de 5 años anterior presentaba una respuesta inadecuada, una pérdida de respuesta o intolerancia a al menos una terapia convencional (por ejemplo, corticosteroides); y podía estar recibiendo una dosis terapéutica de terapias convencionales para la IBD. El criterio de valoración de este estudio fue a las 52 semanas, analizando la población que respondía a la inducción. Ambas fases del ensayo alcanzaron sus criterios de valoración primarios, a saber, respuesta química en la inducción y remisión clínica en el mantenimiento.

30

Se recogieron muestras de sangre para medir las concentraciones de vedolizumab durante el estudio. La concentración en suero media de vedolizumab al final de la fase de inducción fue de 20 a 30 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones en suero valle medias de vedolizumab en estado estacionario después de una infusión IV de 30 min de administración de dosis de 300 mg eran de entre 9 y 13 $\mu\text{g/ml}$ para el régimen de cada 8 semanas y de entre 35 y 40 $\mu\text{g/ml}$ para el régimen de cada 4 semanas. Al final de la infusión la mediana de las concentraciones plasmáticas de vedolizumab era de entre 98 y 101 $\mu\text{g/ml}$ para el régimen de cada 8 semanas (8 semanas) y de aproximadamente 129 y 137 $\mu\text{g/ml}$ para el de cada 4 semanas (4 semanas).

40

En las Tablas 32-35 se proporcionan resúmenes de las respuestas de los estudios de inducción y mantenimiento. Una proporción significativamente mayor de pacientes tratados con vedolizumab consiguió respuesta clínica, remisión y

5 cicatrización de la mucosa a las 6 semanas en comparación con el placebo (Tabla 32). El 39% de la población de análisis por intención de tratar en fase de inducción había tenido un fracaso de anti-TNF α previo. Las tasas de respuesta clínica y remisión eran mayores en pacientes con vedolizumab que con placebo entre los que habían tenido un fracaso previo de anti-TNF y los que no habían tenido exposición previa a anti-TNF. En análisis preliminares a lo largo de la semana 6, las tasas de eventos adversos (AE), AE graves y eventos adversos que condujeron a interrupción del estudio fueron mayores en el grupo de placebo que en el grupo de vedolizumab. Una proporción significativamente mayor de pacientes con vedolizumab que los pacientes con placebo consiguió la remisión clínica, cicatrización de la mucosa y remisión sin corticosteroides a las 52 semanas y respuesta y remisión duraderas (Tabla 33). El 32% de la población de estudio de mantenimiento había tenido un fracaso previo de anti-TNF α . Las tasas de remisión clínica y de respuesta clínica duradera fueron mayores con vedolizumab que con placebo en pacientes tanto con fracaso de TNF como sin TNF previo. En la población de seguridad (N = 895) para las semanas 0-52, las tasas de eventos adversos (AE), AE graves e infecciones graves fueron similares en los grupos de vedolizumab y de placebo. No se observó ningún aumento en las tasas de infecciones oportunistas o entéricas en el grupo de vedolizumab.

15 Tabla 32: Resultados de estudio de inducción – Criterios de valoración primarios y secundarios clave

Criterios de valoración de la eficacia	Placebo	Vedolizumab	Diferencia/RR	Valor de P
Respuesta clínica (%)	25,5%	47,1%	21,7%/1,8	<0,0001
Remisión clínica (%)	5,4%	16,9%	11,5%/3,1	0,0010
Cicatrización de la mucosa (%)	24,8%	40,9	16,1%/1,6	0,0013

Tabla 33: Resultados de estudio de mantenimiento – Criterios de valoración primarios y secundarios clave

Criterio de valoración de la eficacia	Placebo N=126	VDZ cada 8 N=122	VDZ cada 4 N=125	Diferencia/RR cada 8 frente a Pb cada 4 frente a Pb	Valor de P
Remisión clínica (%)	15,9	41,8	44,8	26,1/2,7 29,1/2,8	<0,0001 <0,0001
Respuesta duradera (%)	23,8	56,6	52,0	32,8/2,4 28,5/2,2	<0,0001 <0,0001
Cicatrización de la mucosa (%)	19,8	51,6	56,0	32,0/2,6 36,3/2,8	<0,0001 <0,0001
Remisión duradera (%)	8,7	20,5	24,0	11,8/2,4 15,3/2,8	0,0090 0,0011
Remisión sin corticosteroides (%)	13,9 n=72	31,4 n=70	45,2 N=73	17,6/2,3 31,4/3,3	0,0133 <0,0001

20 Tabla 34: Estudio de inducción: respuesta clínica y remisión a las 6 semanas en pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α y sin exposición a anti-TNF, población ITT

Pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α (39%)				
Criterio de valoración	Placebo N=63	Vedolizumab N=82	Diferencia	95% de IC
Respuesta clínica (%)	20,6	39,0	18,4	3,9, 32,9
Remisión clínica (%)	3,2	9,8	6,6	-9,8, 22,8
Pacientes sin exposición a antagonista anti-TNF- α (55%)				
	Placebo N=76	Vedolizumab N=130	Diferencia	95% de IC
Respuesta clínica (%)	26,3	53,1	26,8	13,7, 39,9
Remisión clínica (%)	6,6	23,1	16,5	2,4, 30,2

Tabla 35: Remisión clínica y respuesta clínica duradera a las 52 semanas: pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α o sin exposición a antagonista anti-TNF- α , población ITT

Pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α (32%)					
Criterio de valoración	Placebo N=38	VDZ cada 8 semanas N=43	VDZ cada 4 semanas N=40	Diferencia cada 8 semanas frente a placebo cada 4 semanas frente a placebo	95% de IC
Remisión clínica (%)	5,3	37,2	35,0	31,9 29,7	10,3, 51,4 7,4, 49,4
Respuesta clínica duradera (%)	15,8	46,5	42,5	30,7 26,7	11,8, 49,6 7,5, 45,9
Pacientes sin exposición a antagonista anti-TNF- α (60%)					
Criterio de valoración	Placebo N=79	VDZ cada 8 semanas N=72	VDZ cada 4 semanas N=73	Diferencia cada 8 semanas frente a placebo cada 4 semanas frente a placebo	95% de IC
Remisión clínica (%)	19,0	45,8	47,9	26,8 29,0	12,4, 41,2 14,6, 43,3
Respuesta clínica duradera (%)	26,6	65,3	56,2	38,7 29,6	24,0, 53,4 14,6, 44,6

Ejemplo 10: inducción y mantenimiento de la respuesta y remisión en pacientes con enfermedad de Crohn de moderada a gravemente activa

Un experimento simple que comprende dos estudios multicéntricos aleatorizados con doble ocultación diseñados para evaluar la inducción y el mantenimiento de la respuesta y remisión en pacientes con enfermedad de Crohn de moderada a gravemente activa. Las características demográficas y de la enfermedad basal fueron comparables a través de todos los grupos de tratamiento.

El estudio de inducción, usando administración intravenosa, comparó placebo frente a vedolizumab a una dosis de 300 mg reconstituida a partir de una formulación liofilizada de 60 mg/ml de anticuerpo en histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, sacarosa al 10%, a pH 6,3, con un criterio de valoración a las 6 semanas después de 2 dosis de vedolizumab.

El estudio de mantenimiento, usando la misma formulación y vía de administración que el estudio de inducción, comparó el placebo frente a vedolizumab dosificado cada cuatro semanas y placebo frente a vedolizumab dosificado cada ocho semanas. El criterio de valoración de este estudio fue a las 52 semanas, analizando la población que respondía a la inducción.

Sorprendentemente, este estudio mostró que los grupos de cada 4 y cada 8 semanas proporcionaron resultados muy similares. Los resúmenes de las respuestas de los estudios de inducción y mantenimiento se proporcionan en las Tablas 36-39. Una proporción significativamente mayor de pacientes tratados con vedolizumab consiguió la remisión clínica y la respuesta aumentada en comparación con el placebo (Tabla 36). Las tasas de remisión clínica y respuesta aumentada fueron mayores en pacientes con vedolizumab que con placebo entre los que habían tenido un fracaso previo de anti-TNF y los que no habían tenido exposición previa a anti-TNF. Las tasas de eventos adversos (AE), AE graves e infecciones graves fueron similares entre los grupos de vedolizumab y de placebo. No se observó aumento en las tasas de infecciones oportunistas o entéricas en el grupo de vedolizumab.

Tabla 36: resultados de estudio de inducción - criterios de valoración primarios y secundarios

Criterios de valoración	Placebo N=148	Vedolizumab N=220	Diferencia ajustada/RR	Valor de P
Remisión clínica (%)	6,8%	14,5%	7,8%/2,1	0,0206
Respuesta aumentada (%)	25,7%	31,4%	5,7%/1,2	0,2322
Cambio de CRP medio (μ g/ml)	-3,6 N=147	-2,9 N=220		0,9288

Tabla 37: resultados de estudio de mantenimiento - criterios de valoración primarios y secundarios clave

Criterio de valoración de eficacia	Placebo N=153	VDZ cada 8 N=154	VDZ cada 4 N=154	Diferencia ajustada/RR cada 8 frente a Pb cada 4 frente a Pb	Valor de P
Remisión clínica (%)	21,6	39,0	36,4	17,4/1,8 14,7/1,7	0,0007 0,0042
Respuesta aumentada (%)	30,1	43,5	45,5	13,4/1,4 15,3/1,5	0,0132 0,0053
Remisión sin corticosteroides (%)	15,9 N=82	31,7 N=82	28,8 N=80	15,9/2,0 12,9/1,8	0,0154 0,0450
Remisión duradera (%)	14,4	21,4	16,2	7,2/1,5 2,0/1,1	0,1036 0,6413

Tabla 38: remisión clínica y respuesta aumentada a las 6 semanas en pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α y sin exposición a anti-TNF, población ITT

Pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α (48%)				
Criterio de valoración	Placebo N=70	Vedolizumab N=105	Diferencia	95% de IC
Remisión Clínica (%)	4,3	10,5	6,2	(-9,1, 21,3)
Respuesta aumentada (%)	22,9	23,8	1,0	(-11,8, 13,7)
Pacientes sin exposición a antagonista anti-TNF- α (50%)				
	Placebo N=76	Vedolizumab N=130109	Diferencia	95% de IC
Remisión Clínica (%)	9,2	17,4	8,2	(-1,4, 17,9)
Respuesta aumentada (%)	30,3	42,2	11,9	(-1,9, 25,8)

5

Tabla 39: remisión clínica y respuesta aumentada a las 52 semanas: pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α o sin exposición a antagonista anti-TNF- α , población ITT

Pacientes con fracaso previo de antagonista anti-TNF- α (51%)						
Criterio de valoración	Placebo N=78		VDZ cada 8 semanas N=82	VDZ cada 4 semanas N=77	Diferencia cada 8 semanas frente a placebo cada 4 semanas frente a placebo	95% de IC
Remisión Clínica (%)	12,8		28,0	27,3	15,2 14,5	(3,0, 27,5) (2,0, 26,9)
Respuesta aumentada (%)	20,5		29,3	37,7	8,8 17,1	(-4,6, 22,1) (3,1, 31,2)
Pacientes sin exposición a antagonista anti-TNF- α (45%)						
	Placebo N=71	VDZ cada 8 semanas N=66	VDZ cada 4 semanas N=71	Diferencia cada 8 semanas frente a placebo cada 4 semanas frente a placebo		95% de IC
Remisión Clínica (%)	26,8	51,1	46,5	24,8 19,7		(8,9, 40,6) (4,2, 35,2)
Respuesta aumentada (%)	38,0	60,6	53,5	22,6 15,5		(6,3, 38,9) (-0,7, 31,7)

Tabla 40: Resumen de secuencias

SEQ ID No:	Secuencia mostrada	Descripción
1	FIG. 1	ADN que codifica la cadena pesada de la inmunoglobulina anti- α 4 β 7 humanizada
2	FIG. 1	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la inmunoglobulina anti- α 4 β 7 humanizada
3	FIG. 2	ADN que codifica la cadena ligera de la inmunoglobulina anti- α 4 β 7 humanizada
4	FIG. 2	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la inmunoglobulina anti- α 4 β 7 humanizada
5	FIG. 3	Cadena ligera humanizada madura de LDP-02
6	FIG. 4	Región constante de la cadena ligera kappa humana genérica
7	FIG. 4	Región constante de la cadena ligera kappa murina genérica
8	Mencionada en la página 30 SYWMH	CDR1 de cadena pesada de anticuerpo ACT-1 de ratón
9	Mencionada en la página 30 EIDPSESNTNYNQKFKG	CDR2 de anticuerpo ACT-1 de ratón de cadena pesada
10	Mencionada en la página 30 GGYDGWDYAIIDY	CDR3 de anticuerpo ACT-1 de ratón de cadena pesada
11	Mencionada en la página 30 RSSQLAKSYGNTYLS	CDR1 de anticuerpo ACT-1 de ratón de cadena ligera
12	Mencionada en la página 30 GISNRFS	CDR2 de anticuerpo ACT-1 de ratón de cadena ligera
13	Mencionada en la página 30 LQGTHQPYT	CDR3 de anticuerpo ACT-1 de ratón de cadena ligera
14	FIG. 7	Región variable de cadena ligera kappa de anticuerpo GM607 CL humano
15	FIG. 7	Región variable de cadena pesada de anticuerpo 21/28 CL humano

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> FORMULACIÓN PARA ANTICUERPO ANTI-ALFA-4-BETA-7
 <130> 079259-0615
 <140>
 <141>
 10 <150> 61/585.859
 <151> 12-01-2012
 <150> 61/550.545
 <151> 24-10-2011
 <150> 61/481.533
 15 <151> 02-05-2011
 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1445
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 25 <400> 1

ES 2 645 187 T3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa	60
cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc	120
ctggggcttc agtgaagggtg tcctgcaaggt gttctggcta caccttcacc agctactgga	180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt	240
ctgagagtaa tactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca	300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct	360
actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tggggctcaag	420
gcaccctggt caccgtcagc tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac	480
cctcctcca gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact	540
tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct	600
tcccggtgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct	660
ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca	720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc	780
cagcacctga actcgcgggg gcaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca	840
ccctcatgat ctcccggacc cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag	900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca	960
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc	1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag	1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca	1140
ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca	1200
aaggcttcta tcccagcgac atcgcctgtg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca	1260
actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc	1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg	1380
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccgggt aaataatcta	1440
gagca	1445
<210> 2	
<211> 470	
<212> PRT	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<221> fuente	
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"	
<400> 2	

5

ES 2 645 187 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp
 115 120 125

ES 2 645 187 T3

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

ES 2 645 187 T3

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 3
 <211> 751
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 3

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa 60
 cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca 120
 ccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg 180
 ggaacaccta tttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctctcatct 240
 atgggatttc caacagattt tctgggggtgc cagacaggtt cagtggcagt ggttcagggg 300
 cagatttcac actcaagatc tcgcgagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct 360
 tacaaggtac acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta 420
 cgggtggctgc accatctgtc ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aatctggaa 480
 ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 540
 aggtggataa cgccctocaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 600
 aggacagcac ctacagctc agcagcacc tgaccctgag caaagcagac tacgagaac 660
 acaaagtcta cgcctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct 720

tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c 751

<210> 4
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 645 187 T3

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                               5 10 15

Val His Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
                20                    25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35                    40 45

Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50                                55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
65                                70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                85                    90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
                100                   105 110

Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
115                    120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130                    135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145                    150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165                    170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180                    185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195                    200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210                    215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                    230 235

```

5
 <210> 5
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 5

```

Asp Val 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 Ala Lys Ser
          20          25          30

Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe 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 Leu Gln Gly
          85          90          95

Thr His Gln Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          130          135          140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145          150          155          160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175
    
```

10

ES 2 645 187 T3

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

5

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 7

10

ES 2 645 187 T3

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 100 105

<210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 8

Ser Tyr Trp Met His
 1 5

<210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 9

Glu Ile Asp Pro Ser Glu Ser Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 10

Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Asp Tyr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Mus sp.
 <400> 12

 Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 13

 Leu Gln Gly Thr His Gln Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 14
 15 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 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 Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 20 <210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

ES 2 645 187 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación que comprende una dosis de 300 mg de vedolizumab de 60 mg/ml de vedolizumab en histidina 50 mM, arginina 125 mM, polisorbato 80 al 0,06%, sacarosa al 10% a pH 6,3 reconstituida de una formulación liofilizada.
2. La formulación según la reivindicación 1, en la que la formulación liofilizada tiene $\geq 55\%$ de isoforma cargada principal.
- 10 3. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación liofilizada tiene $\geq 95\%$ de anticuerpo monomérico.
4. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación liofilizada tiene $\leq 2,5\%$ de agregado.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano, en el que dicha formulación está en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad o trastorno.
- 20 6. La formulación de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano, en el que la formulación sólida se disuelve en un medio o disolvente adecuado para convertirse en una formulación líquida antes de la administración.
7. La formulación de la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano, en el que el medio o disolvente adecuado es solución salina isotónica.
- 25 8. La formulación de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano, en el que el medio o disolvente adecuado es solución de Ringer.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino.

FIG. 1A

Nuevo ADN de pesada de LDP02 -- -- contiene sitios de clonación (minúscula), secuencia de Kozak (mayúscula) y líder (minúscula)

gaattctcgatcgatCTCACCatgggatggagctatcatcctctcttcttgtagcaacagctacaggtgtccactccag
 gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
 GGTGTCCTGCCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCATTGGG
 TGAGGCAGGGCCCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
 TGAGAGTAATACTAATAACAATAAATAAATAAAGGGACGGCTCACATTGACT
 GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
 AGGACACTGGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGTTACGACGGATGGGACTA
 TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCCTGGTCAACCGTCAGCTCAGCCTCCA
 CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCCAAGAGCACCTCTGGG
 GGCACAGGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
 CCGTGTCTGGAACCTCAGGGCCCTGACCAGGGGGTGCACACCTTCCCCGGC
 TGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCCAG
 CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC
 ACATGCCCAACCGTGCCAGCACCTGAACCTGCGGGGGCACCCGTGAGTCTTCC
 TCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
 ACATGCGTGTGTGGACGTGAGCCACCGAAGACCCCTGAGGTCAGTTCAACT
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCACCGTCTCACCCGTCTGCACCA
 GGACTGGCTGAATGGC

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACACAGGTGTACACCCCT
 GCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTACAGCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACCGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTC
 CTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATAatctagca

Nueva proteína de pesada de LDP02 (espacio entre VHL, VH e IgG1-FcRmut humana)

MGWSCILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTSYWMHWVVRQAPGQRLEWIGEIDP
SENTINYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGGWDY
AIDYWGQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

FIG. 1B

FIG. 2

Nuevo ADN de ligera de LDP02 - contiene sitios de clonación (minúscula), secuencia de Kozak (mayúscula) y líder (minúscula)

```

gaattctcgatc gatCTCACcAtgggatggactgtatctcttcttggtagcaacagctacaggtgccactccgat
GTAGTGATGACTCAAAGTCCACTCTCCCTGCCCTGTCACCCCCTGGAGAACCCAGC
TTCTATCTCTTGCAGGCTAGTCAGAGTCTTGCAAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAAAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAACAGATTTTCTGGGTGCCAGACAGGTTCAGTGCCAGTGGT
CAGGACAGATTTCACACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTCCGACAGGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTGTGCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGCCCTGAGCTCGCCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagtctagcagc

```

Nueva proteína de ligera de LDP02 (espacio entre VKL, VK y kappa C humana)

```

MGWSCIILFLVATATGVHS
DVVMTQSPLSLPVTPEPAPISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQQTHQPYTFGGQTKVEI
K
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

FIG. 3

Comparación por		newMLN02-no sig	LDP-02-no sig.txt
21	✓	✓	✓
	MTQSP	MTQSP	MTQSP
	LSLPV	LSLPV	LSLPV
	TTPGE	TTPGE	TTPGE
	PASIS	PASIS	PASIS
	CRSSQ	CRSSQ	CRSSQ
	LAKSY	LAKSY	LAKSY
	GNTRY	GNTRY	GNTRY
	LSWYL	LSWYL	LSWYL
	QKPGQ	QKPGQ	QKPGQ
	SPQ	SPQ	SPQ
50			
B 1	DVVM	DVVM	DVVM
	TQSP	TQSP	TQSP
	LPLSV	LPLSV	LPLSV
	TTPGE	TTPGE	TTPGE
	PASIS	PASIS	PASIS
	CRSSQ	CRSSQ	CRSSQ
	LAKSY	LAKSY	LAKSY
	GNTRY	GNTRY	GNTRY
	LSWYL	LSWYL	LSWYL
	QKPGQ	QKPGQ	QKPGQ
	SPQ	SPQ	SPQ
50			
51	LLIY	LLIY	LLIY
	GISN	GISN	GISN
	RFSG	RFSG	RFSG
	VDPDR	VDPDR	VDPDR
	FRFSG	FRFSG	FRFSG
	GGTDF	GGTDF	GGTDF
	TLKIS	TLKIS	TLKIS
	RV	RV	RV
	EADVG	EADVG	EADVG
	VYYCL	VYYCL	VYYCL
	QGT	QGT	QGT
	HQP	HQP	HQP
100			
51	LLIY	LLIY	LLIY
	GISN	GISN	GISN
	RFSG	RFSG	RFSG
	VDPDR	VDPDR	VDPDR
	FRFSG	FRFSG	FRFSG
	GGTDF	GGTDF	GGTDF
	TLKIS	TLKIS	TLKIS
	RV	RV	RV
	EADVG	EADVG	EADVG
	VYYCL	VYYCL	VYYCL
	QGT	QGT	QGT
	HQP	HQP	HQP
100			
101	YTFG	YTFG	YTFG
	QGT	QGT	QGT
	KVEI	KVEI	KVEI
	KRTVA	KRTVA	KRTVA
	APSV	APSV	APSV
	FIFPP	FIFPP	FIFPP
	SDEQL	SDEQL	SDEQL
	KSGT	KSGT	KSGT
	ASVVC	ASVVC	ASVVC
	LNNFY	LNNFY	LNNFY
	PREAK	PREAK	PREAK
150			
101	YTFG	YTFG	YTFG
	QGT	QGT	QGT
	KVEI	KVEI	KVEI
	KRADA	KRADA	KRADA
	APSV	APSV	APSV
	FIFPP	FIFPP	FIFPP
	SDEQL	SDEQL	SDEQL
	KSGT	KSGT	KSGT
	ASVVC	ASVVC	ASVVC
	LNNFY	LNNFY	LNNFY
	PREAK	PREAK	PREAK
150			
151	VQWK	VQWK	VQWK
	VDNA	VDNA	VDNA
	LQSG	LQSG	LQSG
	NSQES	NSQES	NSQES
	VTEQ	VTEQ	VTEQ
	SKD	SKD	SKD
	STYSL	STYSL	STYSL
	SS	SS	SS
	TL	TL	TL
	SKA	SKA	SKA
	DYE	DYE	DYE
	KKV	KKV	KKV
	YACE	YACE	YACE
200			
151	VQWK	VQWK	VQWK
	VDNA	VDNA	VDNA
	LQSG	LQSG	LQSG
	NSQES	NSQES	NSQES
	VTEQ	VTEQ	VTEQ
	SKD	SKD	SKD
	STYSL	STYSL	STYSL
	SS	SS	SS
	TL	TL	TL
	SKA	SKA	SKA
	DYE	DYE	DYE
	KKV	KKV	KKV
	YACE	YACE	YACE
200			
201	VTHQ	VTHQ	VTHQ
	GLSS	GLSS	GLSS
	PVTK	PVTK	PVTK
	SFNR	SFNR	SFNR
	GEC	GEC	GEC
219			
201	VTHQ	VTHQ	VTHQ
	GLSS	GLSS	GLSS
	PVTK	PVTK	PVTK
	SFNR	SFNR	SFNR
	GEC	GEC	GEC
219			

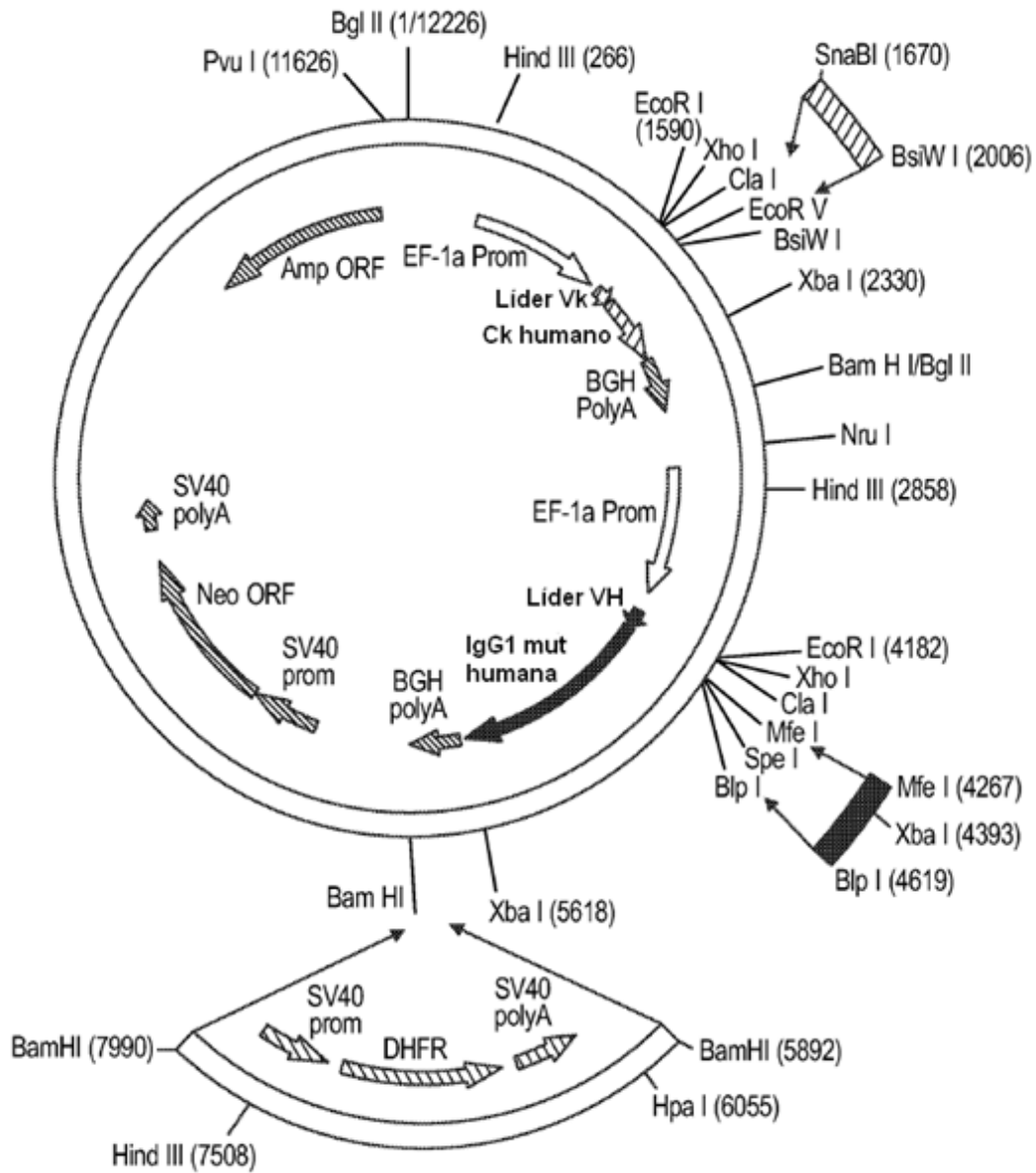
FIG. 4

```

Comparación por pares Hum kappa-          MI:Mur kappa-const.txt
-----
A 1 rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc1l1nnfypreakvqwkvdnalqsg 50
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
B 1 radaaptvsifppsseq1tsggasvvcf1nnfypkdinvkwidgserqn 50
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
51 nsqesvteqdskdstys1s1st1t1skadyekhkvyacevthqglsspvtk 100
  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
51 gvlnswtdqdskdstysms1t1tkdeyerhnsytceathktstspivk 100

101 sfnrgec 107
   |  |  |  |  |
101 sfnrrec 107

```



pLKTOK38D

FIG. 5

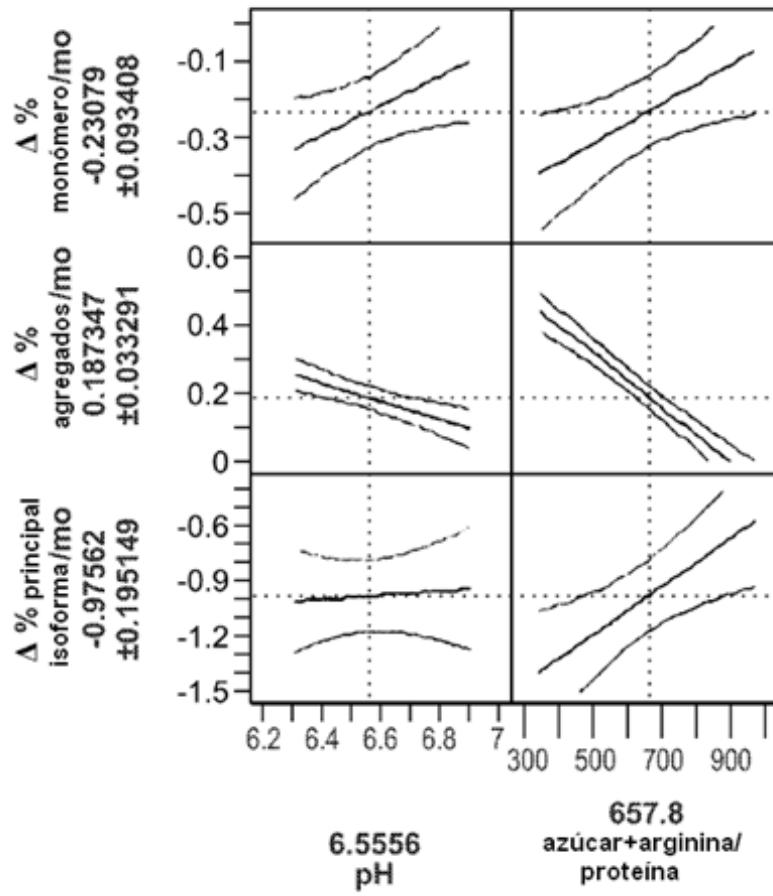


FIG. 6A

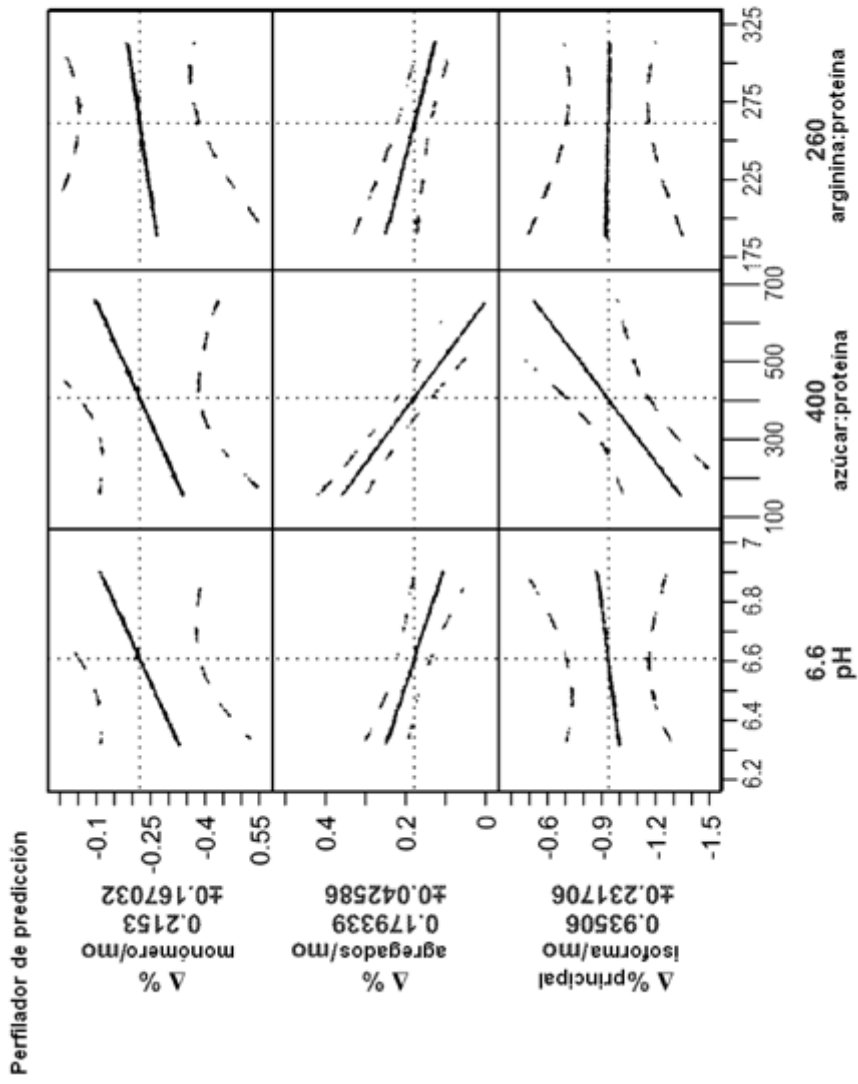


FIG. 6B

**región variable de cadena ligera
kappa de anticuerpo GM607'CI**

FIG. 7

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

región variable de cadena pesada

de anticuerpo 21/28'CL

SEQ ID NO: 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

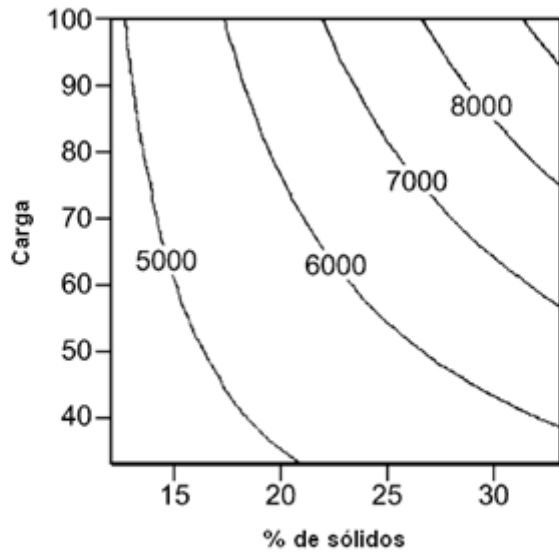


FIG. 8

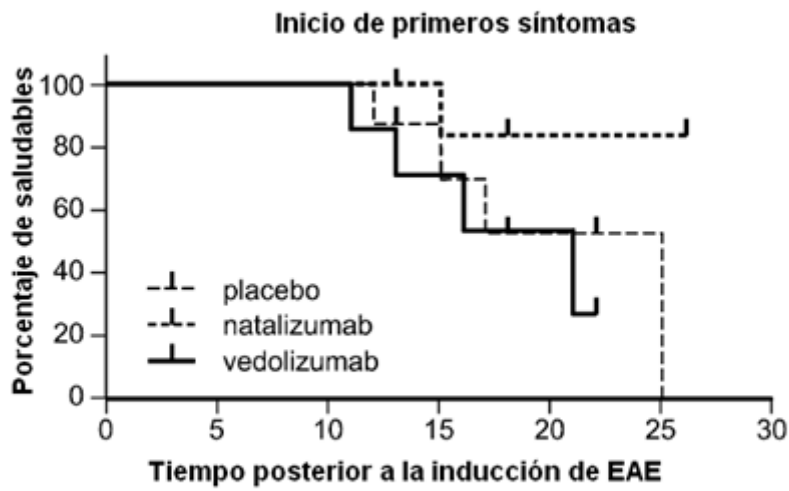


FIG. 9