

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 717**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2012** **PCT/US2012/036069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012** **WO12151247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2012** **E 12722973 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 2704742**

54 Título: **Formulación para anticuerpo anti- 4 7**

30 Prioridad:

02.05.2011 US 201161481522 P
06.10.2011 US 201161544054 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DILUZIO, WILLOW;
NGUYEN, PHUONG M.;
VARGA, CSANAD M.;
PALANIAPPAN, VAITHIANATHAN;
BROWN, JASON;
FOX, IRVING H.;
SCHOLZ, CATHERINE;
JENKINS, ERICA HELEN y
ROSARIO, MARIA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 646 717 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- 4 7

Descripción

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad respecto a la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/544.054, presentada el 6 de octubre de 2011, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/481.522, presentada el 2 de mayo de 2011. El contenido completo de las solicitudes anteriores se incorpora en la presente memoria por referencia.

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 por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII creada el 30 de abril de 2012 se denomina 92596603.txt y tiene un tamaño de 16.986 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)). Está disponible 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.).

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.

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.

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 adresasas 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 mucosal 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 proporcionen métodos de tratamiento (confirmados por datos de ensayos clínicos) descritos 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 subcutáneas, 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.

5 Resumen de la invención

La invención se refiere a la identificación de un antioxidante o quelante 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.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende una mezcla de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un antioxidante o quelante y al menos un aminoácido libre.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida estable tiene menos de aproximadamente el 1,0% de formación de agregados después de 12 meses a temperatura ambiente. La formulación farmacéutica líquida estable puede tener menos de aproximadamente el 0,2% de formación de agregados después de 12 meses a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, el antioxidante o quelante es citrato. En algunas realizaciones, el quelante es EDTA. En algunas realizaciones, 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 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.

La formulación también puede contener un tensioactivo. El tensioactivo puede ser polisorbato 20, polisorbato 80, un poloxámero o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la proporción molar del antioxidante respecto al tensioactivo es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 156:1.

La formulación puede tener un pH de entre aproximadamente 6,3 y aproximadamente 7,0. El pH de la formulación puede estar entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 6,8. La formulación puede tener un pH de entre aproximadamente 6,1 y aproximadamente 7,0, o de entre aproximadamente 6,2 y 6,8.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida estable contiene de al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La formulación puede contener al menos aproximadamente 160 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La formulación puede contener de aproximadamente 150 a aproximadamente 180 mg/ml de anticuerpo o aproximadamente 165 mg/ml de anticuerpo.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende de al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante y al menos aproximadamente 10 mM de citrato. El agente tamponante puede ser un tampón de histidina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende de al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante y al menos aproximadamente 5 mM de citrato. El agente tamponante puede ser un tampón de histidina.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende al menos aproximadamente 160 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y al menos aproximadamente 10 mM de citrato. La formulación puede contener además polisorbato 80.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende aproximadamente 160 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y al menos aproximadamente 5 mM de citrato. La formulación puede contener además polisorbato 80.

En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable que comprende una mezcla de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, histidina, arginina y polisorbato 80. La formulación puede estar presente en un recipiente, tal como un vial, cartucho, jeringa o autoinyector.

El anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en la formulación farmacéutica líquida estable de la invención puede ser vedolizumab. La formulación de la invención puede ser para administración subcutánea, intravenosa o intramuscular.

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

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, que comprende administrar a un paciente que lo necesite la formulación farmacéutica líquida estable descrita en la presente memoria. La administración puede ser una administración subcutánea. La administración puede ser una autoadministración.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un artículo de fabricación, que comprende un recipiente, una formulación farmacéutica líquida estable descrita en la presente memoria e instrucciones para su uso.

En un aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma, que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente: (a) dosis iniciales, por ejemplo, en un régimen de tratamiento de fase de inducción, de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una inyección subcutánea día sí día no durante seis dosis; (b) seguidas en la semana seis de una séptima dosis y dosis posteriores, por ejemplo, en un régimen de tratamiento de fase de mantenimiento, de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una inyección subcutánea cada dos semanas o cada cuatro semanas según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En un aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma, que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente, que comprende una fase de inducción de dosis intravenosas y una fase de mantenimiento de dosis subcutáneas: (a) una dosis intravenosa inicial de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una infusión intravenosa; (b) seguida de una segunda dosis intravenosa posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una infusión intravenosa a aproximadamente dos semanas después de la dosis inicial; (c) seguida de, comenzando en las semanas seis, una tercera dosis y dosis posteriores de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una inyección subcutánea cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En otro aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con un régimen de dosificación subcutáneo o intramuscular que mantiene una concentración en suero valle en estado estacionario media de la inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno de la misma de aproximadamente 9 a aproximadamente 13 $\mu\text{g/ml}$; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En otro aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con un régimen de dosificación subcutáneo o intramuscular que mantiene una concentración en suero valle en estado estacionario media de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de un paciente humano que padece 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con el siguiente régimen de dosificación: (a) una pluralidad de dosis de fase de inducción de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma suficiente para conseguir una concentración en suero valle media de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$ de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma en aproximadamente seis semanas desde la dosificación inicial; (b) seguido de una pluralidad de dosis de fase de mantenimiento de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma según sea necesario para mantener una concentración en suero valle en estado estacionario media de aproximadamente 9 a aproximadamente 13 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 35 a 40 $\mu\text{g/ml}$ de la inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno de la misma; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En algunos aspectos, la formulación, el método de tratamiento, la dosis y/o el régimen de dosis aseguran una probabilidad mínima de que un paciente desarrolle anticuerpos reactivos contra el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

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.

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.

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.

El paciente puede haber recibido previamente tratamiento con al menos un corticosteroide para la enfermedad inflamatoria del intestino. El paciente puede recibir al mismo tiempo 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.

En algunos aspectos, la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra en una forma de dosificación final a una concentración de entre aproximadamente 1,0 mg/ml a 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.

En algunos aspectos, la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno se administra en una forma de dosificación final que tiene una cantidad de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ de entre aproximadamente 70 a

250 mg, de entre aproximadamente 90 a aproximadamente 200 mg, de entre aproximadamente 150 a aproximadamente 180 mg, o de al menos 160 mg.

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.

En algunos aspectos el método de tratamiento con la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, la dosis o el régimen de dosis pueden minimizar la inmunogenicidad del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

Breve descripción de los dibujos

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.

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.

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.

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.

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).

La FIG. 6 muestra la pendiente de formación de agregados por SEC (% por día) como resultado de cambios en la concentración de proteína, el pH y la proporción molar de tensioactivo:proteína. A un intervalo de pH de 6,0 a 6,5, la formación de agregados era similar para la formulación con el intervalo de proporción molar de polisorbato 80:proteína de 0,7 a 1,5.

La FIG. 7 es una gráfica que muestra que a proporciones molares de polisorbato 80:proteína superiores a 1,5, la velocidad de formación de agregados aumenta a medida que aumenta el pH.

La FIG. 8 es una gráfica que muestra el efecto de excipientes sobre la formación de agregados. Se añadió citrato

mM, citrato 5 mM, EDTA 5 mM, cisteína 25 mM o cisteína 5 mM a las formulaciones. Los tres excipientes redujeron la formación de agregados.

La FIG. 9 es un conjunto de gráficas que muestra la reducción en la formación de agregados con la presencia de citrato 25 mM en la formulación, y una correlación entre una concentración de proteína aumentada y una velocidad de formación de agregados aumentada.

La FIG. 10 es una gráfica que muestra los resultados de la degradación de especies por CEX a 40°C. Los datos muestran la influencia del cambio de pH sobre la degradación por CEX.

La FIG. 11 es una gráfica que muestra el efecto de la temperatura sobre el pH de las formulaciones. El pH de las formulaciones que contienen histidina disminuye con la temperatura, mientras que el pH de las formulaciones con citrato no se ve afectado por la temperatura.

La FIG. 12 es una gráfica que muestra el porcentaje de isoforma principal por CEX a lo largo de un periodo de doce meses. Las formulaciones que tenían un pH de 6,0-6,2 mostraron aproximadamente el 1-2% menos isoforma principal que las formulaciones que tenían un pH de 6,3-6,4.

La FIG. 13 muestra un conjunto de gráficas que demuestran que la viscosidad se ve afectada principalmente por la concentración de proteína y el pH. Se demuestra que las adiciones de sacarosa, histidina y arginina tienen un efecto minoritario sobre la viscosidad de la formulación.

Las FIGS. 14 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. 15 muestra componentes de un producto proteico en una jeringa precargada.

Las FIGS. 16A-B muestran el efecto de (A) la concentración de proteína y (B) la viscosidad sobre la fuerza de inyección de diversas jeringas ensayadas.

La FIG. 17 (A) muestra la fuerza de deslizamiento inicial en función de la concentración de proteína y del tamaño de aguja. La FIG. 17 (B) muestra la fuerza de deslizamiento inicial para cada fabricante de jeringa y tamaño de aguja.

La FIG. 18 muestra el perfil de absorción del vedolizumab. La gráfica muestra que las concentraciones de las dosis intramuscular y subcutánea generalmente se superponen. No existen diferencias macroscópicas aparentes en los perfiles de absorción de estas vías de administración.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$. La formulación farmacéutica puede ser una mezcla que comprende un antioxidante o quelante (por ejemplo, citrato), anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y un aminoácido libre. La formulación farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida.

Definiciones

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que contiene un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en una forma tal que permite 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 su 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, por ejemplo, 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). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Por ejemplo, la formulación líquida es estable a aproximadamente 40°C durante al menos aproximadamente 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o 6 semanas. En otro aspecto, la formulación liofilizada es estable a aproximadamente 40°C durante al menos aproximadamente 2-4 semanas, 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. La formulación líquida y/o liofilizada en otro aspecto es estable a aproximadamente 5°C y/o 25°C durante al menos aproximadamente 1 mes, 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, o al menos aproximadamente 36

meses; y/o estable a aproximadamente -20°C y/o -70°C durante al menos aproximadamente 1 mes, 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, por ejemplo, después de 1, 2 o 3 ciclos de congelación y descongelación.

La estabilidad de una formulación líquida puede evaluarse cualitativamente y/o cuantitativamente de una diversidad de formas diferentes, incluyendo la evaluación de la formación de dímeros, multímeros y/o agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño (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 estática, 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 y/o por inspección visual); por evaluación de la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico (CEX), concentración isoeléctrica (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 anticuerpo fragmentado, intacto y multimérico (es decir, dimérico, trimérico, etc.); análisis de mapa peptídico (por ejemplo, tríptico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o de la función de unión al antígeno del anticuerpo; y similares. 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) 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 inestabilidad puede implicar uno o más de cualquiera de: agregación (por ejemplo, agregación soluble no covalente, agregación soluble covalente (por ejemplo, reorganización/desorden de enlaces disulfuro), agregación insoluble), desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, extensión N-terminal, procesamiento C-terminal, diferencias de glicosilación y similares.

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 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 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 β_7 (ITGB7). Cada cadena puede formar un heterodímero con una cadena de integrina alternativa para formar, por ejemplo, $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_E\beta_7$. Los genes de α_4 y β_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 adreína de la mucosa (MAdCAM, por ejemplo, MAdCAM-1).

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 $\alpha_E\beta_7$.

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.

Como se usa en la presente memoria, un "agente tamponante" se refiere a un tampón que resiste cambios en el pH por acción de sus componentes ácido-base conjugados. El agente tamponante puede estar presente en una formulación líquida o sólida de la invención. En algunas realizaciones, el agente tamponante de esta invención ajusta el pH de la formulación a de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, a de aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente 7,5, a de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 7,0, o a un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5. En un aspecto, los ejemplos de agentes tamponantes que, en solitario o en combinación, 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]etanosulfónico (MES), bis(2-hidroxietil)iminotris[hidroximetil]metano (Bis-Tris), ácido N-[2-acetamido]-2-iminodiacético (ADA), glicilglicina y otros tampones ácidos orgánicos. En otro aspecto, el agente tamponante de la presente memoria es histidina o citrato.

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 y aproximadamente 7,0, de entre aproximadamente pH 6,1 y aproximadamente 6,9, o de aproximadamente pH 6,5.

Un "tampón citrato" es un tampón que comprende iones citrato. Los ejemplos de tampones citrato incluyen soluciones de citrato de sodio, citrato de amonio, citrato de calcio y citrato de potasio. El tampón citrato tiene un pH de aproximadamente 3,0 a 6,2, de aproximadamente pH 5,5 a 6,5, de aproximadamente pH 6,1 a aproximadamente 6,5, de aproximadamente pH 6,1, de aproximadamente pH 6,2, o de aproximadamente pH 6,5.

Un "sacárido" en la presente memoria es un compuesto que tiene una fórmula general $(CH_2O)_n$ y derivados del mismo, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcares, azúcares reductores, azúcares no reductores y similares. 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 un aspecto, un sacárido de la presente memoria es un disacárido no reductor tal como sacarosa.

En la presente memoria, un "tensioactivo" se refiere a un agente que disminuye la tensión superficial de un líquido. En un aspecto, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos de la presente memoria incluyen polisorbato (monolaurato de polioxietilen sorbitán, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); TRITON (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol, detergente no iónico, Union Carbide subsidiary of Dow Chemical Co., Midland MI); dodecil sulfato sódico (SDS); lauril sulfato sódico; octil glucósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaina; 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, Pluronics/Poloxamer, PF68 etc.); etc. En otro aspecto, el tensioactivo de la presente memoria es polisorbato 80.

El término "quelante" se refiere a un agente que se une a un átomo a través de más de un enlace. En un aspecto, los ejemplos de quelantes de la presente memoria incluyen citrato, ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), dimercaprol, ácido dietilentriaminopentaacético y N,N-bis(carboximetil)glicina. En otro aspecto, el quelante es citrato o EDTA.

El término "antioxidante" se refiere a un agente que inhibe la oxidación de otras moléculas. Los ejemplos de antioxidantes de la presente memoria incluyen citrato, ácido lipoico, ácido úrico, glutatión, tocoferol, caroteno, licopeno, cisteína, compuestos de fosfonato, por ejemplo, ácido etidróico, desferoxamina y malato.

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.

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. 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.

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 humanizada 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.

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.

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-α4β7.

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.

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.

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.

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).

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 M. Dairon, *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. Opin. 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, como alternativa, 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.

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).

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.

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).

Formulaciones

Como se describe en la presente memoria, se ha descubierto que los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ son más estables cuando se formulan con un antioxidante o quelante. Además, como se describe en la presente memoria, los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ puedan formularse para reducir la formación de agregados (por ejemplo, la cantidad de polisorbato 80 en la formulación puede reducirse). Por ejemplo, las formulaciones que comprenden citrato o EDTA y anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ disminuyen la velocidad de formación de agregados de anticuerpos durante el almacenamiento. Las formulaciones también pueden almacenarse sin oxígeno para reducir la formación de agregados. En una realización, la formulación tiene una formación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 2,5% a 25°C después de 12 meses. En una realización, la formulación tiene una formación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 2,0% a 25°C después de 12 meses. En una

realización, la formulación tiene una formación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 1,6% a 25°C después de 12 meses. En una realización, la formulación tiene una formación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 1,3% a 25°C después de 12 meses. En una realización, la formulación tiene una formación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 1,0% a 25°C después de 12 meses. En otra realización, la formulación tiene una formulación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 0,5% a 5°C después de 12 meses. En otra realización, la formulación tiene una formulación de agregados de anticuerpos de menos de aproximadamente el 0,3% a 5°C después de 12 meses.

La presente invención proporciona, en un primer aspecto, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ estable. La formulación comprende un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y un antioxidante o quelante. La formulación también comprende un agente tamponante que puede ser uno o más aminoácidos libres. La formulación puede comprender opcionalmente además un tensioactivo. El anticuerpo en la formulación puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión al antígeno del mismo, tal como un fragmento Fab, Fv, scFv, Fab' o F(ab')₂.

La formación de agregados puede reducirse por eliminación de oxígeno de la formulación. Como alternativa, la formulación puede contener un antioxidante o quelante. En un aspecto, los antioxidantes y quelantes ejemplares que pueden incluirse en la formulación incluyen ácido lipoico, ácido úrico, glutatión, tocoferol, caroteno, licopeno, cisteína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), dimercaprol, ácido dietilentriaminopentaacético y N,N-bis(carboximetil)glicina, compuestos de fosfonato, por ejemplo, ácido etidrónico, desferoxamina, malato y citrato. Algunos antioxidantes y quelantes pueden disminuir la velocidad de formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación. En otro aspecto, el quelante y/o antioxidante es citrato o EDTA. Las concentraciones de quelante ejemplares para formulaciones líquidas están en el intervalo de aproximadamente más de 0 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, y de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mM. En otro aspecto, la concentración de quelante es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM. En una realización, el quelante y/o antioxidante es citrato y la concentración de citrato es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 5 mM.

La formulación puede contener cualquier aminoácido libre deseado, que puede estar en la forma L, la forma D o cualquier mezcla deseada de estas formas. En un aspecto, los aminoácidos libres que pueden incluirse en la formulación incluyen, por ejemplo, histidina, alanina, arginina, glicina, ácido glutámico, serina, lisina, triptófano, valina, cisteína y combinaciones de los mismos. Algunos aminoácidos pueden estabilizar las proteínas frente a la degradación durante la fabricación, secado, liofilización y/o almacenamiento, por ejemplo, a través de enlaces de hidrógeno, puentes salinos, propiedades antioxidantes o interacciones hidrófobas, o por exclusión de la superficie de la proteína. Los aminoácidos pueden actuar como modificadores de la tonicidad o pueden actuar para disminuir la viscosidad de la formulación. En otro aspecto, los aminoácidos libres, tales como histidina y arginina, pueden actuar como lioprotectores, y no cristalizan cuando se liofilizan como componentes de la formulación. Los aminoácidos libres, tales como ácido glutámico e histidina, en solitario o en combinación, pueden actuar como agentes tamponantes en solución acuosa en el intervalo de pH de 5 a 7,5. En todavía otro aspecto más, la formulación contiene histidina, arginina o una combinación de histidina y arginina. En todavía otro aspecto más, las concentraciones de aminoácidos libres para formulaciones líquidas están en el intervalo de aproximadamente 9 mM a aproximadamente 0,5 M, por ejemplo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 75 mM, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 120 mM, de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 mM, o de aproximadamente 50 mM o de aproximadamente 125 mM.

La formulación puede contener opcionalmente además a un tensioactivo, por ejemplo, para controlar la formación de agregados solubles e insolubles. En un aspecto, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. En otro aspecto, el tensioactivo es un tensioactivo iónico. Los tensioactivos ejemplares que pueden incluirse en la formulación incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, un poloxámero (Pluronic®) y combinaciones de los mismos. Cuando está presente, el tensioactivo se incluye generalmente en una cantidad que reduce la formación de agregados insolubles de anticuerpo, por ejemplo, durante el embotellado, la congelación, el secado, la liofilización y/o la reconstitución, en presencia de viales de carga de silicona, jeringas precargadas y/o cartuchos. La concentración de tensioactivo es generalmente de aproximadamente el 0,0001% a aproximadamente el 1,0%, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,5%, por ejemplo, de aproximadamente el 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,20%, 0,3%, 0,4% o 0,5% (p/v). Mayores concentraciones de tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, pueden conducir a más formación de agregados por SEC. La reducción de la concentración de polisorbato 80 puede reducir la formación de agregados por SEC en el almacenamiento. En un aspecto, la proporción molar de tensioactivo:anticuerpo es de aproximadamente 0,7:1 a aproximadamente 2,0:1. En otro aspecto, la proporción molar de tensioactivo:anticuerpo es de 1,5:1.

Una realización de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ contiene una alta concentración de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Por ejemplo, en una realización, las formulaciones líquidas pueden comprender al menos aproximadamente 60 mg/ml, al menos aproximadamente 70 mg/ml, al menos aproximadamente 80 mg/ml, al menos aproximadamente 90 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, al menos aproximadamente 110 mg/ml, al menos aproximadamente 120 mg/ml, al menos aproximadamente 130 mg/ml, al menos aproximadamente 140 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 170 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, al menos aproximadamente 200 mg/ml, al menos aproximadamente 250 mg/ml, al menos aproximadamente 300 mg/ml, de aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, de aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 160 mg/ml o aproximadamente 165 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Como alternativa, en otro aspecto, las formulaciones líquidas pueden comprender al menos aproximadamente 154 mg/ml, al menos aproximadamente 176 mg/ml.

La formulación puede ser un líquido o un sólido. Las formulaciones líquidas son 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 tienen un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,5, de entre aproximadamente 6,0 y 7,3, de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, de entre aproximadamente 6,0 y 6,5, de entre aproximadamente 6,0 y 6,3, de entre aproximadamente 6,3 y 7,1, o de entre aproximadamente 6,4 y 7,0, o de entre 6,3 y 6,8, tal como de aproximadamente 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9. Las formulaciones líquidas pueden mantenerse a temperatura ambiente, refrigerarse (por ejemplo, 2-8°C) o congelarse (por ejemplo, -20°C o -70°C) para su almacenamiento.

Una formulación sólida puede prepararse de cualquier forma adecuada y puede estar en forma de una torta o polvo, por ejemplo, con la adición de un lioprotector. En un aspecto, la formulación sólida se prepara por secado de una formulación líquida como se describe en la presente memoria, por ejemplo, por liofilización o secado por pulverización. 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. Una formulación sólida puede 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 otro aspecto, la concentración de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ reconstituido es la misma concentración que en la formulación líquida previa al secado.

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- $\alpha 4\beta 7$ se esteriliza por filtración antes del secado.

En un aspecto, la formulación es estable en el almacenamiento. Están disponibles para el experto en la materia diversos ensayos de estabilidad para confirmar la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, el anticuerpo en la formulación líquida puede ser estable en el almacenamiento a aproximadamente 25°C durante al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, o al menos aproximadamente 6 meses, o al menos aproximadamente 9 meses, o al menos aproximadamente 12 meses; a aproximadamente 2-8°C al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años, al menos aproximadamente 3 años o más tiempo. Como alternativa, o además, el anticuerpo en la formulación puede ser estable en el almacenamiento a aproximadamente 15°C durante al menos aproximadamente 4 semanas, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, o más tiempo. Como alternativa, o además, el anticuerpo en la formulación puede ser estable en el almacenamiento a aproximadamente -20°C o -70°C durante al menos aproximadamente 4 semanas; al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 2 años, al menos aproximadamente 3 años, al menos aproximadamente 4 años o más tiempo.

La estabilidad puede ensayarse para evaluar 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 solubles e insolubles (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación analítica, MALDI-TOF MS, dispersión de luz (dinámica (DLS) o MALLS), formación de imágenes microscópicas basada en flujo 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 o electroforesis zonal capilar; análisis de secuencia amino-terminal o carboxi-terminal; análisis espectrométrico de masas; análisis de SDS-PAGE para comparar el anticuerpo fragmentado, intacto y multimérico (es decir, dimérico, trimérico, etc.); mapa peptídico (por ejemplo, tríptico o LYS y similares). La inestabilidad puede dar como resultado la agregación, la 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, cisteína o cisteínas desapareadas, extensión N-terminal, procesamiento C-terminal, diferencias de glicosilación, etc. La actividad biológica o la función de unión al antígeno, por ejemplo, la unión del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ a MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1) o la inhibición de la unión de una célula que expresa la integrina $\alpha 4\beta 7$ 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 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.

Una formulación estable puede contribuir a una baja inmunogenicidad de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ inmunogénico puede conducir a una respuesta de anticuerpo humano anti-humano (HAHA) en sujetos o pacientes humanos. Los pacientes que desarrollan una respuesta de HAHA contra un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ pueden tener eventos adversos (por ejemplo, reacción de sitio de infusión) tras el tratamiento o pueden eliminar el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ rápidamente, dando como resultado una menor dosis que 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. En algunas realizaciones, la formulación puede aumentar la proporción de pacientes negativos para HAHA 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 HAHA de una formulación menos estable.

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 determina por cIEF.

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.

El contenido monomérico y/o contenido de agregados (por ejemplo, como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, oligómeros y agregados de orden superior), es decir, en la formulación líquida o en la formulación reconstituida puede medirse por SEC, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz (DLS o MALLS), MALDI-TOF MS 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.

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, la 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.

Los tamaños de partícula superiores a de 1 a 2 micrómetros, por ejemplo, de agregados o excipiente no disuelto, es decir, en la formulación líquida o 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 microfluídica (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, una cantidad de partículas en una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de < 6.000 partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro y/o < 600 partículas de $\geq 25 \mu\text{m}$ 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, una cantidad de partículas en una dosis de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 1.000 partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ y de aproximadamente 0-100 partículas de $\geq 25 \mu\text{m}$ (método de MFI). 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- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000 de partículas de 2-10 μm por ml, de aproximadamente 50 a aproximadamente 350 de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ por ml y de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 de partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ por ml. En otro aspecto más, una cantidad de partículas en una dosis de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 500 a aproximadamente 100.000, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 o de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 3.000 de partículas de 2-10 μm por ml.

La viscosidad de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede controlarse para administración subcutánea o intramuscular. La viscosidad puede verse afectada por la concentración de proteína y el pH. Por ejemplo, a medida que aumenta la concentración de proteína, la viscosidad puede aumentar. Un aumento en el pH puede disminuir la viscosidad de la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En algunas formulaciones de proteína, se añade cloruro sódico para reducir la viscosidad de la formulación. Son componentes adicionales que pueden afectar a la viscosidad de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ aminoácidos tales como histidina y arginina.

Una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede ser isotónica (por ejemplo, 250-350 mOsm) o hipertónica (por ejemplo, superior a 350 mOsm, superior a 450 mOsm, superior a 550 mOsm o superior a 650 mOsm), por ejemplo, para administración subcutánea o intramuscular. En un aspecto, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ no es hipotónica, por ejemplo, inferior a 250 mOsm. En otro aspecto, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mOsm, de aproximadamente 400 a aproximadamente 450 mOsm o de aproximadamente 350 a aproximadamente 450 mOsm.

La inestabilidad que conduce a la desnaturalización puede evaluarse por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los anticuerpos tienen dos temperaturas de fusión (T_m) en DSC, por ejemplo, T_{m1} y T_{m2} . Ciertos excipientes pueden afectar a la estabilidad del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ nativo. Un descubrimiento de una temperatura de fusión superior al comparar formulaciones por DSC puede indicar una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ más estable con la T_m superior. Por ejemplo, a pH 5,7, la T_m de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es inferior y, por lo tanto, menos estable que a pH 6,5. En un aspecto, la T_{m1} de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es $> 60^\circ\text{C}$. En otro aspecto, la T_{m1} de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 65°C a aproximadamente 70°C o de aproximadamente 69°C . En un aspecto, la T_{m2} de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es $> 80^\circ\text{C}$. En otro aspecto, la T_{m2} de una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es de aproximadamente 82°C a aproximadamente 88°C o de aproximadamente 86°C .

En una realización, una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ tiene una afinidad de unión o valor de CE_{50} 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), por ejemplo, una quimera de MAdCAM-Ig (véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20070122404, también para ejemplos de patrón de referencia).

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.

En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una formulación líquida que comprende al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante (por ejemplo, histidina) y al menos aproximadamente 5 mM de citrato. En otras realizaciones, la formulación es una formulación líquida que comprende de al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante (por ejemplo, citrato), aminoácido (por ejemplo, arginina) y tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80).

En otra realización, la formulación comprende de al menos aproximadamente 140 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 160 mg/ml de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante (por ejemplo, histidina), al menos aproximadamente 5 mM de citrato y un aminoácido libre (por ejemplo, arginina).

En otra realización más, la formulación comprende al menos aproximadamente 160 mg/ml de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un agente tamponante (por ejemplo, histidina), al menos aproximadamente 5 mM de citrato, el 0,2% de polisorbato 80 y un aminoácido libre (por ejemplo, arginina). En una realización, la concentración de tampón en la formulación es de aproximadamente 15 a aproximadamente 75 mM, de aproximadamente 25 a aproximadamente 65 mM, o de aproximadamente 50 mM. La concentración de aminoácido libre en la formulación es de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 75 a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 mM o de aproximadamente 125 mM; la concentración de polisorbato 80 en la formulación es de aproximadamente el 0,05% al 0,4%, de aproximadamente el 0,1% al 0,4%, de aproximadamente el 0,1% al 0,3%, de aproximadamente el 0,1% al 0,25%, de aproximadamente el 0,1% al 0,2%, o de aproximadamente el 0,2%.

En algunas realizaciones, la formulación es una formulación sólida (por ejemplo, una formulación liofilizada), que comprende una mezcla de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, histidina, arginina, polisorbato 80 y un lioprotector o un sacárido, tal como un azúcar no reductor. El sacárido puede incluirse en la formulación líquida hasta alcanzar concentraciones del 0% al 20%, o de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 10%.

En una realización, la formulación se liofiliza y almacena como una sola dosis en un recipiente, por ejemplo, vial, jeringa, cartucho y/o autoinyector. El recipiente puede almacenarse a aproximadamente 2-8°C o 25°C hasta que se administra a un sujeto que lo necesite. El vial puede ser, por ejemplo, un vial de 5, 10 o 20 cc (por ejemplo, para una dosis de 160 mg/ml). El vial puede contener al menos aproximadamente 20 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 70 mg, al menos aproximadamente 80 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 120 mg, al menos aproximadamente 155 mg, al menos aproximadamente 180 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 240 mg, al menos aproximadamente 300 mg, al menos aproximadamente 360 mg, al menos aproximadamente 400 mg, al menos aproximadamente 540 mg o al menos aproximadamente 900 mg de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En un aspecto, el recipiente contiene aproximadamente 165 mg de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

En otra realización, la formulación es líquida y está almacenada como una sola dosis en uno o dos viales, cartuchos, jeringas o autoinyectores. El vial, cartucho, jeringa o autoinyector puede almacenarse a aproximadamente 2-8 °C hasta que su contenido, por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, se administre a un sujeto que lo necesite. El vial puede ser, por ejemplo, un vial de 5, 10 o 20 cc (por ejemplo, para una dosis de 160 mg/ml). El vial puede contener al menos aproximadamente 20 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 70 mg, al menos aproximadamente 80 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 120 mg, al menos aproximadamente 155 mg, al menos aproximadamente 180 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 240 mg, al menos aproximadamente 300 mg, al menos aproximadamente 360 mg, al menos aproximadamente 400 mg, al menos aproximadamente 540 mg, o al menos aproximadamente 900 mg de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En un aspecto, el vial contiene aproximadamente 165 mg de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. La jeringa o cartucho puede ser un recipiente de 1 mL o 2 mL (por ejemplo, para una dosis de 160 mg/mL) o más de 2 ml, por ejemplo, para una dosis superior (de al menos 320 mg o 400 mg o superior). La jeringa o cartucho puede contener al menos aproximadamente 20 mg, al menos aproximadamente 50 mg, al menos aproximadamente 70 mg, al menos aproximadamente 80 mg, al menos aproximadamente 100 mg, al menos aproximadamente 120 mg, al menos aproximadamente 155 mg, al menos aproximadamente 180 mg, al menos aproximadamente 200 mg, al menos aproximadamente 240 mg, al menos aproximadamente 300 mg, al menos aproximadamente 360 mg, al menos aproximadamente 400 mg, o al menos aproximadamente 500 mg de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

Uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables distintos tales como los descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª 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 tamponantes adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo citrato y cisteína; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; conservantes; lubricantes de la pared del recipiente, por ejemplo, silicona, aceite mineral, glicerina o derivado de perfluoropolíéter TRIBOGLIDE® (Tribolam Research, Inc.) para facilidad de inyección y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

anticuerpos $\alpha 4\beta 7$

Los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ adecuados para su uso en las formulaciones 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.

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 N° 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 epitópico que sea inaccesible a la unión de anticuerpo en ausencia del compañero de integrina apropiado o en ausencia de la activación de integrina. 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 $\alpha_E\beta 7$, 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.

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 adhesina de la mucosa, por ejemplo, MAdCAM (por ejemplo, MAdCAM-1), fibronectina y/o adhesina vascular (VCAM)). Se describen MAdCAM de primate (por ejemplo, MAdCAM-1) 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.

En un aspecto, los anticuerpos anti- $\alpha 4\beta 7$ para su uso en las formulaciones 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, incorporándose el contenido completo de cada una de ellas en la presente memoria mediante esta referencia.

En otro aspecto, los anticuerpos humanizados anti- $\alpha 4\beta 7$ para su uso en la formulación 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.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados anti- $\alpha 4\beta 7$ para su uso en la formulación 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 $\alpha 7$ en las formulaciones y regímenes de dosificación descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos de $\alpha 437$ descritos en el documento US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), incorporados por referencia en la presente memoria en su totalidad, son adecuados para su uso en las formulaciones y métodos de tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino en un individuo.

El anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ 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., Bio/Technology 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 posterior a la traducción 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- $\alpha\beta 7$ 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).

Formulaciones Sólidas

Las formulaciones sólidas de la invención se preparan generalmente por secado de una formulación líquida. Puede usarse cualquier método de secado adecuado, tal como liofilización o secado por pulverización. En un aspecto, se

añade un lioprotector a la formulación antes de la liofilización. 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, jeringa (por ejemplo, una jeringa de una sola cámara o de doble cámara) o cartucho (por ejemplo, un cartucho de una sola cámara o de doble cámara) (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, tomografía de coherencia óptica. La etapa de secado 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 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 165 mg, el tamaño de vial de la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede ser de 3 ml, 5 ml o 10 ml. En un aspecto, el tamaño de vial es de 5 ml para una solución de 160 mg/ml.

Los principios para escoger un tamaño de cartucho o jeringa para la liofilización son similares a los del vial. La profundidad de la altura de torta también aumentará el tiempo de secado a medida que aumenta la altura. El diámetro y el tamaño de la jeringa o cartucho deben estar compensados con el volumen de formulación final. Los diámetros de mayor tamaño pueden aumentar la velocidad de captación de humedad en la torta liofilizada, aumentando de este modo los efectos degradantes de la humedad durante el almacenamiento. Para una dosis de 165 mg, el volumen de la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede ser de 1 ml o 2 ml. En un aspecto, el tamaño de jeringa o cartucho es superior a 1 ml para una solución de 160 mg/ml.

Después de la liofilización, el vial, jeringa o cartucho puede cerrarse herméticamente, por ejemplo, taponarse, al vacío. Como alternativa, puede introducirse un gas, por ejemplo, aire seco o nitrógeno, en el recipiente 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 los gases son gases no oxigenados, por ejemplo, nitrógeno o un gas inerte, por ejemplo, helio, neón, argón, kriptón o xenón. En otro aspecto, el gas es nitrógeno o argón.

Tratamiento con la formulación de anticuerpo

En un aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto que 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.

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.

En otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ que (1) pueden unirse a la integrina $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*; y (2) pueden 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- $\alpha 4\beta 7$ de la presente invención 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- $\alpha 4\beta 7$ de la presente invención (es decir, una o más) se administra 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.

En una realización, las enfermedades que pueden tratarse incluyen por consiguiente la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, ileitis, 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. En algunas realizaciones, 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 (por ejemplo, MAdCAM-1) se inducía según se dice en el endotelio en islotes inflamados del páncreas de los ratones NOD, y el MAdCAM (por ejemplo, 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 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.

La invención también se refiere a un método de inhibir la infiltración con leucocitos del tejido mucoso. La invención también se refiere a 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 cantidad eficaz de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ puede conducir a cicatrización de la mucosa en colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. 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. La dosis total puede ser de aproximadamente 22 mg, de aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 72 mg, de aproximadamente 125 mg, de aproximadamente 165 mg o de aproximadamente 432 mg. La dosis total puede ser de al menos 77 mg, de al menos 125 mg o de al menos 356 mg. En una realización, la dosis total es de 165 mg. En otra realización, la dosis total es de 108 mg. En otra realización, la dosis total es de 216 mg.

La modelación y las simulaciones (software BERKELEY MADONNA™, Universidad de California) usando datos farmacocinéticos (PK) de estudios de disponibilidad de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ con el tiempo después de la administración pueden evaluar regímenes de dosificación potenciales para la administración subcutánea o intramuscular. Los datos PK pueden evaluarse para regímenes de inducción y de mantenimiento. Otra estrategia de modelado es el análisis farmacocinético/farmacodinámico de poblaciones (herramienta de modelado de efectos mixtos no lineales NONMEM® ICON plc, Dublín, Irlanda). Pueden analizarse tanto los niveles de exposición como los niveles valle.

Típicamente, después de alcanzarse la saturación de la diana, por ejemplo, integrina $\alpha 4\beta 7$, la concentración de anticuerpo en la sangre tiene una relación lineal con la dosis administrada. Un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ administrado a través de la vía subcutánea o intramuscular tiene aproximadamente el 60% a aproximadamente el 90% de la biodisponibilidad de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ administrado a través de una vía intravenosa. En un ejemplo de esta relación, si se supone que una dosis IV tiene una biodisponibilidad del 100% y se encuentra que una dosis subcutánea tiene una biodisponibilidad del 69,5%, entonces una dosis intravenosa de 300 mg puede hacerse corresponder con una dosis de 432 mg por administración subcutánea. Por consiguiente, una dosis intravenosa de 150 mg puede hacerse corresponder con una dosis subcutánea de 216 mg a una biodisponibilidad relativa del 69,5%. De forma similar, si se encuentra que una dosis subcutánea tiene una disponibilidad del 75% y se encuentra que una dosis intramuscular tiene una biodisponibilidad del 80%, entonces para corresponderse con una dosis intravenosa de 300 mg, la dosis subcutánea puede ser de 400 mg y la dosis intramuscular puede ser de 375 mg. Las Tablas 40-43 en los ejemplos ilustran estas relaciones y proporcionan dosis y regímenes de dosificación útiles de un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

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-TNF α), 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- $\alpha 4\beta 7$. En otra realización, el régimen de dosificación, por ejemplo, durante una fase de mantenimiento de la terapia, mantiene una concentración en suero media a largo plazo, por ejemplo, exposición (por ejemplo, área bajo la curva de concentración-tiempo) de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 18 a aproximadamente 26 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 22 a aproximadamente 33 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. En otra realización más, el régimen de dosificación, por ejemplo, durante una terapia de mantenimiento, mantiene una concentración en suero media a largo plazo, por ejemplo, exposición (por ejemplo, área bajo la curva de concentración-tiempo) de aproximadamente 35 a aproximadamente 90 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 45 a aproximadamente 75 $\mu\text{g/ml}$, de aproximadamente 52 a aproximadamente 60 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 50 a aproximadamente 65 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

La forma de dosificación final puede comprender la dosis completa en aproximadamente 0,5 ml, en aproximadamente 1 ml, en aproximadamente 1,5 ml, en aproximadamente 2 ml, en aproximadamente 2,5 ml, en aproximadamente 3 ml de la formulación de anticuerpo.

La forma de dosificación final para administración intravenosa puede estar a una concentración de entre aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 1,4 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 1,3 mg/ml, de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 1,2 mg/ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,1 mg/ml, de aproximadamente 1,1 mg/ml a aproximadamente 1,4 mg/ml, de aproximadamente 1,1 mg/ml a aproximadamente 1,3 mg/ml, de aproximadamente 1,1 mg/ml a aproximadamente 1,2 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 1,4 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 1,3 mg/ml, o de aproximadamente 1,3 mg/ml a aproximadamente 1,4 mg/ml. La forma de dosificación final puede estar a una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, de aproximadamente 1,2 mg/ml, de aproximadamente 1,3 mg/ml, de aproximadamente 1,4 mg/ml, de aproximadamente 1,5 mg/ml, de aproximadamente 1,6 mg/ml, de aproximadamente 1,8 mg/ml o de aproximadamente 2,0 mg/ml.

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, día sí día no, 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 una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, 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 1 o 2 semanas después de eso. En otro aspecto, el régimen de tratamiento de inducción es el tratamiento día sí día no durante un total de 6 tratamientos.

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.

La formulación puede administrarse por vía subcutánea en una sola inyección o en múltiples inyecciones. Por ejemplo, el volumen de una sola inyección puede variar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 3 ml. En una realización, el volumen de una sola inyección puede ser de aproximadamente 0,6 ml a aproximadamente 1,1 ml o de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 3 ml. En un aspecto, el volumen de una sola inyección es de aproximadamente 1 ml. El calibre de la aguja usada para administrar la formulación por vía subcutánea puede ser de aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30G.

La formulación puede administrarse por vía intramuscular en una sola inyección o en múltiples inyecciones. Por ejemplo, el volumen de una sola inyección puede variar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 5 ml. En una realización, el volumen de una sola inyección puede ser de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 0,6 ml a aproximadamente 1,1 ml o de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 3 ml. En un aspecto, el volumen de una sola inyección es de aproximadamente 1 ml, de aproximadamente 2 ml, de aproximadamente 3 ml, de aproximadamente 4 ml o de aproximadamente 5 ml. La aguja usada para administrar la formulación por vía intramuscular puede ser de aproximadamente 1,59 cm (5/8"), aproximadamente 2,22 cm (7/8"), aproximadamente 2,54 cm (1"), aproximadamente 3,18 cm (1,25"), aproximadamente 3,81 cm (1,5"), aproximadamente 5,08 cm (2") o aproximadamente 7,62 cm (3"). El calibre de la aguja puede estar entre 20-22G para la administración intramuscular.

En un aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente: (a) dosis iniciales de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una inyección subcutánea día sí día no durante seis dosis; (b) seguidas de una séptima dosis y dosis posteriores de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una

inyección subcutánea cada dos semanas o cada cuatro semanas según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y la remisión clínica en la enfermedad inflamatoria del intestino del paciente; y en el que además la inmunoglobulina humanizada o el fragmento de unión al antígeno tiene especificidad de unión por el complejo $\alpha 4\beta 7$, en el que la región de unión al 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.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar a un paciente humano que padece una enfermedad inflamatoria del intestino, en el que método comprende la etapa de administrar a un paciente que padece una enfermedad inflamatoria del intestino una inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con el régimen de dosificación siguiente: (a) una dosis intravenosa inicial de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una infusión intravenosa; (b) seguida de una segunda dosis intravenosa posterior de 300 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una infusión intravenosa a aproximadamente dos semanas después de la dosis inicial; (c) seguida de, comenzando en la semana seis, una tercera dosis y dosis posteriores de 165 mg de la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma como una inyección subcutánea cada semana, cada dos semanas o cada tres semanas según sea necesario; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En otro aspecto, la invención se refiere a un régimen de dosificación para el tratamiento terapéutico de una 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con un régimen de dosificación subcutáneo o intramuscular que mantiene una concentración en suero valle en estado estacionario media de aproximadamente 9 a aproximadamente 13 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

En otro aspecto, la invención se refiere a 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 al antígeno de la misma que tiene especificidad de unión por la integrina $\alpha 4\beta 7$ humana, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno comprende una región de unión al antígeno de origen no humano y al menos una porción de un anticuerpo de origen humano, en el que la inmunoglobulina humanizada o fragmento de unión al antígeno de la misma se administra al paciente de acuerdo con un régimen de dosificación subcutáneo o intramuscular que mantiene concentraciones valle en suero en estado estacionario de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo; en el que el régimen de dosificación induce una respuesta clínica y 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 al 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.

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 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) y otro agente biológico (por ejemplo, antagonistas de TNF alfa) junto con una formulación de la presente invención.

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 esté 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 esté 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.

En una realización, el método comprende administrar por vía subcutánea o administrar por vía intramuscular una cantidad eficaz de una formulación de la invención a un paciente. En otra realización, la formulación puede prepararse para la autoadministración.

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.

La invención también se refiere a un método para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino en un paciente. En una realización, el método comprende administrar por vía subcutánea 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.

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.

Artículos de fabricación

En otro aspecto, la invención es 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, un autoinyector), cartuchos 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.

En una realización, el artículo de fabricación es una jeringa con una aguja. El calibre de la aguja puede ser de 25 G, 26 G, 27 G, 29 G, 30 G. Una aguja de pared fina, por ejemplo, 19 G o 23 G o superior, puede facilitar la inyección de una formulación de alta viscosidad. En un aspecto, el calibre de la aguja es de 27 G o superior. La longitud de la aguja puede ser adecuada para la administración subcutánea, y puede ser de aproximadamente 1,27 cm (1/2 pulgada), de aproximadamente 1,59 cm (5/8 pulgadas) o de 2,54 cm (1 pulgada) de longitud. En algunas realizaciones, la jeringa es una jeringa precargada.

Desarrollo de producto de jeringa precargada

En algunos aspectos, se desean varios atributos de producto para un producto proteico (por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$) en una jeringa precargada (PFS) (por ejemplo, para su uso en la administración de una formulación para administración subcutánea o intramuscular). Es útil equilibrar algunos de los atributos para mitigar efectos de competición. Por ejemplo, cuando se desea un bajo volumen de inyección, puede preferirse una alta concentración de proteína para la formulación. Sin embargo, en el caso de una alta concentración de proteína, puede haber mayores índices de formación de impurezas (por ejemplo, impurezas agregadas que se lixivian hacia la formulación desde la jeringa) y pueden ser necesarias fuerzas manuales superiores para hacer funcionar la jeringa. Un pequeño tamaño de aguja usado por comodidad del paciente en el sitio de inyección puede requerir altas fuerzas para hacer funcionar la jeringa. La comprensión de cómo la estabilidad y el rendimiento del producto se ven afectados por los parámetros tanto de la formulación como de la jeringa, tales como la concentración de proteína, el pH, el diámetro interno de la aguja, contribuye al desarrollo de un producto proteico (por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en una jeringa precargada).

En un aspecto, un método de desarrollo de un producto proteico (por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$) para su uso en una jeringa precargada comprende variar conjuntamente los parámetros de la jeringa y los parámetros de la formulación, por ejemplo, de una forma coordinada o simultánea. Esto puede conducir a una mejor comprensión del intervalo de estabilidad de la proteína y del rendimiento del producto que puede esperarse de un producto proteico

en una jeringa precargada que si cada aspecto se varía por separado o en serie.

El desarrollo de un producto de jeringa precargada (por ejemplo, un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$) se refiere a la comprensión de que en algún punto, existe una formulación líquida en contacto con varios componentes de la jeringa precargada (Figura 15). Por ejemplo, la formulación puede estar en contacto con un cilindro de jeringa, que puede estar hecho de vidrio (por ejemplo, vidrio de borosilicato de tipo I) o plástico (por ejemplo, polímero de olefina cíclica (COP), copolímero de olefina cíclica (COC), polipropileno o politetrafluoroetileno). La formulación puede estar en contacto con la jeringa, el émbolo y/o la tapa del cono, que pueden ser elastoméricos (por ejemplo, del mismo material o de materiales diferentes (por ejemplo, plástico, tal como polietileno, poliestireno o polipropileno, o elásticos tal como goma (natural, sintética, butilo) o silicona)). La formulación puede estar en contacto con un lubricante que se añade a una superficie interna del cilindro para facilitar el movimiento del émbolo. El lubricante puede ser, por ejemplo, aceite de silicona, aceite mineral o glicerina. En la realización de una jeringa con aguja superpuesta, puede haber una aguja de aleación de metal (por ejemplo, aguja de acero inoxidable y adhesivo usado para pegar la aguja en su lugar). Una consideración para un producto proteico en una jeringa precargada es que la solución de proteína líquida está en contacto directo con uno o más de estos componentes de la jeringa durante toda la vida útil del producto. Tanto los componentes de la formulación como de la jeringa pueden tener un impacto sobre la estabilidad del producto.

Los parámetros de la formulación que pueden afectar a la estabilidad del producto de jeringa precargada incluyen la concentración de proteína, el pH, el tipo de tampón, la concentración de tampón, la fuerza iónica, el tipo de estabilizante y la concentración de estabilizante. Los ejemplos de estabilizantes para formulaciones de proteína incluyen, por ejemplo, sales iónicas, polisacáridos, aminoácidos, antioxidantes, quelantes y tensioactivos, como se han descrito en las secciones anteriores.

Los componentes de la jeringa que pueden afectar la estabilidad del producto en jeringa precargada incluyen, por ejemplo, el lubricante, la composición del émbolo y de la tapa del cono y las impurezas. La cantidad de lubricante (por ejemplo, aceite de silicona en el cilindro de la jeringa) puede afectar la estabilidad del producto. La composición del émbolo y de la tapa del cono, que puede afectar la permeabilidad de oxígeno de estos componentes e introducir productos de lixiviación de estos componentes en el producto proteico (por ejemplo, la formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$), también puede afectar la estabilidad del producto. Otro parámetro de la jeringa que puede afectar la estabilidad del producto incluye el tipo y/o la cantidad de impurezas (por ejemplo, metal pesado (por ejemplo, tungsteno)) que puede lixiviar hacia la formulación de producto (por ejemplo, desde el cilindro (por ejemplo, cilindro de vidrio) y/o la aguja (por ejemplo, aguja de acero inoxidable)). (Véase también Ludwig et al. J. Pharm. Sci. 99: 1721-1733 (2010); Nashed-Samuel et al., American Pharmaceutical Review En/Feb: 74-80 (2011); Badkar et al. AAPS PharmSciTech 12: 564-572).

Una jeringa precargada puede inyectarse manualmente o usarse con un dispositivo autoinyector. El ensayo funcional de la jeringa precargada incluye medir la fuerza de desbloqueo, la fuerza necesaria para comenzar el movimiento del émbolo, y la fuerza de deslizamiento, la fuerza necesaria para inyectar el contenido de la jeringa a una velocidad constante. El comportamiento mecánico de la jeringa precargada puede depender de varios parámetros de la formulación y de la jeringa, tales como la viscosidad de la formulación y la cantidad de lubricante (por ejemplo, aceite de silicona) en la jeringa.

Se muestran varios atributos de productos proteicos en jeringas precargadas y factores de la formulación o de la jeringa que pueden afectar a esos atributos de producto en la Tabla 1. Muchos atributos de producto pueden ser una función compleja de varios parámetros de la formulación y de la jeringa. Por ejemplo, la fuerza de deslizamiento de la jeringa es una función de la viscosidad de la formulación, aunque la viscosidad puede depender de varios factores de la formulación, tales como la concentración de proteína, las concentraciones de estabilizante y el pH.

Tabla 1: Atributos de producto para productos proteicos en jeringas precargadas y los parámetros de la formulación y de la jeringa potenciales que pueden afectar a estos atributos

Atributo de producto	Parámetros de la formulación de proteína que pueden afectar al atributo de producto	Parámetros de la jeringa que pueden afectar al atributo de producto
Osmolalidad	Concentraciones de estabilizante, pH, concentración de proteína	Ninguno
Viscosidad	Concentraciones de estabilizante, pH, concentración de proteína	Ninguno
Fuerza de desbloqueo y deslizamiento de la jeringa	Viscosidad, concentración de proteína, concentración de tensioactivo	Velocidad de inyección, longitud de la aguja, DI de la aguja, DI del cilindro de jeringa, cantidad de aceite de silicona, formulación y forma del émbolo
Velocidad de desamidación de la proteína	Concentraciones de estabilizante, pH, concentración de proteína	Ninguno
Velocidad de oxidación de la proteína	Concentraciones de estabilizante/antioxidante, pH, concentración de proteína, concentración de tensioactivo, oxígeno disuelto	Formulación del émbolo y de la tapa del cono (permeabilidad de oxígeno), niveles de impurezas de metales pesados, tamaño de burbuja de aire
Velocidad de formación de agregados solubles	Concentraciones de estabilizante, pH, concentración de proteína, concentración de tensioactivo, oxígeno disuelto en solución	Cantidad de aceite de silicona, niveles de impurezas de metales pesados, tamaño de burbuja de aire
Velocidad de formación de particulado proteico visible y subvisible	Concentraciones de estabilizante, pH, concentración de proteína, concentración de tensioactivo	Cantidad de aceite de silicona, niveles de impurezas de metales pesados, tamaño de burbuja de aire, área superficial interna de la jeringa

En un aspecto, puede añadirse un tensioactivo tal como polisorbato 20 o polisorbato 80 a formulaciones de proteína en jeringas precargadas (por ejemplo, para prevenir que moléculas de proteína se adsorban y desnaturalicen en las superficies de contacto líquido/aire y/o líquido/lubricante (por ejemplo, aceite de silicona). La adsorción superficial y la desnaturalización de moléculas de proteína puede ser un mecanismo para la nucleación de partículas proteicas visibles y subvisibles. La adición de un tensioactivo a una jeringa precargada, por lo tanto, puede reducir la formación de partículas visibles y subvisibles en productos de jeringa precargada. En una realización, una pequeña cantidad de tensioactivo puede emulsionar el lubricante (por ejemplo, gotitas de aceite de silicona en la solución, y de este modo reducir la formación de lubricante visible y subvisible (por ejemplo, gotitas de aceite de silicona) (Ludwig et al., anteriormente). En otra realización, la cantidad de tensioactivo en una formulación se minimiza, debido a los efectos perjudiciales potenciales de altas cantidades de tensioactivos en formulaciones de proteína. Las impurezas de peróxido presentes en polisorbatos pueden conducir a una oxidación de proteínas aumentada (Wang y Wang J. Pharm. Sci. 91: 2252-2264 (2002)). Altas cantidades de tensioactivo pueden emulsionar una cantidad significativa de aceite de silicona de las paredes de la jeringa y conducir a un aumento en la fuerza de deslizamiento funcional a lo largo de la vida útil. Deberían diseñarse estudios de desarrollo de producto para examinar el efecto de variar los niveles de tensioactivo tanto sobre la estabilidad del producto como el rendimiento de la jeringa.

Las interacciones complejas entre los parámetros de la formulación y de la jeringa en los sistemas de proteína/PFS son susceptibles de someterse al examen de estos sistemas usando una estrategia de Calidad por Diseño (QbD) o Diseño de Experimentos (DOE). Pueden diseñarse estudios que varíen simultáneamente los parámetros de la formulación y de la jeringa para obtener una mejor comprensión de estos sistemas complejos. Esto da como resultado una estrategia completa para el desarrollo de productos de jeringa precargada. La Tabla 2 muestra un ejemplo de los parámetros y niveles de entrada que pueden introducirse en un diseño de experimento para un producto de jeringa precargada y un ejemplo del ensayo analítico a emplear. Dependiendo del tipo de diseño experimental que se use para el estudio de QbD, el número de experimentos podría variar de 9 para un diseño de exploración a 81 para un diseño factorial completo (todas las combinaciones posibles). Cuanto mayor sea el número de experimentos, mayor será el número de interacciones entre los parámetros de producto que pueden resolverse. El software diseñado para este análisis, por ejemplo, software de descubrimiento estadístico JMP® (Cary, NC) puede ser útil para estudios de QbD. Este análisis da como resultado una comprensión cuantitativa de cómo interaccionan los parámetros de la formulación y de la jeringa para afectar a los atributos del producto.

Tabla 2: Ejemplo de un diseño experimental para un producto proteico líquido en una jeringa precargada

Parámetros de entrada de la formulación	Niveles	Ensayo analítico
Concentración de proteína	50, 100, 150 mg/ml	Estabilidad de proteína por cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico
pH	5,5, 6,5, 7,5	
Concentración de tensioactivo	0,01, 0,08, 0,15%	
Cantidad de aceite de silicona en la jeringa	0,2, 0,5, 0,8 mg/jeringa	- Fuerza de desbloqueo y de deslizamiento con el tiempo usando ensayo de fuerza - Formación de partículas proteicas subvisibles y gotitas de aceite de silicona con el tiempo usando formación de imagen microfluídica o contador coulter

Se proporciona a continuación un ejemplo de un modelo predictivo que puede obtenerse a partir del experimento de ejemplo mostrado en la Tabla 2, donde C_n son constantes numéricas.

Formación de agregados solubles con el tiempo = $C_0 + C_1$ [Concentración de proteína] + C_2 [Concentración de proteína]² + C_3 [pH] + C_4 [Concentración de tensioactivo] + C_5 [Cantidad de lubricante]

Numerosos parámetros de la jeringa pueden afectar a la estabilidad y al rendimiento del producto, por lo tanto, una realización incluye la caracterización de cómo las tolerancias admisibles en los parámetros de la jeringa afectan a la estabilidad y al rendimiento del producto. La cantidad de lubricante (por ejemplo, aceite de silicona) en el cilindro de la jeringa puede variar del 50-100% de una jeringa a otra. Esta variación en la cantidad puede afectar varias características del producto como se muestra en la Tabla 1. El diámetro interno del cilindro de la jeringa puede variar de una jeringa a otra, lo que afecta a las fuerzas de inyección. Para jeringas con aguja superpuesta, el diámetro interno de la aguja puede variar de un lote a otro o de un fabricante a otro, lo que afectará a las fuerzas de inyección. Usando una estrategia de QbD para examinar cómo afectan los parámetros de la jeringa al rendimiento, pueden obtenerse modelos predictivos que pueden usarse para estimar cómo las tolerancias admisibles en los parámetros de la jeringa pueden afectar al rendimiento del producto. Pueden usarse modelos predictivos que se obtienen usando una estrategia de QbD para seleccionar los parámetros de la formulación y de la jeringa que satisfagan los atributos de producto deseados, y para predecir la estabilidad y el rendimiento del producto.

La jeringa precargada puede contener una adición de emulsión de silicona o tungsteno a la formulación de proteína. Las cantidades ejemplares de silicona que pueden estar presentes en la jeringa precargada varían de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 0,8 mg. En un aspecto, la cantidad de silicona que puede estar presente en la jeringa precargada es de aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg o aproximadamente 0,8 mg. En otro aspecto, la viscosidad de la formulación variará de 2 a 60 cP, dando como resultado fuerzas de inyección de 5 N a 80 N a una velocidad de 200 mm/min. En todavía otro aspecto más, la viscosidad de la formulación variará de 4 a 27 cP, dando como resultado fuerzas de inyección de 10 N a 40 N a una velocidad de 200 mm/min.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, no deberían interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Todas las citas de bibliografía y patentes se incorporan en la presente memoria por referencia.

PROTOCOLO PARA PREPARAR LA FORMULACIÓN

Una solución de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ se diafiltra en un sistema de filtración de flujo tangencial hasta alcanzar una concentración especificada en tampón citrato, histidina, arginina, después se combina y se mezcla con una solución de polisorbato 80 en tampón citrato, histidina, arginina. La solución se almacena a -70°C en frascos de 2 L o 5 L. La solución se descongela después y se filtra dos veces a través de un filtro de 0,2 μ m. Se carga aproximadamente 1,0 ml en una jeringa esterilizada y se cierra con un émbolo esterilizado (tapón). La formulación se almacena y el producto farmacológico final se envía en jeringas a 2-8°C.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

FABRICACIÓN DE LA FORMULACIÓN

Factores

Concentraciones de excipiente

Se ensayó la formación de agregados en la formulación de anticuerpo. Se desarrolló un modelo de agregados por SEC a partir de los datos experimentales que examinaban la concentración de proteína, el pH y la proporción molar de tensioactivo:proteína. A un intervalo de pH de 6,0 a 6,5, la formación de agregados era similar al intervalo de proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína de 0,7 a 1,5 (Fig. 6). Generalmente, a proporciones de PS80:Proteína superiores a 1,5, la velocidad de formación de agregados aumenta con un pH creciente. (Fig. 7)

Se realizó un experimento que examina la formación de agregados por SEC en presencia de aire. Se pusieron once formulaciones diferentes de composición variable en viales de borosilicato y se taparon con tapones elastoméricos con un espacio de cabeza de aire. Se creó un conjunto idéntico de formulaciones y el espacio de cabeza de aire se desplazó con argón. Estas muestras se pusieron en estabilidad a 40°C durante dos semanas. Todas las muestras con el espacio de cabeza de aire dieron como resultado grandes cantidades de agregados al final del experimento en comparación con la misma formulación con el espacio de cabeza de argón.

Tabla 3

Muestra	Conc. proteína (mg/ml)	Sacarosa (%)	Histidina (mM)	Arginina (mM)	PS 80 (%)	pH	Muestras agregados aire (%)	Muestras agregados argón (%)
1	60	2	25	75	0,05	6,2	0,64	0,48
2	60	4	25	75	0,05	7	0,62	0,42
3	160	4	50	75	0,14	6,2	0,92	0,73
4	160	2	50	75	0,14	7	1,16	0,74
5	60	2	50	125	0,05	7	1,28	0,33
6	60	4	50	125	0,05	6,6	0,48	0,36
7	160	4	25	125	0,14	7	1,04	0,70
8	160	2	25	125	0,14	6,2	1,06	0,75
9	160	3	25	75	0,14	6,6	1,09	0,78
10	110	3	50	125	0,10	6,2	0,65	0,47
11	110	2	25	75	0,10	6,6	0,90	0,62

Basándose en estos experimentos, se formuló la hipótesis de que los agregados por SEC se forman por oxidación o por formación de enlaces disulfuro. Se exploró la adición de antioxidantes y/o quelantes. Se preparó una formulación que contenía Histidina 40 mM, Arginina 90 mM y proteína 160 mg/ml con una proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína de 1,5 a pH 6,6. A la formulación se añadió citrato 25 mM, citrato 5 mM, EDTA 5 mM, cisteína 25 mM o cisteína 5 mM. Los 3 excipientes adicionales redujeron la formación de agregados (Fig 8). La adición de los antioxidantes y/o quelantes se clasificó en orden de rendimiento como citrato>EDTA>cisteína. El citrato 5 o 25 mM reducía la formación de agregados por SEC en comparación con la formulación de control.

Se realizó un experimento para determinar los efectos del pH, la concentración de proteína, la concentración de citrato, la concentración de histidina y la proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína. El pH se varió de 6,0 a 6,3, la concentración de proteína se varió de 60 a 160 mg/ml, la concentración de citrato se varió de 0 a 25 mM, la concentración de histidina se varió de 25 a 50 mM y la proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína se varió de 0,7 a 1,5. Las formulaciones se cargaron en jeringas de 27G1/2" de 1 ml de longitud (0,55 +/- 0,2 mg de silicona). Todas las formulaciones contenían arginina aproximadamente 125 mM.

La estabilidad se ensayó a 40°C durante dos semanas usando CEX y SEC. Los resultados (Fig. 9 y Tabla 4) muestran una reducción en la formación de agregados con la presencia de citrato 25 mM en la formulación, mientras que el aumento de la concentración de proteína aumentaba la velocidad de formación de agregados. La cantidad de monómero muestra tendencias opuestas a la formación de agregados a 25°C y 40°C, mientras que a 5°C la cantidad de monómero permanece esencialmente sin cambios durante hasta 24 meses (Tabla 5).

Otro conjunto de formulaciones exploró la velocidad de formación de agregados por SEC en presencia de citrato 40-63 mM pero sin histidina a 40°C, 25°C, 5°C. La velocidad de formación de agregados en estas formulaciones era ligeramente superior a las formulaciones con histidina a 40°C. Sin embargo, a 5°C, la velocidad de formación de agregados en las formulaciones con citrato y sin histidina era comparable a las formulaciones que contenían citrato e histidina (Tabla 6). Además, a 5°C, la cantidad de monómero permanece esencialmente sin cambios durante hasta 24 meses (Tabla 7).

Tabla 4

N° formulación	Conc. proteína (mg/ml)	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cantidad inicial de agregados (%)	Cambio en agregados después de 12 meses a 5°C	Cambio en agregados después de 24 meses a 5°C	Cambio en agregados después de 12 meses a 25°C	Cambio en agregados después de 1 mes a 40°C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	0,4	0,1	0,1	0,7	0,2
2	60	6,4	50	0	125	1,5	0,4	0,5	1,1	1,5	0,4
3	157	6,4	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,3	1,3	0,5
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,4	0,6	0,7	2,5	0,8
5	60	6,2	50	25	125	1,5	0,4	0,2	0,2	0,5	0,2
6	110	6,0	50	0	125	0,7	0,4	0,4	0,6	1,7	0,7
7	162	6,2	50	25	125	0,7	0,4	0,3	0,3	1,1	0,5
8	160	6,0	50	0	125	1,5	0,4	0,4	0,6	2,2	0,9
9	169	6,3	25	25	125	0,7	0,5	—	0,3	—	0,6
10	158	6,3	25	25	123	1,0	0,5	—	—	—	0,6

Tabla 5

Nº formulación	Conc. proteína (mg/ml)	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cantidad de monómeros (%)	Cambio en monómeros después de 12 meses a 5°C	Cambio en monómeros después de 24 meses a 5°C	Cambio en monómeros después de 12 meses a 25°C	Cambio en monómeros después de 1 mes a 40°C
1	62	6,4	50	25	125	0,7	98,3	0,4	0,1	-2,5	-1,3
2	60	6,4	50	0	125	1,5	98,3	-0,2	-1,0	-3,9	-2,0
3	157	6,4	50	25	125	1,5	98,2	0,2	0,0	-3,1	-1,6
4	161	6,3	50	0	125	0,7	98,2	0,0	-0,4	-4,5	-2,1
5	60	6,2	50	25	125	1,5	98,3	0,3	0,2	-2,2	-1,4
6	110	6,0	50	0	125	0,7	98,3	0,1	-0,3	-3,6	-2,1
7	162	6,2	50	25	125	0,7	98,3	0,2	-0,1	-2,8	-1,7
8	160	6,0	50	0	125	1,5	98,3	-0,1	-0,4	-4,2	-2,3
9	169	6,3	25	25	125	0,7	98,2	--	-0,1	--	-1,8
10	158	6,3	25	25	123	1,0	98,1	--	--	--	-1,7

Tabla 6

Nº formulación	Conc. proteína (mg/ml)	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cantidad inicial de agregados (%)	Cambio en agregados después de 12 meses a 5°C	Cambio en agregados después de 24 meses a 5°C	Cambio en agregados después de 12 meses a 25°C	Cambio en agregados después de 1 mes a 40°C
11	160	6,3	0	40	125	0,7	0,5	—	0,4	—	0,9
12	165	6,3	0	40	125	1,5	0,6	0,3	—	—	0,9
13	62	6,2	0	40	125	1,5	0,5	—	—	1,7	0,4
14	170	6,1	0	40	125	1,5	0,5	—	—	—	0,9
15	165	6,5	0	63	125	1,5	0,5	—	—	—	1,0
16	160	6,3	0	40	125	1,0	0,6	0,3	—	—	0,9

Tabla 7

N° formulación	Conc. proteína (mg/ml)	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cantidad inicial monómeros (%)	Cambio en monómeros después de 12 meses a 5°C	Cambio en monómeros después de 24 meses a 5°C	Cambio en monómeros después de 12 meses a 25°C	Cambio en monómeros después de 1 mes a 40°C
11	160	6,3 0	40	125	0,7	98,3	--	0,1	-0,3	--	-2,2
12	165	6,3 0	40	125	1,5	98,2	--	--	--	-3,4	-2,1
13	62	6,2 0	40	125	1,5	98,1	--	--	--	--	-1,4
14	170	6,1 0	40	125	1,5	98,1	--	--	--	--	-2,0
15	165	6,5 0	63	125	1,5	98,2	--	--	--	--	-2,3
16	160	6,3 0	40	125	1,0	98,2	0,1	--	--	--	-2,0

pH

Se realizaron varios experimentos de pH para determinar los efectos del pH sobre la degradación por CEX a 5°C. La formulación de anticuerpo de vedolizumab comprendía 160 mg/ml de anticuerpo anti- α 4 β 7, arginina 125 mM, histidina

50 mM y citrato 25 mM. Se ensayaron varios niveles de pH diferentes, 6,3, 6,5, 6,7 y 6,9, para determinar la estabilidad a 40°C, 25°C y 5°C.

Los modelos de CEX a 40°C muestran (FIG. 10) que el pH es lo que más influye sobre la degradación por CEX. El pH de formulaciones que contienen histidina disminuye con una temperatura creciente, sin embargo, se demostró que el pH de las formulaciones con citrato no se veía afectado por la temperatura (FIG. 11). Se determinó que la formulación con histidina/citrato tenía una buena estabilidad a un pH de 6,8 a 40°C después de 1 semana, de 6,3-6,5 a 25°C después de 6 meses y de 6,3-6,5 a 5°C después de 6 meses. Basándose en estudios adicionales, la estabilidad de las formulaciones era similar a 25°C y 5°C para el intervalo de pH de 6,2 a 6,9 (Tablas 8 y 9).

Tabla 8

Conc. proteína	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cantidad inicial de especies ácidas (%)	Cantidad inicial de especies básicas (%)	Cantidad inicial de isoforma principal (%)	Diferencia en % área relativa con el tiempo a 25°C					
									Cambio en ácidas por CEX después 6 meses	Cambio en ácidas por CEX después 12 meses	Cambio en básicas por CEX después 6 meses	Cambio en básicas por CEX después 12 meses	Cambio en principal por CEX después 6 meses	Cambio en principal por CEX después 12 meses
157	6,4	50	25	125	1,5	23,9	6,8	69,3	8,5	17,4	7,1	3,4	-15,6	-20,8
162	6,2	50	25	125	0,7	24,0	6,9	69,1	4,4	12,8	10,8	8,6	-15,2	-21,4
158	6,3	50	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	7,2	--	4,9	--	-14,4	--
160	6,4	42	25	125	1,5	24,9	5,5	69,7	9,5	--	1,0	--	-14,4	--
147	6,7	45	25	125	2,1	24,9	4,7	70,4	14,8	--	3,6	--	-16,5	--
147	6,9	45	25	125	2,2	25,0	4,9	70,1	14,5	--	3,2	--	-17,9	--
153	6,7	46	25	125	1,5	24,8	5,5	69,7	14,7	--	0,3	--	-17,3	--
154	6,9	46	25	125	1,5	24,9	5,3	69,8	19,7	--	0,5	--	-20,2	--
170	6,5	50	25	125	1,0	25,7	4,6	69,7	10,8	--	4,4	--	-15,2	--
170	6,5	50	25	125	1,5	25,7	4,6	69,7	11,1	--	5,2	--	-16,4	--
160	6,5	50	25	125	1,5	26,3	7,0	66,7	11,8	--	-2,6	--	-11,9	--

Tabla 9 |

Diferencia en % área relativa con el tiempo a 5°C											
Conc. proteína	pH	Conc. histidina (mM)	Conc. citrato (mM)	Conc. arginina (mM)	Proporción molar PS80:proteína	Cambio en ácidos por CEX después 6 meses	Cambio en ácidos por CEX después 24 meses	Cambio en básicas por CEX después 6 meses	Cambio en básicas por CEX después 24 meses	Cambio en principal por CEX después 6 meses	Cambio en principal por CEX después 24 meses
						0,2	0,6	2,3	-0,9	-2,5	0,3
157	6,4	50	25	125	1,5	0,2	0,6	2,3	-0,9	-2,5	0,3
162	6,2	50	25	125	0,7	-0,2	-0,7	4,3	2,2	-4,1	-1,5
158	6,3	50	25	125	1,5	0,0	--	1,9	--	-1,9	--
160	6,4	42	25	125	1,5	0,1	--	1,7	--	-1,8	--
147	6,7	45	25	125	2,1	1,7	--	1,7	--	-3,4	--
147	6,9	45	25	125	2,2	1,6	--	1,1	--	-2,7	--
153	6,7	46	25	125	1,5	1,7	--	0,4	--	-2,1	--
154	6,9	46	25	125	1,5	2,1	--	0,4	--	-2,4	--
170	6,5	50	25	125	1,0	0,9	--	1,6	--	-2,5	--
170	6,5	50	25	125	1,5	0,8	--	1,6	--	-2,5	--
160	6,5	50	25	125	1,5	11,8	--	-2,6	--	-11,9	--

EJEMPLO 2

ESTABILIDAD

- 5 Se ensayaron cuatro formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ diferentes para determinar su estabilidad con el transcurso de doce meses. Las formulaciones que tenían un pH de 6,0-6,2 mostraban aproximadamente el 1-2% menos de especies principales que las formulaciones que tenían un pH de 6,3-6,4 (FIG. 12). Las formulaciones que tenían un pH de 6,3-6,4 mostraban menos del 1% de cambio en especies básicas o principales a 5°C.
- 10 Se ensayaron diez formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ diferentes para determinar su estabilidad por SEC con el transcurso de doce meses (Tabla 10). Las formulaciones con una concentración de proteína de 60 mg/ml y que contenían citrato 25 mM tenían un cambio en los agregados del 0,1-0,2% después de 1 año, mientras que las formulaciones que contenían 160 mg/ml de proteína y citrato 25 mM tenían un aumento de los agregados del 0,2-0,3% a lo largo de 1 año. Existía un aumento del 0,4-0,6% de agregados para formulaciones que contenían 60, 110
- 15 o 160 mg/ml de proteína sin citrato.

Tabla 10

Nº formulación	Concentración proteína (mg/ml)	pH	Concentración histidina (mM)	Concentración citrato (mM)	Concentración arginina (mM)	Proporción molar PS80	Cambio en % agregados a 5°C después de 1 año
1	62	6,41	50	25	125	0,7	0,11
2	60	6,35	50	0	125	1,5	0,50
3	157	6,44	50	25	125	1,5	0,23
4	161	6,3	50	0	125	0,7	0,56
5	60	6,19	50	25	125	1,5	0,16
6	110	6,03	50	0	125	0,7	0,39
7	162	6,19	50	25	125	0,7	0,26
8	160	6	50	0	125	1,5	0,44
9	165	6,28	0	40	125	1,5	0,30
10	160	6,3	0	40	125	1,0	0,33

EJEMPLO 3

- 20 VISCOSIDAD
- La fuerza de inyección necesaria para administrar la formulación farmacéutica está relacionada con la viscosidad de la formulación. Se prepararon formulaciones con pH variable y concentraciones variables de proteína, arginina, histidina, citrato, sacarosa y polisorbato 80. Se ensayó la viscosidad de estas formulaciones. Se desarrolló un modelo estadístico de la Ln (viscosidad). El modelo mostró que la viscosidad se ve afectada principalmente por la concentración de proteína y por el pH (Fig. 13). La sacarosa, la histidina y la arginina también pueden tener un efecto minoritario sobre la viscosidad. En algunas formulaciones de proteína, se añade cloruro sódico para reducir la viscosidad de la formulación. Sin embargo, se sabe que el efecto del cloruro sódico sobre la viscosidad depende de la proteína y de la formulación.
- 30

Se añadió cloruro sódico a una formulación que contenía vedolizumab 140 mg/ml, arginina 125 mM, histidina 25 mM, citrato 25 mM y polisorbato 80 a una proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína de 1,5, y un pH de 6,4. El NaCl no tenía ningún efecto sobre la viscosidad de la formulación.

Los efectos de la viscosidad sobre la fuerza de inyección de diversas jeringas ensayadas se muestran en las Figuras 16A y 16B.

EJEMPLO 4

MÉTODOS

Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

- 45 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.

5 Los datos de estabilidad para una formulación de vedolizumab generada usando un ensayo de CEX indicaron que el % de isoforma principal estaba por encima del 55,0%.

Concentración isoeléctrica capilar (cIEF)

10 La 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 recomiende 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).

15 Los datos de estabilidad para una formulación de vedolizumab generados usando un ensayo de cIEF indicaron que el % de isoforma principal era de aproximadamente el 53%, el % de especies ácidas era de aproximadamente el 42% y el % de especies básicas era de aproximadamente el 5%.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

20 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.

25 Los datos de estabilidad para una formulación de vedolizumab generados usando un ensayo de SEC indicaron que el % de monómero era del 99,0%, el % de agregados era <0,5% y el % de sustancias de bajo peso molecular era <1,0%.

Ensayo de SDS-PAGE

30 El SDS-PAGE se realiza 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). 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.

Eficacia de unión

40 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.

Humedad por Karl Fischer

50 La formulación se valora con metanol para una determinación de la humedad de Karl Fischer coulométrica.

EJEMPLO 5

Efectos de la silicona de productos de jeringa precargada con formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$

55 Se usa una formulación subcutánea que consiste en 60-160 mg/ml de proteína anti- $\alpha 4\beta 7$ en un tampón que contiene L-Histidina, Hidrocloruro Clorhidrato de L-Arginina, Citrato y Polisorbato 80 para estudiar los efectos de la silicona sobre la estabilidad de las formulaciones de proteína y los atributos del recipiente/recinto. El estudio se realiza con una carga de 0,5 ml.

60 Se exploran parámetros que incluyen la concentración de proteína, la proporción molar de polisorbato 80 respecto a proteína y la cantidad de silicona que se pulveriza sobre los cilindros de jeringa. El intervalo de cada uno de los parámetros de entrada se muestra en la Tabla 11.

65

Tabla 11. Intervalos de parámetros de entrada

Parámetros	Inferior	Superior
Concentración de proteína (mg/ml)	100	160
Proporción de polisorbato 80:proteína	0	2
Cantidad de silicona (mg)	0,4	0,8

Se usa un diseño de experimento para determinar el conjunto de formulaciones a estudiar. Un número razonable de formulaciones varía de 6 a 8 formulaciones. Se muestra un ejemplo de las formulaciones que se ensayan en la Tabla 12.

Tabla 12

Procesamiento	Conc. (mg/ml)	proteína	Proporción PS80:Proteína	de	Concentración de PS80 (%)	Nivel de silicona (mg)
1	100		1		0,087	0,8
2	100		2		0,174	0,8
3	160		0		0	0,8
4	160		2		0,279	0,4
5	100		0		0	0,4
6	160		2		0,279	0,8
7	100		1		0,087	0,4
8	160		0		0	0,4
9	100		0		0	0
10	100		2		0,174	0
11	160		0		0	0
12	160		2		0,279	0

Pueden añadirse algunos controles al conjunto de formulaciones y ensayarse a algunos puntos temporales seleccionados.

Estas formulaciones se ponen en estabilidad a varias temperaturas diferentes (por ejemplo, 5°C, 25°C/HR del 60%, 40°C/HR del 75%) y se extraen a diversos puntos temporales (por ejemplo, 0 semanas, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 6 meses y 12 meses) para su ensayo. Los controles se ensayan a las 0 semanas, 12 semanas, 6 meses y 12 meses.

Los ensayos que se realizan a cada extracción temporal de estabilidad incluyen SEC, CEX, Instron, MFI y Cuantificación de Silicona. Se ensaya 1 jeringa para Instron, usándose el material expulsado para SEC, CEX, mediciones de fuerza de inyección y formación de imagen microfluídica (MFI) y cuantificación de silicona.

EJEMPLO 6

Análisis de componentes de jeringa precargada cargada con una formulación de anticuerpo anti- α 4 β 7

Este estudio exploraba cómo diversos fabricantes de jeringas, materiales elastoméricos de émbolo (tapón) y la cantidad de PS80 en la formulación afectaban a las propiedades mecánicas del sistema y a la estabilidad de la formulación.

Se creó un diseño de experimento que exploraba 3 fabricantes de jeringa diferentes, 2 tipos de material de émbolo (tapón) diferentes y 2 proporciones molares de PS80 respecto a proteína diferentes. El resto de la formulación se mantuvo constante a 170 mg/ml de proteína, arginina 125 mM, histidina 50 mM, citrato 25 mM y un pH de 6,5. El tamaño de aguja en estas jeringas precargadas era de pared fina de 27G½' o 29G½". Los experimentos realizados se detallan en la Tabla 15.

Las entradas de datos de diseño experimental para la parte activa del experimento se muestran a continuación en la Tabla 13, mientras que las constantes se muestran en la Tabla 14. El diseño experimental se creó utilizando los datos de entrada mostrados en la Tabla 13.

La lista de experimentos se muestra en la Tabla 10.

Tabla 13. Variables y niveles de DOE con formulación activa

Variable	Valores		
Proporción molar PS80:Proteína	1,0		1,5
Fabricante de jeringa	A	B	C
Tipo de émbolo (Tapón)	4432		4023 Revestido

Tabla 14. Constantes para formulación activa

5

Constante	Valor
Concentración de proteína (mg/ml)	170
Concentración de arginina (mM)	125
Concentración de histidina (mM)	50
Concentración de citrato (mM)	25
pH	6,5

Tabla 15. Detalles experimentales

Nº de Procesamiento	Tipo de jeringa	Émbolo (Tapón)	PS80
1	C	4432	1
2	B	4432	1
3	A	4023	1
4	C	4023	1
5	B	4023	1
6	A	4023	1,5
7	C	4023	1,5
8	B	4023	1,5

- 10 A una formulación concentrada de formulación de anti- $\alpha 4\beta 7$ se le adicionó polisorbato 80 y se diluyó hasta 170 mg/ml. La composición de la formulación de partida se muestra a continuación en la Tabla 16.

Tabla 16. Detalles de tampón de formulación de partida

Proteína (mg/ml)	His total (mM)	Citrato total (mM)	Arg (mM)	pH
183	50	25	125	6,48

- 15 Para la dilución del material hasta la composición de formulación deseada se preparan soluciones madre de PS80 en Citrato 25 mM, Histidina 50 mM, Arginina 125 mM, pH 6,48.

Tabla 17. Detalles de solución madre

Excipiente	Concentración
PS 80 (%)	5

- 20 El esquema de dilución para las formulaciones se detalla en la Tabla 18.

Tabla 18. Detalle de dilución

Formulación de partida (ul)	PS80 en tampón His/Arg/Citrato (ul)	Tampón Histidina 50 mM, Arginina 125 mM, Citrato 25 mM pH 6,48	Volumen total (ul)
27868,9	890,8	1240,3	30000,0
18579,2	890,8	530,0	20000,0

La preparación de composiciones se realiza basándose en el esquema de dilución, y la formulación de partida debería pesarse, mientras que las otras soluciones madre pueden pipetarse volumétricamente. Las formulaciones se filtran.

- 5 0,5 ml de formulación se dividen en alícuotas en tantas jeringas de 1 ml de longitud como sea posible. Las jeringas se taponan mediante la máquina de taponado con una burbuja de 2-4 mm. Para cada punto temporal, se almacena una jeringa con la aguja hacia abajo y se almacena una jeringa de lado. Las jeringas extra se almacenan con la aguja hacia abajo.
- 10 Las jeringas se ensayan a 5, 25 y 40°C en la semana 2 y a un mes. El ensayo analítico (aspecto, Instron, pH, osmolalidad, densidad, viscosidad, SEC, CEX y Brightwell) se realiza inicialmente y después de nuevo a las 2 semanas a 25 y 40°C y a las 4 semanas a 25°C.

EJEMPLO 7

Análisis de recintos contenedores subcutáneos usados en jeringas con aguja de pared fina de 27 G precargadas con una formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$

Este estudio explora cómo diversos modelos de jeringa con una aguja de pared fina de 27G y diversos fabricantes y modelos de émbolo (tapón) afectan a las propiedades mecánicas del sistema y a la estabilidad de la formulación con el tiempo.

Este estudio explora cómo la estabilidad de la formulación líquida subcutánea de anti- $\alpha 4\beta 7$ en una jeringa precargada y las propiedades mecánicas de la jeringa se ven afectadas por el fabricante de la jeringa y el modelo de émbolo (tapón) para jeringas con una aguja de 27GTW. Los datos generados a partir de este estudio pueden determinar los componentes de recipiente/recinto para la formulación líquida subcutánea de anti- $\alpha 4\beta 7$.

Los datos de entrada del diseño experimental se muestran a continuación en la Tabla 19, mientras que las constantes se muestran en la Tabla 20. El diseño experimental se creó utilizando los datos de entrada mostrados en la Tabla 19.

La lista de experimentos a realizar se muestra en la Tabla 21.

Tabla 19. Variables y niveles de DOE con formulación activa

Variable	Valores			
Fabricante de jeringa	A	B	C	
Tipo de émbolo (Tapón)	4432	4023 Revestido	D	E

Tabla 20. Constantes para formulación activa

Constante	Valor
Concentración de proteína (mg/ml)	160
Concentración de arginina (mM)	125
Concentración de histidina (mM)	50
Concentración de citrato (mM)	25
PS80 (%)	0,2
pH	6,5

Tabla 21. Detalles experimentales

Nº de procesamiento	Jeringa	Émbolo (Tapón)
1	B	D
2	B	4432
3	A	4432
4	B	4023 Revestido
5	A	D
6	C	4023 Revestido
7	A	4023 Revestido
8	C	D
9	C	4432
10	C	E

A una formulación de anti- $\alpha 4\beta 7$ concentrada se le adicionó polisorbato 80 y se diluyó hasta 160 mg/ml. La composición de la formulación de partida se muestra a continuación en la Tabla 22.

Tabla 22. Detalles del tampón de formulación de partida

Proteína (mg/ml)	His total (mM)	Citrato total (mM)	Arg (mM)	pH
180	50	25	125	6,3

Para la dilución del material hasta la composición de formulación deseada se preparan soluciones madre de PS80 en Citrato 25 mM, Histidina 50 mM y Arginina 125 mM, pH 6,3.

Tabla 23. Detalles de solución madre

Excipiente	Concentración
PS 80 (%) en tampón His/Arg/Citrato pH 6,3	1,68

El esquema de dilución para las formulaciones se detalla en la Tabla 24.

Tabla 24. Detalle de Dilución

Formulación de partida en tampón His/Arg/Citrato (ml)	PS80 en tampón His/Arg/Citrato (ml)	Volumen total (ml)
78	10 (1,68%)	88

La preparación de composiciones se realiza basándose en el esquema de dilución, y la formulación de partida debería pesarse, mientras que las otras soluciones madre pueden pipetarse volumétricamente. Las formulaciones se filtran.

0,5 ml de formulación se dividen en alícuotas en tantas jeringas de 1 ml de longitud como sea posible. Las jeringas se taponan mediante la máquina de taponado con una burbuja de 2-4 mm. Para cada punto temporal, se almacena una jeringa con la aguja hacia abajo (posición horizontal).

Las jeringas se ensayan a 5°C, 25°C/HR del 60% y 40°C/HR del 75% a 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses (opcional), 12 meses, 18 meses y 24 meses.

Las formulaciones líquidas se ensayan analíticamente (concentración, osmolalidad, pH, Instron, MFI, SEC y/o CEX) a 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses (5°C); 1, 3, 6, 9, 12, 18, meses (25°C); 1, 3, 6, 9, 12, meses (40°C); y 1, 3 meses (40°C).

EJEMPLO 8

Análisis de formulación subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en jeringas precargadas de plástico

Este estudio se inicia para investigar el uso de jeringas de plástico como el sistema de recipiente/recinto para una formulación subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$. Se estudia la estabilidad de una formulación subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ representativa en jeringas precargadas de plástico candidatas. Los datos generados a partir de este estudio contribuyen a juzgar la aplicabilidad del uso de una jeringa de plástico para una formulación líquida subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.

Se preparan muestras de ensayo de estabilidad como se muestra a continuación. Los ensayos de estabilidad se realizan en las condiciones de almacenamiento de 40°C/HR del 75%, 25°C/HR del 60% y 5°C.

Se ensayan dos tipos de jeringas de plástico y una jeringa de vidrio (Control) en la Tabla 25 con una formulación líquida subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ mostrada en la Tabla 26. La Tabla 27 muestra los detalles de cada conjunto de muestras ensayado en el experimento.

Tabla 25. Jeringas de plástico

		Muestra N° 1 Jeringa de plástico 1	Muestra N° 2 Jeringa de plástico 2	Muestra N° 3 Jeringa de vidrio (Control)
Jeringa	Proveedor	F	B	A
	Componentes	Jeringa: polímero Aguja: 27G(TW) Protector de aguja rígido	Jeringa: polímero Aguja: 26G(RW) Tapa de cono de cierre roscado	Jeringa: Vidrio Aguja: 27G(TW) Protector de aguja rígido
	Revestimiento de silicio	Libre	No libre	No libre
Émbolo	Proveedor	F	F	←
	Descripción de producto	1ml material A	1ml material B	←
	Revestimiento de silicio	No	Sí	←

Tabla 26. Formulación subcutánea de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ (pH 6,5)

Componente	Composición
Anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$	160 mg/ml
Arginina	125 mM
Histidina	50 mM
Citrato	25 mM
PS80 (Proporción molar de proteína)	1,5 (0,2% p/v)

5

Tabla 27. Detalles de muestra

N° Muestra	Proveedor de jeringa plástico	Proteína (PM: 150.000)		Arg (PM: 174,20) (mM)	His (PM: 155,15) (mM)	Citrato (PM: 210,14) (mM)	PS 80 (PM: 1.309,68)		pH
		(mg/ml)	(mM)				(%p/v)	Proporción molar de proteína	
1	F	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
2	B	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5
3 (Cont.)	A	160	1,067	125	50	25	0,21	1,5	6,5

Se usa una formulación líquida subcutánea de anti- $\alpha 4\beta 7$ preparada previamente para esta investigación. Las formulaciones se filtran. Se toman muestras de la solución filtrada para el ensayo de calidad como muestra "antes de la carga" (Aspecto, MFI, DLS). 0,5 ml de la formulación se dividen en alícuotas en jeringas de plástico de 1 ml. Las jeringas se taponan mediante la máquina de taponado al vacío. Las jeringas se almacenan con la aguja hacia abajo.

10

Se realiza una comprobación inicial para medir el pH, la osmolalidad, la densidad, la viscosidad y la concentración de proteína. El ensayo analítico (aspecto, SEC (Agregados, Monómero, BPM), CEX (Ácidas, Principal, Básicas), fuerza de deslizamiento, MFI, DLS y/o peso) se realiza después de 1 semana a 40°C, 2 semanas, 40°C, 1 mes, 5, 25 y 40°C, 3 meses, 5 y 25°C, 6 meses a 5 y 25°C, 9 meses a 5 y 25°C y 12 meses a 5 y 25°C.

15

Las muestras se toman a 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses a 5°C y 25°C. Las muestras se toman a 1 semana, 2 semanas y 1 mes a 40°C.

20

Ejemplo 9:

Las muestras se analizan para determinar el aspecto, la fuerza de inyección, SEC, CEX y la formación de imagen microfluídica a 5°C y 25°C a diversos puntos temporales que pueden haber incluido 0, 1, 3, 6 y 12 meses. La estabilidad de la formulación según se mide por SEC y CEX era similar a lo analizado en los Ejemplos 1 y 2. Para el ensayo de la fuerza de inyección, se midió la fuerza de deslizamiento (Tabla 28). Un modelo estadístico determinó que el único factor significativo que afectaba a la fuerza de deslizamiento era el fabricante de la jeringa, donde A tenía fuerzas de deslizamiento superiores que B, que era mayor que C (Figura 17). Los cambios en la fuerza de deslizamiento de las jeringas a lo largo de 12 meses a 5°C y 6 meses a 25°C eran inferiores a 10 N pero en su mayor parte inferiores a 5 N.

25

30

Tabla 28

Nº procesamiento	Fabricante de jeringas	Tamaño de aguja	Tipo de émbolo (Tapón)	Proporción molar PS80:Proteína	Fuerza de deslizamiento inicial (N)
1	C	27G	D	1	19,2
2	B	27G	D	1	22,9
3	A	29GTW	E	1	25,0
4	C	27G	E	1	18,5
5	B	27G	E	1	22,7
6	A	29GTW	E	1,5	28,8
7	C	27G	E	1,5	18,7
8	B	27G	E	1,5	23,7

EJEMPLO 10

- 5 Análisis de componentes de jeringa precargada usados en jeringas con aguja de pared fina de 27 G cargadas con formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$

10 Este estudio exploraba cómo diversos fabricantes de jeringas con una aguja de pared fina de 27G y diversos fabricantes de émbolo (tapón) y materiales elastoméricos afectaban las propiedades mecánicas del sistema de jeringa precargada y a la estabilidad de la formulación con el tiempo.

Se ensayaron tres fabricantes de jeringas diferentes y 4 modelos de émbolo (tapón) diferentes con agujas de pared fina de 27G $\frac{1}{2}$ " y una formulación que contenía proteína 160 mg/ml, arginina 125 mM, histidina 50 mM, citrato 25 mM, PS80 al 0,2%, a un pH de 6,5. Todas las muestras creadas y ensayadas se muestran en la Tabla 29.

15

Tabla 29. Detalles experimentales

Nº Procesamiento	Jeringa	Émbolo (Tapón)
1	B	F
2	B	D
3	A	D
4	B	E
5	A	F
6	C	E
7	A	E
8	C	F
9	C	D
10	C	G

20 Las muestras se analizaron para determinar su aspecto, fuerza de inyección, SEC, CEX y formación de imagen microfluídica a 5°C, 25°C y 40°C a diversos puntos temporales que pueden haber incluido 0, 1, 3, 6 y 12 meses. La estabilidad de la formulación según se mide por SEC y CEX era similar a lo analizado en los Ejemplos 1 y 2. Para el ensayo de la fuerza de inyección, se midió la fuerza de desbloqueo y de deslizamiento. Los resultados en el punto temporal inicial se muestran en la Tabla 30.

25

30

Tabla 30

N° procesamiento	Fabricante de jeringa	Tipo de émbolo (Tapón)	Fuerza de deslizamiento inicial (N)	Fuerza de desbloqueo inicial (N)	Fuerza de desbloqueo a 12 meses a 5°C (N)	Fuerza de desbloqueo a 12 meses a 25°C (N)	Fuerza de desbloqueo a 12 meses a 40°C (N)
1	B	F	12,0	4,0	3,8	12,9	28,7
2	B	D	11,9	3,9	4,6	12,4	36,0
3	A	D	7,0	4,0	6,5	5,1	6,4
4	B	E	13,9	4,5	4,7	5,8	17,2
5	A	F	5,7	4,1	3,0	17,5	23,9
6	C	E	6,7	4,1	5,0	5,8	11,4
7	A	E	7,9	7,6	4,3	10,4	6,1
8	C	F	6,3	4,2	4,1	15,0	33,3
9	C	D	5,9	4,8	3,9	4,4	10,0
10	C	G	7,2	4,6	6,1	9,8	13,0

Un modelo estadístico mostró que los fabricantes de jeringas A y C eran similares y tenían fuerzas de deslizamiento menores que el fabricante B, mientras que el émbolo (tapón) E tenía una fuerza de deslizamiento ligeramente superior que el otro émbolo (tapones).

Generalmente, las fuerzas de desbloqueo iniciales eran similares entre todas las muestras que se ensayaron.

A lo largo de 12 meses a 5°C, 25°C y 40°C, las fuerzas de deslizamiento no cambiaron significativamente. Sin embargo, la fuerza de desbloqueo para jeringas con émbolo (tapón) F aumentó a los 12 meses a 25°C y 40°C.

EJEMPLO 11

Análisis de formulación de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en jeringas precargadas

Este estudio determina cómo niveles variables de concentración de proteína, concentración de polisorbato 80, concentración de citrato y pH afectan a formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ en un formato de jeringa precargada. Parte del diseño experimental se crea en JMP con un factorial fraccionado de dos niveles de concentración de proteína (de 60 a 160 mg/ml), pH (de 6,0 a 6,3), proporción molar de polisorbato 80:proteína (de 0,723 a 1,5) y concentración de citrato (de 0 a 25 mM). Estas formulaciones tienen un valor constante de concentración de Histidina (50 mM) y Arginina (125 mM) (Formulaciones 1-8). Se añaden variaciones de estas formulaciones con Histidina 25 mM (Formulaciones 9-10).

Se desarrolla un conjunto adicional de formulaciones para explorar formulaciones sin histidina presente y con sólo citrato actuando como tampón (Formulaciones 11-16). Los niveles de los datos de entrada para todas las formulaciones que se exploran se muestran en la Tabla 31. Las constantes usadas para todas las formulaciones se muestran en la Tabla 32.

Tabla 31. Variables y niveles de DOE

Variable	Valores nominales	
	Inferior	Superior
Concentración de proteína (mg/ml)	60	160
pH	6,0	6,3
Proporción molar de PS80:Proteína	0,723	1,5
Concentración de citrato (mM)	0	40
Concentración de histidina (mM)	0	50

Tabla 32. Constantes

Constante	Valor
Concentración de arginina (mM)	125

La Tabla 33 enumera las formulaciones a ensayar.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Tabla 33. Detalles de formulación

Nº formulación	Proteína (mg/ml)	Proteína (mM)	His (mM)	Arg (mM)	%PS 80	pH	Proporción de molar PS80:Proteína	Antioxidante	Concentración antioxidante (mM)
1	60	0,400	50	125	0,038	6,3	0,723	Acido cítrico	25
2	60	0,400	50	125	0,079	6,3	1,5	Acido cítrico	0
3	157	1,047	50	125	0,206	6,3	1,5	Acido cítrico	25
4	160	1,067	50	125	0,101	6,3	0,723	Acido cítrico	0
5	60	0,400	50	125	0,079	6,0	1,5	Acido cítrico	25
6	110	0,733	50	125	0,069	6,0	0,723	Acido cítrico	0
7	160	1,067	50	125	0,101	6,0	0,723	Acido cítrico	25
8	160	1,067	50	125	0,210	6,0	1,5	Acido cítrico	0
9*	160	1,067	25	125	0,101	6,0	0,723	Acido cítrico	25
10*	160	1,067	25	125	0,140	6,0	1	Acido cítrico	25
11	160	1,067	0	125	0,101	6,3	0,723	Acido cítrico	40
12	160	1,067	0	125	0,210	6,3	1,5	Acido cítrico	40
13	60	0,400	0	125	0,079	6,3	1,5	Acido cítrico	40
14*	160	1,067	0	125	0,210	6,1	1,5	Acido cítrico	40
15*	160	1,067	0	125	0,210	6,6	1,5	Acido cítrico	40
16*	160	1,067	0	125	0,140	6,3	1	Acido cítrico	40

Cada formulación se genera a partir de una formulación madre de partida que contiene anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ y se diluye con diversas soluciones madre de excipiente. Para conseguir volúmenes de dilución razonables, la solución madre de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ usada se muestra en la Tabla 34. Se realizan dos operaciones de TFF diferentes para conseguir las formulaciones TFF 1 y 2. Se usa una porción de TFF 1 en una diálisis para conseguir la formulación etiquetada como "Diálisis".

Tabla 34. Detalles de tampón de formulación de partida

Formulación de partida	Proteína (mg/ml)	His total (mM)	Citrato total (mM)	Arg (mM)	pH
TFF 1	192,1	50	0	125	6,1
TFF 2	206,1	0	40	125	6,3
Diálisis	169,65	25	25	125	6,0

Para la dilución del material hasta la composición de formulación deseada, se preparan soluciones madre de cada excipiente en agua a las concentraciones especificadas por la Tabla 35.

Tabla 35. Detalles de solución madre

Excipiente	Concentración
Histidina (mM)	220
Hidrocloreuro de arginina (mM)	625
PS 80 (%)	2,5
Hidrocloreuro de histidina (mM)	600
Ácido cítrico (mM) (pH 6,3)	1.500
Ácido cítrico (mM) (pH 6,0)	1.500
Citrato (mM)	600
Citrato sódico (mM)	800

El esquema de dilución para las formulaciones se detalla en la Tabla 36 y 37.

Tabla 36. Detalle de dilución

	Formulación de partida (ul)	Formulación de partida (mg)	His (ul)	His*HCl (ul)	Arg (ul)	Solución de citrato (ul)	PS80 (ul)	WFI (ul)
1	4.685,06	4.961,01	1.612,2	268,4	2.063,0	250	227,3	5.894,0
2	4.685,06	4.961,01	1.612,2	268,4	2.063,0	0	471,6	5.899,7
3	12.259,2	12.981,31	724,1	0,0	548,2	250,0	1.234,0	0,0
4	12.493,49	13.229,36	696,7	0,0	501,3	0	606,2	702,4
5	4.685,06	4.961,01	1.002,8	491,9	2.063,0	250	471,6	6.035,7
6	8.589,28	9.095,18	545,0	334,4	1.282,1	0	416,7	3.832,4
7	12.493,49	13.229,36	87,2	176,9	501,3	250	606,2	884,9
8	12.493,49	13.229,36	87,2	176,9	501,3	0	1257,6	483,5
9	12.260,8	12.941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	525,3	0,0
10	12.260,8	12.941,30	38,2	16,8	147,8	12,3	726,6	0,0

Tabla 37. Detalles de dilución

	Formulación de partida (ul)	Formulación de partida (mg)	Citrato (ul)	Citrato Na (ul)	Arg (ul)	PS80 (ul)	WFI (ul)
11	9.315,87	9.944,69	8,3	128,0	536,8	484,9	1.526,1
12	9.315,87	9.944,69	8,3	128,0	536,8	1.006,1	1.005,0
13	3.493,45	3.729,26	30,5	402,5	1.701,3	377,3	5.995,0
14	5.822,42	6.215,43	22,0	67,4	335,5	628,8	623,9
15	5.822,42	6.215,43	0,0	300,0	335,5	628,8	413,3
16	5.822,42	6.215,43	5,2	80,0	335,5	419,2	837,7

La preparación de composiciones se realiza basándose en el esquema de dilución, y la formulación de partida se pesa, mientras que las otras soluciones madre se pipetea volumétricamente. Las formulaciones se filtran. 0,5 ml de formulación se dividen en alícuotas en tantas jeringas de 1 ml de longitud como sea posible. Las jeringas se taponan mediante la máquina de taponado. Las jeringas se almacenan con la aguja hacia abajo.

Las formulaciones líquidas se ensayan analíticamente (aspecto, pH, osmolalidad, densidad, DLS, SEC, CEX y/o Brightwell) inicialmente y a 1 semana, 40°C, 2 semanas, 40°C, 1 mes 25 y 40°C, 2 meses 5 y 25°C, 3 meses 5 y 25°C, 6 meses 5 y 25°C, 9 meses 5 y 25°C y 12 meses 5 y 25°C.

También se realizan extracciones de formulación específicas de acuerdo con la Tabla 38.

Tabla 38: Extracciones de formulación específicas

Formulación	Temperatura	1 Semana	2 Semanas	1 Mes	2 Meses	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	Extras
1	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
2	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
3	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
4	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
5	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
6	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
7	5	--	--	--	X	X	X	X	X	0
8	5	--	--	--	X	X	X	X	X	1
9	5	--	--	--	--	--	--	--	--	3
10	5	--	--	--	X	X	X	--	X	0
11	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
12	5	--	--	--	X	--	--	--	--	4
13	5	--	--	--	--	--	--	--	--	5
14	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
15	5	--	--	--	--	--	--	--	--	2
16	5	--	--	--	X	--	--	--	--	1
1	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
2	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
3	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
4	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
5	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
6	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
7	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
8	25	--	--	X	X	X	X	X	X	1
9	25	--	--	X	--	--	--	--	--	3
10	25	--	--	X	X	--	X	--	--	0
11	25	--	--	X	--	--	--	--	--	5
12	25	--	--	X	X	--	--	--	--	4
13	25	--	--	X	--	--	--	--	--	6

(continuación)

Formulación	Temperatura	1 Semana	2 Semanas	1 Mes	2 Meses	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	Extras
14	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
15	25	--	--	X	--	--	--	--	--	2
16	25	--	--	X	X	--	--	--	--	1
1	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
2	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
3	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
4	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
5	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
6	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
7	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
8	40	X	X	X	--	--	--	--	--	1
9	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
10	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
11	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
12	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
13	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
14	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
15	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0
16	40	X	X	X	--	--	--	--	--	0

EJEMPLO 12

Una formulación que contenía proteína 160 mg/ml, histidina 50 mM, citrato 25 mM, arginina 125 mM a pH 6,5 se ensayó para determinar la estabilidad en una jeringa de vidrio o dos jeringas de plástico COP diferentes. A 5°C y 25°C después de 12 meses, la cantidad de agregados y monómero era comparable entre las jeringas de plástico y de vidrio.

Tabla 39

Nº formulación	Proporción molar de PS80:Proteína	Material de jeringa	Cambio en agregados por SEC después 12 meses a 5°C (%)	Cambio en agregados por SEC después 12 meses a 25°C (%)	Cantidad de monómero después 12 meses a 5°C (%)	Cantidad de monómero después 12 meses a 25°C (%)
1	1,5	Fabricante de COP 1	0,2	1,0	98,3	96,8
2	1,5	Fabricante de COP 2	0,2	1,6	98,3	96,9
3	1,5	Vidrio	0,2	1,4	98,4	96,8
4	1	Vidrio	0,2	1,6	98,3	96,8

Ejemplo 13: Biodisponibilidad de vedolizumab administrado por inyección subcutánea e intramuscular

Se completó un estudio de fase I de la biodisponibilidad del vedolizumab administrado por inyección subcutánea e intramuscular a sujetos masculinos sanos. Se inscribieron un total de 42 sujetos masculinos sanos en el estudio. Los sujetos se dividieron en tres grupos (administración subcutánea, intramuscular e intravenosa) de 14 sujetos cada uno. A los sujetos se les administró 180 mg de vedolizumab un día. La dosis se reconstituyó 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. Para los sujetos con intramuscular y subcutánea, la dosis se dividió en dos inyecciones de 1,5 ml cada una. Se obtuvieron muestras de sangre para determinar la concentración plasmática de vedolizumab y se determinó la biodisponibilidad de vedolizumab en cada conjunto de sujetos.

No se describieron eventos adversos graves o infecciones significativas, anomalías clínicamente significativas, listas de comprobación de RAMP subjetivas/objetivas positivas ni hallazgos ECG clínicamente significativos.

El modelado y la simulación de PK/PD se completaron para determinar la dosis y los regímenes de dosis extravasculares que dan como resultado exposiciones similares a las dosis intravenosas para mantener estas concentraciones en suero deseadas a niveles valle.

El perfil de absorción (FIG. 18) demostró que las concentraciones de las dosis intramuscular y subcutánea generalmente se superponían. No hay diferencias macroscópicas aparentes en los perfiles de absorción de estas vías de administración. La biodisponibilidad absoluta de vedolizumab después de la inyección SC era de aproximadamente el 75% y después de la inyección IM era de aproximadamente el 80%.

Ejemplo 14. Modelado de regímenes de dosis subcutánea

El modelado y la simulación de PK/PD se completaron para determinar la dosis y los regímenes de dosis extravasculares que dan como resultado exposiciones similares a las dosis intravenosas para mantener ciertas concentraciones en suero a niveles valle.

Un conjunto de datos combinado final (datos de IV, SC e IM) demostró modelos lineales de dos compartimentos parametrizados en términos de aclaramiento (CL) y volumen de distribución central (V2), volumen de distribución periférico (V3), una constante de velocidad de absorción dependiente de vía extravascular (KA) y la biodisponibilidad relativa (comparada con la administración intravenosa) de las dosis extravasculares (F). Los términos IIV se incluyeron en CL, V2 y V3 con el peso corporal como la única covariable que influye en CL y V3 a través de un efecto alométrico.

La aceptabilidad y predictibilidad del modelo se demostró a través de estimaciones de parámetros de secuencia inicial de instrucciones, comprobaciones predictivas visuales y calidad de representación de ajuste. El análisis del modelo identificó el peso corporal como un predictor para la PK de vedolizumab, atribuyéndose la variabilidad en la PK a componentes entre sujetos y dentro de sujetos.

Una vez que se demostró que el modelo era adecuado para la simulación, se realizaron simulaciones para evaluar el efecto de la vía de administración (IV, IM o SC) y evaluar el efecto de la frecuencia de dosificación (semanal, cada 2

semanas, cada 4 semanas y cada 8 semanas) sobre las concentraciones valle en estado estacionario. Basándose en estos valores y en la biodisponibilidad relativa de vedolizumab después de la administración IM y SC (F = 69,5%) se seleccionaron dosis para conseguir concentraciones valle similares a las dosis IV.

- 5 Las simulaciones modelaron dosis y regímenes para que se correspondieran con los regímenes de inducción y mantenimiento intravenosos. Las dianas eran la concentración de fármaco tanto de exposición (área bajo la curva de concentración de fármaco en suero-tiempo (AUC)) como valle. Las Tablas 40-43 proporcionan resultados de simulaciones.

10 Tabla 40. Régimen de inducción que corresponde a una AUC IV durante las semanas 0-6

Vía	Dosis	Frecuencia
IV	300 mg	Semana 0 y 2
SC	485 mg	Semana 0 y 2
SC	160 mg	Día sí día no (6 dosis)
SC	>160 mg	Semanal (6 dosis)

Tabla 41. Régimen de inducción que corresponde a una concentración valle IV, semanas 0-6

Vía	Dosis	Frecuencia
IV	300 mg	Semana 0 y 2
SC	>160 mg	Semana 0 y 2
SC	100 mg	Cada semana (6 dosis)
SC	160 mg	Día sí día no (durante 2 semanas)

Tabla 42. Régimen de mantenimiento que corresponde a una dosis IV de 300 mg cada 4 semanas

Frecuencia	Vía	Dosis correspondiente a concentración valle en estado estacionario IV de 4 sem.	Dosis correspondiente a AUC IV de 4 sem.
Una vez cada 4 semanas	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
Una vez cada 2 semanas	IV	115	150
	IM	165	216
	SC	165	216
Cada semana	IV	50	75
	IM	72	108
	SC	72	108

15 Tabla 43. Régimen de mantenimiento que corresponde a una dosis IV de 300 mg cada 8 semanas

Frecuencia	Vía	Dosis correspondiente a concentración valle en estado estacionario IV de 8 sem.	Dosis correspondiente a AUC IV de 8 sem.
Una vez cada 8 semanas	IV	300	300
	IM	432	432
	SC	432	432
Una vez cada 4 semanas	IV	90	150
	IM	125	216
	SC	125	216
Una vez cada 2 semanas	IV	35	75
	IM	50	108
	SC	50	108
Cada semana	IV	15	37,5
	IM	22	54
	SC	22	54

Ejemplo 15: Estudio multidosis de fase 2a

- 20 Un estudio multidosis de fase 2a puede evaluar la seguridad, tolerabilidad y PK en estado estacionario de vedolizumab después de múltiples dosis de vedolizumab mediante la vía de administración subcutánea, y evaluar la biodisponibilidad relativa del régimen subcutáneo en comparación con el régimen intravenoso. El desarrollo de HABA y HABA neutralizantes y el efecto sobre la PD de múltiples dosis de vedolizumab después de la administración subcutánea pueden evaluarse.

- 25 Pueden incluirse en el estudio pacientes con colitis ulcerosa que tienen una puntuación de Mayo parcial de 1-12 y pacientes con enfermedad de Crohn que tienen un CDAI superior a 150. Las cohortes pueden recibir un régimen de

inducción de vedolizumab (300 mg) administrado IV las semanas 0 y 2, seguido de un régimen de mantenimiento de Vedolizumab (300 mg) administrado IV cada 4 semanas a las semanas 6-22
 Vedolizumab (300 mg) administrado IV cada 8 semanas a las semanas 6-22
 Vedolizumab (108 mg) administrado SC cada semana a las semanas 6-22
 Vedolizumab (108 mg) administrado SC cada 2 semanas a las semanas 6-22
 Vedolizumab (165 mg) administrado SC cada 3 semanas a las semanas 6-22.

Pueden recogerse muestras antes de la dosificación el día 1 y después de nuevo el día 1 (12 horas), 2, 3, 5, 8, 15, 29, 43, 127, 127 (12 horas), 128, 129, 131, 134, 141 y 155 para evaluar la PK y la PD.

Ejemplo 16: 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.

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 estudio clínico previo.

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

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

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

Puntuación parcial de Mayo

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. 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

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

Los pacientes de continuación con colitis ulcerosa tuvieron las mayores puntuaciones de IBDQ medias en el nivel basal. El 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.

Proteína C reactiva

Los pacientes tanto de continuación con colitis ulcerosa como de enfermedad de Crohn mostraron niveles de CRP medios disminuidos a lo largo del 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). 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

No se reportaron 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 HAHA positivos (dos de estos fueron temporalmente positivos). El estudio no mostró evidencia de toxicidad hepática, linfocitosis o linfopenia o cualquier otro cambio de laboratorio asociado a fármaco.

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.

Ejemplo 17: Inducción y mantenimiento de respuesta y remisión en pacientes con colitis ulcerosa de moderadamente a gravemente activa

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.

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.

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. El criterio de valoración de este estudio fue a las 52 semanas, analizando la población que respondía a la inducción.

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 µg/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 µg/ml para el régimen de cada 8 semanas (régimen de 8 semanas) y de entre 35 y 40 µg/ml para el régimen de cada 4 semanas (régimen de 4 semanas). Al final de la infusión la mediana de las concentraciones plasmáticas de vedolizumab era de entre 98 y 101 µg/ml para el régimen de cada 8 semanas y de aproximadamente 129 y 137 µg/ml para el régimen de cada 4 semanas.

En las Tablas 44-47 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 cicatrización de la mucosa a las 6 semanas en comparación con el placebo (Tabla 44). 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 45). 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.

Tabla 44: 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 45: 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

5 Tabla 46: 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 47: 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%)					
	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

10 Ejemplo 18: inducción y mantenimiento de la respuesta y remisión en pacientes con enfermedad de Crohn de

moderada a gravemente activa

Un único estudio 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 48-51. Una proporción significativamente mayor de pacientes tratados con vedolizumab consiguió la remisión clínica y la respuesta aumentada en comparación con el placebo (Tabla 48). 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 48: 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 (µg/ml)	-3,6 N=147	-2,9 N=220		0,9288

Tabla 49: 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 50: 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)

Tabla 51: 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%)					
Criterio de valoración	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)

Ejemplo 19: Inducción de Respuesta y Remisión en Pacientes con Enfermedad de Crohn de Moderada a Gravemente activa

Se completó un estudio multicéntrico controlado con placebo, con doble ocultación, aleatorizado, para evaluar el efecto de inducción de vedolizumab a dosis de 300 mg (reconstituida a partir de una formulación 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, que se liofilizó) en pacientes con fracaso de 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, el 75% de los cuales tenían fracasos de antagonista de TNF α y el 25% de los cuales no habían sido tratados con TNF α . Se equilibraron datos demográficos y de medicación de IBD simultánea a través de grupos de tratamiento. También se equilibraron las características de enfermedad basales a través de grupos de tratamiento excepto para la actividad de enfermedad basal.

El criterio de valoración primario diseñado para el estudio fue de una remisión a la semana 6 (%) en la población con fracaso de antagonista anti-TNF α . Los criterios de valoración secundarios clave que se evaluaron (procedimiento de ensayo secuencial) fueron: remisión a la semana 6 (%) en la población global, remisión en la semana 10 (%) en la población con fracaso de antagonista anti-TNF α y global (usando el procedimiento de Hochberg), remisión prolongada a la semana 6 y 10 (%) en la población con fracaso de antagonista anti-TNF α y global (usando el procedimiento de Hochberg) y respuesta aumentada a la semana 6 (%) en la población con fracaso de antagonista anti-TNF α .

Tabla 52: CDAI basal:

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

Tabla 53: Resultados del Estudio de Inducción: Criterios de Valoración Primarios y Secundarios Clave

Criterios de Valoración	ITT de TNF (N=315)				ITT Total (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	Dif (RR)	Valor de P	PLA N=207	VDZ N=209	Dif (RR)	Valor de 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 Sostenida	8,3 %	12,0 %	3,7 %	0,2755	8,2 %	15,3 %	7%	0,0249

(Sem. 6 y 10)			(1,4)			(1,9)
Respuesta Aumentada (CDAI100)	22,3 %	39,2 %	16,9% (1,8)	0,0011		

Tabla 54: Resultados en Pacientes Sin Tratamiento Previo con Antagonista Anti-TNF- α (n=101, 24% del total)

	Placebo, %	Vedolizumab, %	Diferencia, %	IC de 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 55: Resultados del Estudio: Remisión Clínica en las Semanas 6 y 10, Subgrupo Clave—Fracasos Previos de Tratamiento, ITT Total

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

El estudio demostró que los pacientes con fracaso del antagonista de TNF- α requerían 3 dosis para inducir la remisión. Las tasas de remisión en los pacientes con fracaso de antagonista de TNF- α aumentaron entre la semana 6 y la semana 10, pero solo para el grupo de vedolizumab (no placebo). Las tasas de remisión para los pacientes no sometidos previamente al antagonista de TNF- α no aumentaron sustancialmente entre las semanas 6 y 10. De la población con fracaso del antagonista de TNF- α con un alto grado de gravedad de la enfermedad, el 43% nunca respondió a un antagonista de TNF- α , y el 45% perdió la respuesta.

Ejemplo 20: estabilidad

Se ensayaron diversas formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ diferentes para determinar su estabilidad a lo largo del transcurso de 6 a 24 meses a 5°C (Tablas 6 y 7). Las formulaciones que tenían un pH de 6,0-6,2 mostraban aproximadamente menos del 4% de degradación de especies principales después de 6 meses y a los 24 meses.

Se ensayaron diversas formulaciones de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ diferentes para determinar su estabilidad por SEC durante hasta 24 meses (Tablas 4 y 5). Las formulaciones con concentración de proteína 60 mg/ml y que contenían citrato 25 mM tenían un cambio en agregados del 0,1-0,2% después de 2 años, mientras que las formulaciones que contenían proteína 160 mg/ml y citrato 25 mM tenían un aumento de agregados de aproximadamente el 0,3% a lo largo de 2 años. Había un aumento de agregados del 0,6-1,1% para las formulaciones que contenían 60, 110 o 160 mg/ml de proteína sin citrato. Para las formulaciones ensayadas que contenían citrato, pero no histidina, después de 12 meses y 24 meses, había un crecimiento de aproximadamente el 0,3-0,4% de los agregados.

Ejemplo 21: Determinación del efecto de vedolizumab sobre la proporción CD4:CD8

Se trataron sujetos sanos de 18 - 45 de edad con una dosis única de 450 mg de vedolizumab reconstituida a partir de una formulación liofilizada de sacarosa al 10% y diluida en un sistema de infusión de solución salina al 0,9%. Se extrajo líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante punción lumbar antes (línea base) y 5 semanas tras la dosis única de 450 mg de vedolizumab. Cada sujeto sirvió como su propio control.

Se seleccionó un periodo de 5 semanas basándose en un estudio previo que mostraba que pacientes con EM tratados con natalizumab demostraron efectos sobre la proporción de linfocitos CD4+:CD8+ en LCR y una reducción del número de lesiones cerebrales tras sólo una 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 estimados en estado estacionario asociados con el régimen de dosis de fase 3 de 300 mg cada 4 semanas.

Se obtuvieron aproximadamente 15 ml de LCR de cada sujeto para el inmunofenotipado. Se incluyeron las muestras de LCR para análisis si cumplían los siguientes criterios: ≤ 10 RBC/ μ l por muestra (para minimizar la contaminación en sangre periférica); resultado negativo de cultivo de LCR; número de linfocitos T adecuado en cada muestra de citometría de flujo; y ninguna detección de anticuerpos en suero frente a vedolizumab.

Las concentraciones de vedolizumab en suero medias en la semana 5 (34,80 μ g/ml) y las concentraciones de

vedolizumab en suero del sujeto individual (intervalo 24,9–47,9 µg/ml) fueron superiores que la concentración valle en estado estacionario planeada (~24 µg/ml) para el régimen de dosis de fase 3. Se observó un alto grado (>90%) de saturación del receptor $\alpha 4\beta 7$ en la semana 5 tal como se midió mediante MAdCAM-1-Fc, que indica la saturación de vedolizumab de su diana en el momento de la evaluación del criterio de valoración.

No se detectó vedolizumab en ninguna de las muestras de LCR (límite de detección = 0,125 µg/ml).

Efecto sobre la proporción y números de linfocitos T CD4+ y CD8+

Vedolizumab no redujo significativamente la proporción de CD4+:CD8+ (Tabla 56). Ninguno de los sujetos tenía una proporción de CD4+:CD8+ tras la dosis <1 ($p < 0,0001$ (prueba de t unilateral)). Vedolizumab no redujo significativamente el número de linfocitos T CD4+ o CD8+ en LCR. Además, no hubo cambios significativos en el % de linfocitos T CD4+ y el % de linfocitos T CD8+ en LCR (Tabla 57). Además, no se observaron cambios significativos en linfocitos T de memoria CD4+, CD8+ y WBC en sangre periférica (Tabla 58).

Tabla 56: Efecto del tratamiento sobre la proporción de CD4+:CD8+ en LCR (población evaluable, n=13)

	Línea base	Semana 5	Diferencia de proporción CD4+:CD8+ [†]
Intervalo de proporción CD4+:CD8+ media (DE)	3,59 (0,273) 1,53-5,67	3,60 (0,265)* 1,42-5,15	0,01 (0,197)
IC bilateral al 90% para proporción	3,00-4,19	3,132, 4,077	
IC bilateral al 90% para diferencia			-0,337, 0,363
IC= intervalo de confianza * $p < 0,0001$ (prueba de t de una muestra unilateral para $H_0: \mu < 1$ contra $H_1: \mu \geq 1$). †Diferencia se define como la proporción a la semana 5 menos la en la línea base			

Tabla 57: Efecto de tratamiento sobre el recuento de linfocitos CD4+ y CD8+ en LCR (población evaluable, n=13)

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

Tabla 58: Recuentos de linfocitos T de memoria en sangre periférica (RO+) (población evaluable, n=13)

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

Resumen

Vedolizumab no afectó a los recuentos de células CD4+ y CD8+ ni a la proporción de CD4+:CD8+ en LCR en voluntarios sanos tras una dosis única de 450 mg. Ninguno de los sujetos tuvo una reducción de la proporción de CD4+:CD8+ en LCR después de la dosis inferior a 1. Vedolizumab no se detectó en LCR. Además, no se observó ningún cambio en los WBC totales o subconjuntos CD4+ y CD8+ de linfocitos T de memoria en sangre periférica. La saturación de la diana ($\alpha 4\beta 7$) en sangre se produjo en todos los sujetos en el momento de la evaluación del criterio de evaluación. La proporción y los niveles de linfocitos CD4+ y CD8+ en LCR fueron similares a los reportados previamente en la bibliografía.

Estos resultados concuerdan con la falta de efecto de vedolizumab sobre tanto la vigilancia inmunitaria del SNC fisiológica como la inflamación del SNC patológica de monos.

Tabla 59: Secuencias

SEQ ID NO:	Secuencia mostrada	Descripción
1	FIG. 1	ADN que codifica la cadena pesada de la inmunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizada
2	FIG. 1	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la inmunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizada
3	FIG. 2	ADN que codifica la cadena ligera de la inmunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ humanizada
4	FIG. 2	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la inmunoglobulina anti- $\alpha 4\beta 7$ 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 31 SYWMH	CDR1 de cadena pesada de anticuerpo ACT-1 de ratón
9	Mencionada en la página 31 EIDPSESNTNYNQKFKG	CDR2 de cadena pesada de anticuerpo ACT-1 de ratón
10	Mencionada en la página 31 GGYDGWDYIDY	CDR3 de cadena pesada de anticuerpo ACT-1 de ratón
11	Mencionada en la página 31 RSSQSLAKSYGNTYLS	CDR1 de cadena ligera de anticuerpo ACT-1 de ratón
12	Mencionada en la página 31 GISNRFS	CDR2 de cadena ligera de anticuerpo ACT-1 de ratón
13	Mencionada en la página 31 LQGTHQPYT	CDR3 de cadena ligera de anticuerpo ACT-1 de ratón
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

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC.
 <120> FORMULACIÓN PARA ANTICUERPO ANTI-ALFA-4-BETA-7
 <130> 079259-0603
 <140>
 <141>
 <150> 61/544.054
 <151> 06-10-2011
 <150> 61/481.522
 <151> 02-05-2011
 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 1445
 <212> adn
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 1

ES 2 646 717 T3

```

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa      60
cagctacagg tgtccactcc caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc      120
ctggggcttc agtgaagggtg tcctgcaagg gttctggcta caccttcacc agctactgga      180
tgcattgggt gaggcaggcg cctggccaac gtctagagtg gatcggagag attgatcctt      240
ctgagagtaa taactaactac aatcaaaaat tcaagggacg cgtcacattg actgtagaca      300
tttccgctag cacagcctac atggagctct ccagcctgag atctgaggac actgcggtct      360
actattgtgc aagaggggggt tacgacggat gggactatgc tattgactac tgggggtcaag      420
gcaccctggg caccgtcagc tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc ccctggcac      480
cctcctccaa gagcacctct gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact      540
tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct      600
tccccgctgt cctacagtc tcaggactct actcctcag cagcgtgggt accgtgccct      660
ccagcagctt gggcaccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca      720
aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccacgtgcc      780
cagcacctga actcgcgggg gcacgcctcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca      840
ccctcatgat ctcccgacc cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag      900

accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa      960
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc      1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag      1080
cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca      1140
ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca      1200
aaggcttcta tcccagcgac atcgcctgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca      1260
actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc      1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg      1380
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaataatcta      1440
gagca      1445

```

<210> 2

<211> 470

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

ES 2 646 717 T3

<400> 2

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	

ES 2 646 717 T3

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

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

ES 2 646 717 T3

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

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

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 3

ES 2 646 717 T3

```

gaattctcga gatcgatctc accatgggat ggagctgtat catcctcttc ttggtagcaa      60
cagctacagg tgtccactcc gatgtagtga tgactcaaag tccactctcc ctgcctgtca      120
cccctggaga accagcttct atctcttgca ggtctagtca gagtcttgca aagagttatg      180
ggaacaccta tttgtcttgg tacctgcaga agcctggcca gtctccacag ctctcatct      240
atgggatttc caacagattt tctggggtgc cagacagggt cagtggcagt ggttcaggga      300
cagatttcac actcaagatc tcgcgagtag aggctgagga cgtgggagtg tattactgct      360
tacaaggtag acatcagccg tacacgttcg gacaggggac caaggtggag atcaagcgta      420
cggtggtctg accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa      480
ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga      540
aggtggataa cgccctocaa tcgggtaact ccagaggagag tgtcacagag caggacagca      600
aggacagcac ctacagcctc agcagcacc cagaccctgag caaagcagac tacgagaaac      660
acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct      720
tcaacagggg agagtgttag tctagagcag c                                     751

```

<210> 4

<211> 238

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

10 <400> 4

ES 2 646 717 T3

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

<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

ES 2 646 717 T3

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

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

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 646 717 T3

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

5

ES 2 646 717 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
5 <213> Mus sp.
<400> 8

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 9
<211> 17
10 <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
15 <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
20 <211> 16
<212> PRT
<213> Mus sp.
<400> 11

ES 2 646 717 T3

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
 <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 2 646 717 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									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica líquida estable que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, y al menos un aminoácido libre, en la que el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) que comprende SEQ ID NO: 11, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 12, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13, y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10.
- 10 2. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 1, en la que la proporción molar del anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ respecto al citrato de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:100.
- 15 3. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho aminoácido libre se selecciona del grupo que consiste en histidina, alanina, arginina, glicina, ácido glutámico y combinaciones de los mismos.
- 20 4. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende además un tensioactivo.
- 25 5. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 4, en la que la proporción molar del citrato respecto al tensioactivo es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 156:1.
6. La formulación líquida estable de la reivindicación 4 o 5, en la que el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, un poloxámero y combinaciones de los mismos.
7. La formulación líquida estable de la reivindicación 6, en la que el tensioactivo es polisorbato 80 y la concentración de polisorbato 80 es de 0,01% a 0,5%.
- 30 8. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la concentración de citrato es de 5 mM a 50 mM.
- 35 9. Una formulación farmacéutica líquida estable que comprende al menos aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un antioxidante o quelante, y al menos un aminoácido libre, en la que el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) que comprende SEQ ID NO: 11, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 12, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13, y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10.
- 40 10. Una formulación farmacéutica líquida estable que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, un antioxidante o quelante, y al menos un aminoácido libre, en la que el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) que comprende SEQ ID NO: 11, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 12, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13, y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10, y en la que la formulación tiene un pH de 6,1 a 7,0.
- 45 11. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 9 o 10, que comprende de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$.
- 50 12. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 9 o 10, en la que el antioxidante o quelante es citrato o EDTA.
- 55 13. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 12, en la que el antioxidante o quelante es citrato.
14. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 13, en la que la concentración de citrato es de 5 mM a 50 mM.
- 60 15. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 9-15, que comprende además un tensioactivo.
16. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 15, en la que la proporción molar de tensioactivo:anticuerpo es de aproximadamente 0,7:1 a aproximadamente 2,0:1.

17. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 15, en la que la proporción molar de antioxidante o quelante respecto al tensioactivo es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 156:1.
18. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 15, en la que el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, un poloxámero y combinaciones de los mismos.
19. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 18, en la que el tensioactivo es polisorbato 80 y la concentración de polisorbato 80 es de 0,01% a 0,5%.
20. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 9 o 10, que comprende un anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$, citrato, histidina, arginina, y polisorbato 80, en la que el anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ comprende una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) que comprende SEQ ID NO: 11, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 12, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13, y comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 que comprende SEQ ID NO: 8, una CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9, y una CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10.
21. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 20, en la que la concentración de anticuerpo anti- $\alpha 4\beta 7$ es al menos aproximadamente 140 mg/ml.
22. La formulación farmacéutica líquida estable de la reivindicación 20 o 21, en la que la concentración de histidina es de 10 mM a 75 mM.
23. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en la que la concentración de arginina es de 50 mM a 150 mM.
24. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en la que la concentración de citrato es de 5 mM a 50 mM.
25. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en la que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende los aminoácidos 20-140 de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 20-131 de SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos 21-132 de SEQ ID NO: 5.
26. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones previas, en la que dicho anticuerpo es vedolizumab.
27. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente, una formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26, e instrucciones para su uso.
28. El artículo de la reivindicación 27, en el que dicha formulación farmacéutica líquida estable comprende 108 mg de anticuerpo.
29. El artículo de la reivindicación 27, en el que el artículo es una jeringa precargada.
30. La formulación farmacéutica líquida estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-26 o el artículo de fabricación de una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29 para uso en el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino.
31. La formulación farmacéutica líquida estable o el artículo de fabricación de la reivindicación 30, en el que la enfermedad inflamatoria del intestino es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

FIG. 1A

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

gaattctcgagatcgatCTCACCatgggatggagctgtatcctctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCCTGCAAGGGTTCTGGCTACACCTTCACCAGTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGCGCTGGCCAACGTCTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAACTACAATCAAAATTCAGGGACGCGTCACATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGTCAAGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA
CGGTGTCGTGGAACCTCAGCGGCCCTGACCAGCGGGTGCACACCTTCCCGGC
TGTCCACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAATCTTGTGACAAACTCAC
ACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCGCGGGGCACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCCCTCACCGTCTCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC

AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
 AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACACAGGTGTACACCT
 GCCCCATCCCGGATGAGTGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGC
 AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTC
 CTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAtaatctagaca

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

MGWSCIILFLVATATGVHS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKGSGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGIDP
SESNTNYNQKF^KGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGDWDY
AIDYWGQGTLTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGK

FIG. 1B

FIG. 2

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

```

gaattcgcgagtcgatCTCACCatggatggagctgtatcctctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgat
GTAGTGATGACTCAAGTCCACTCTCCCTGCCCTGCTCAGCCCTGGAGAACCCAGC
TTCTATCTCTTGAGGTCTAGTCAGAGTCTTGCAAGAGTTATGGGAACACCT
ATTTGTCTTGGTACCTGCAGAGCCTGGCCAGTCTCCACAGCTCCTCATCTAT
GGGATTTCCAACAGATTCTCTGGGTGCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGTT
CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCTCGCGAGTAGAGGCTGAGGACGTGGG
AGTGTAATTACTGCTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACGTTTCGGACAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCCTCTGTGTGTGCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCT
CCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAA
CACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTtagctagagcagc

```

Nuevo proteína de ligera de LDP02 (espacio entre VKL, VK y C Kappa humana)

```

MGWSCIILFLVATATGVHS
DVVMTQSP1SLPVT2PGEPASISCRSSQSLAKSYGNTYLSWY3LQKPGQSPQLLIYGI
SNRFSGVPDRFSGSGGTDF4TLKISRVEAEDVGVY5Y6CLQGTHQPYTFGQGT7KVEI
K
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV8VCLLN9NFY10PREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSK11DSTYSL12STLTLSKADY13EKHKVYACEVTHQGLSSPVT14KSFNRGEC

```

FIG. 3

Comparación por pares nuevoMLN02-no sig		LDP-02-no sig.txt	
A	1	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
B	1	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLAKSYGNTYLSWYLQKPGQSPQ	50
	51	LLIYGISNRFGVDPDRFSGSGGTFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTQHP	100
	51	LLIYGISNRFGVDPDRFSGSGGTFTLKISRVEAEDVGVYYCLQGTQHP	100
	101	YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	101	YTFGQGTKVEIKRADAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK	150
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	151	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE	200
	201	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219
	201	VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	219

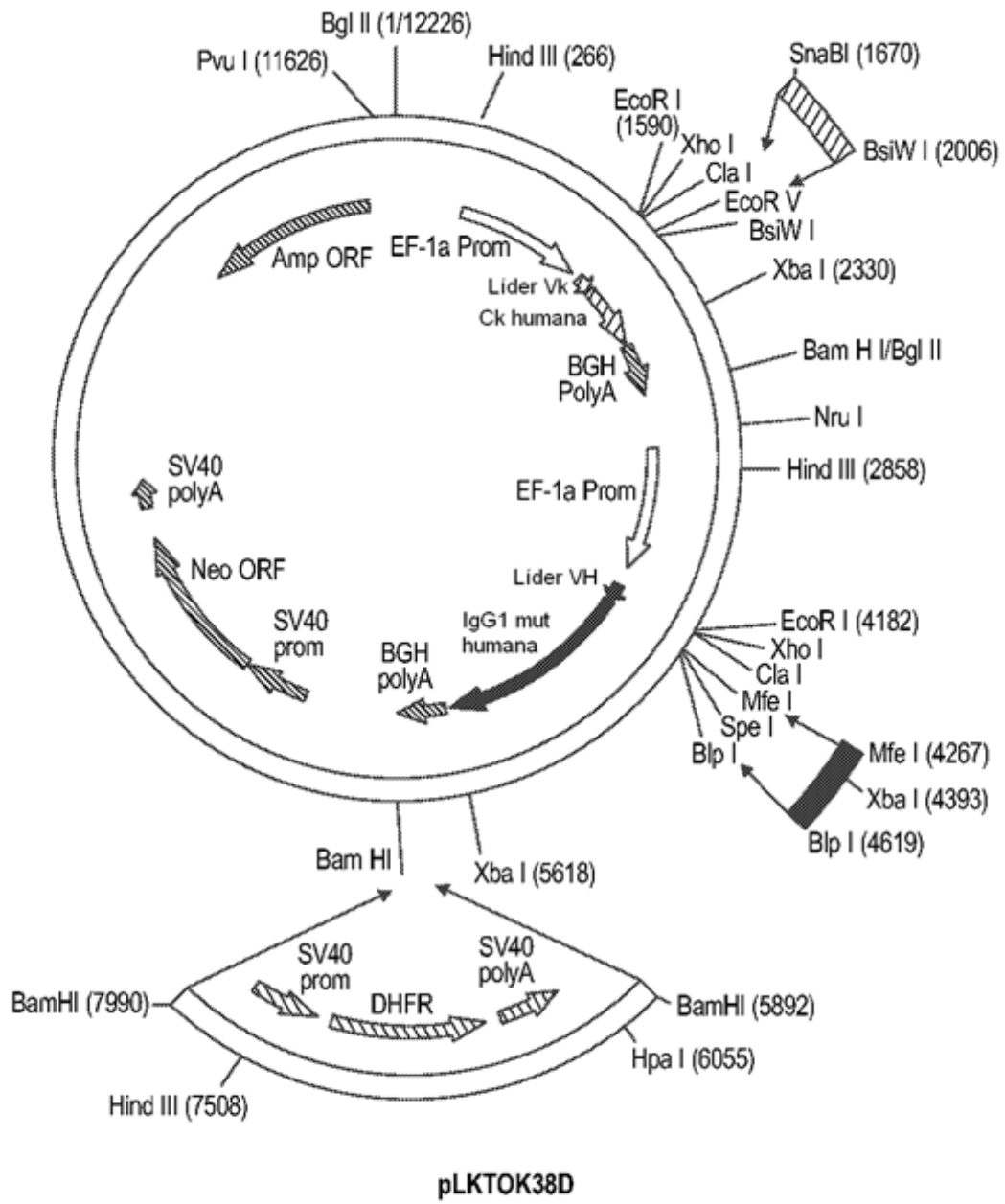


FIG. 5

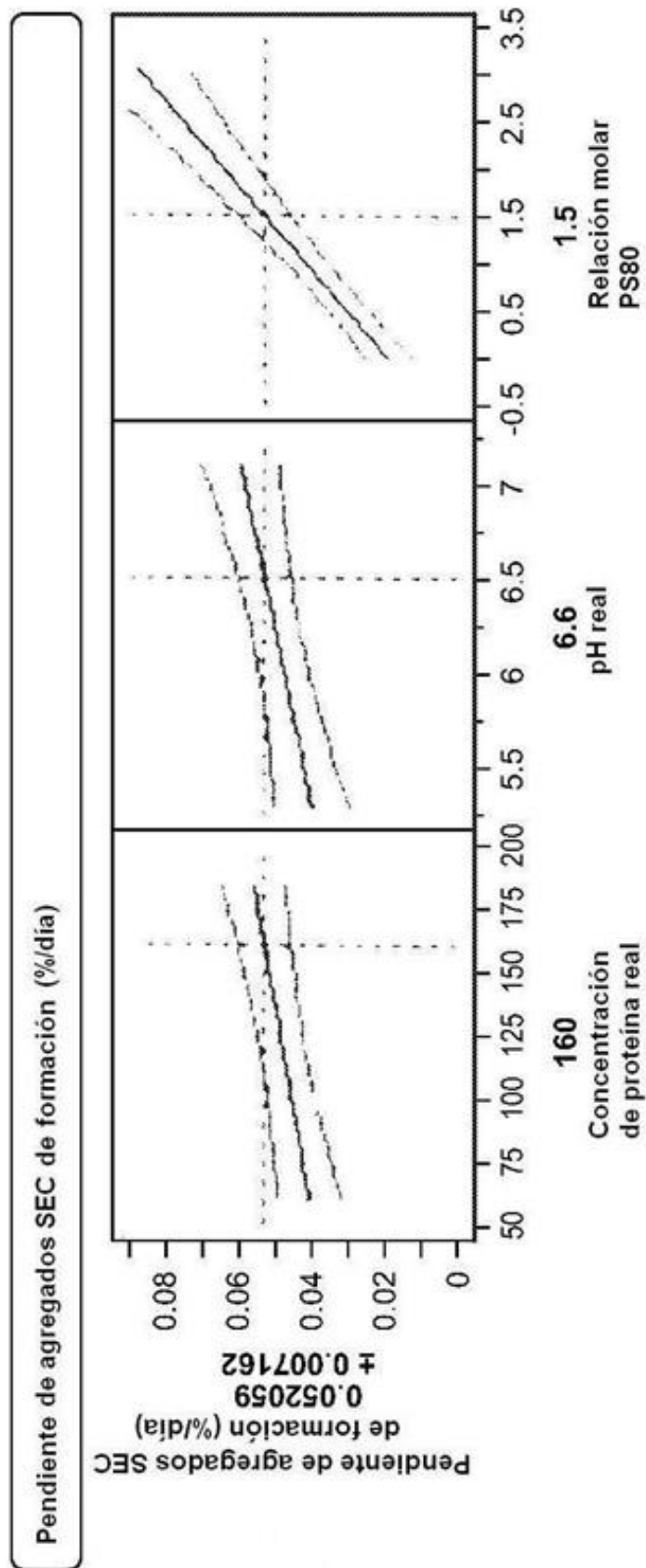


FIG. 6

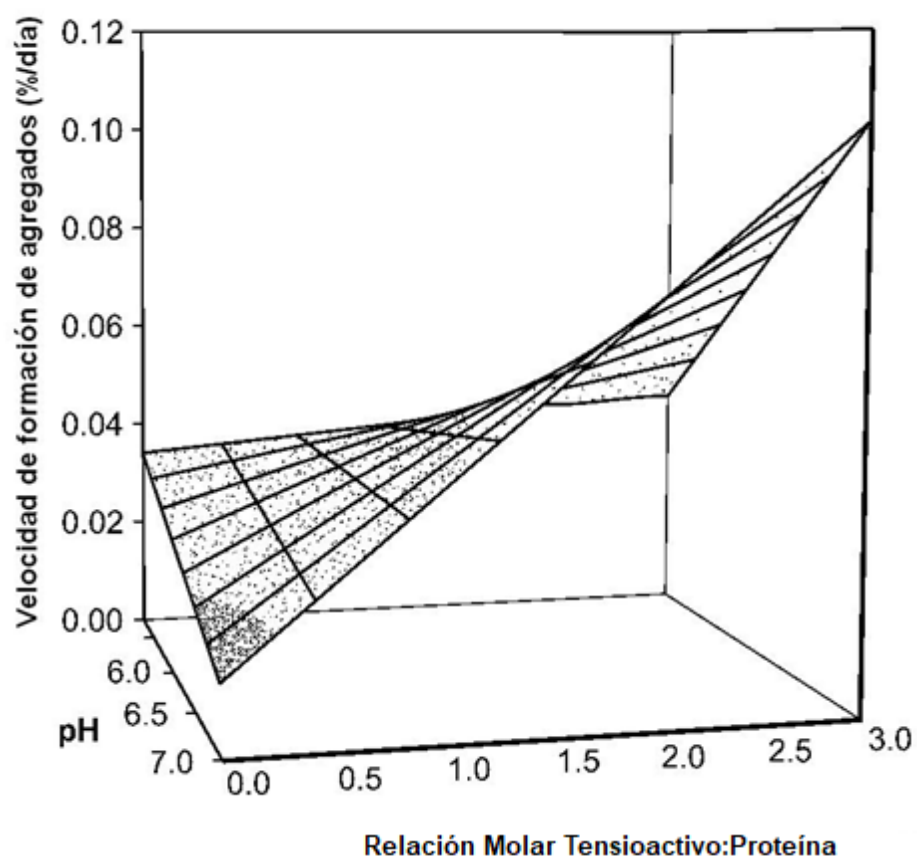


FIG. 7

FIG. 8

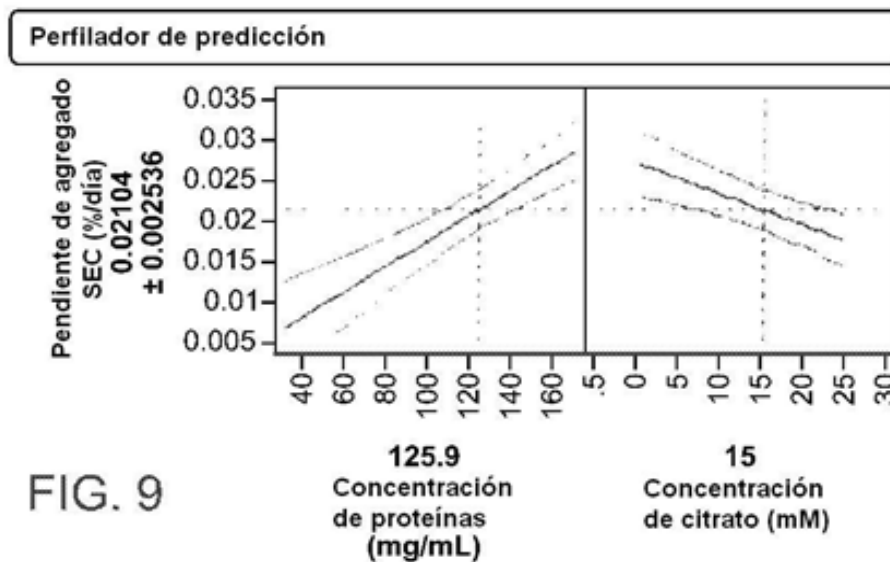
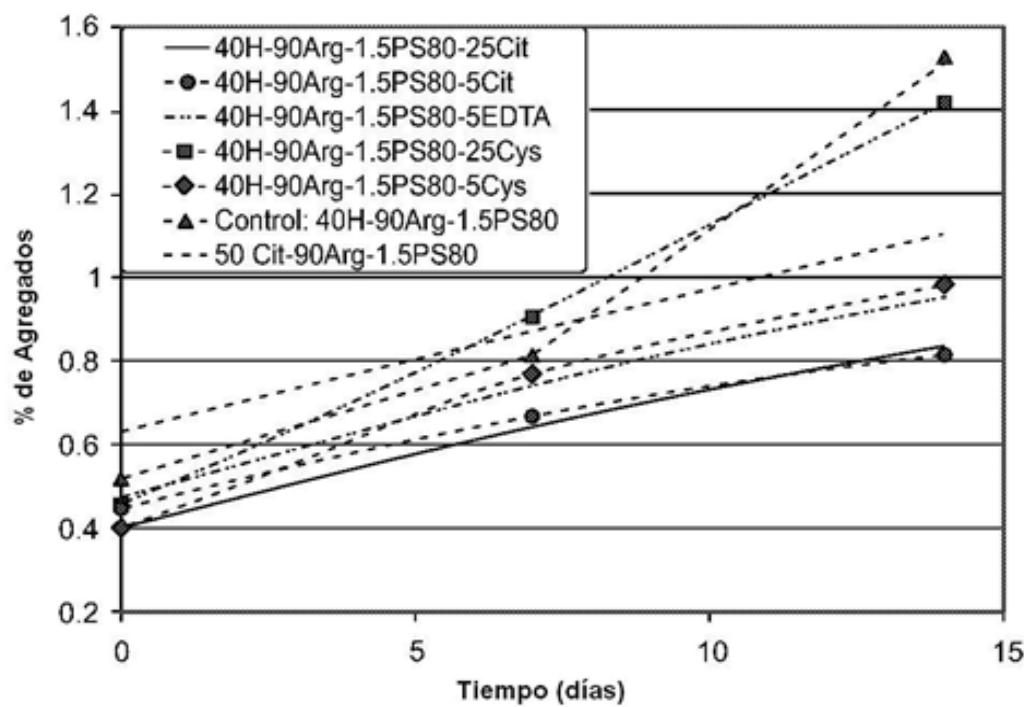


FIG. 9

FIG. 10

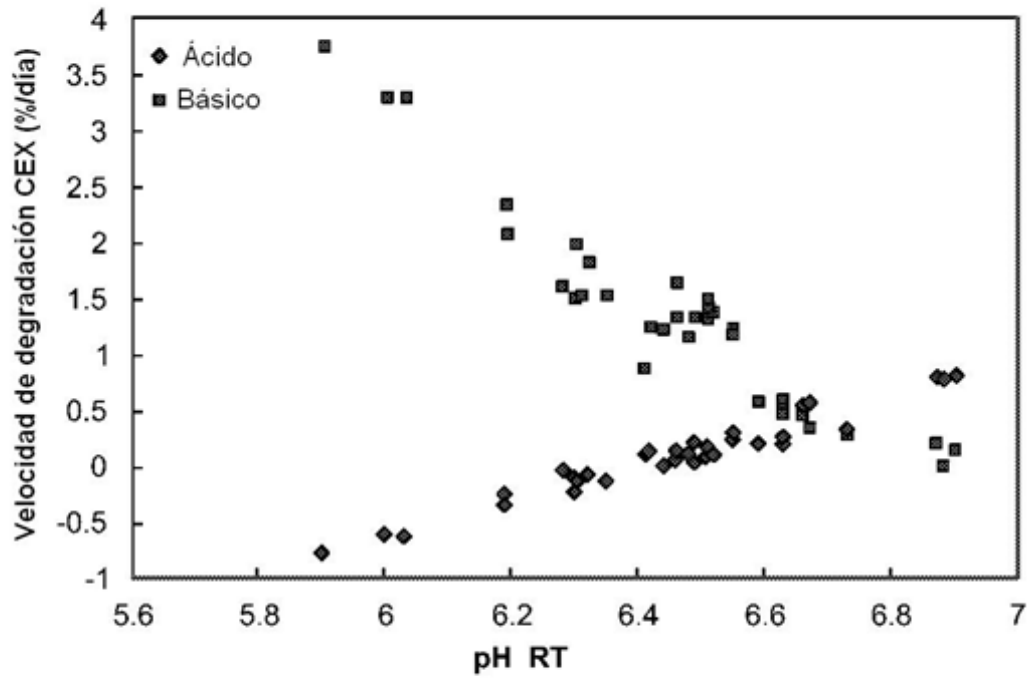


FIG. 11

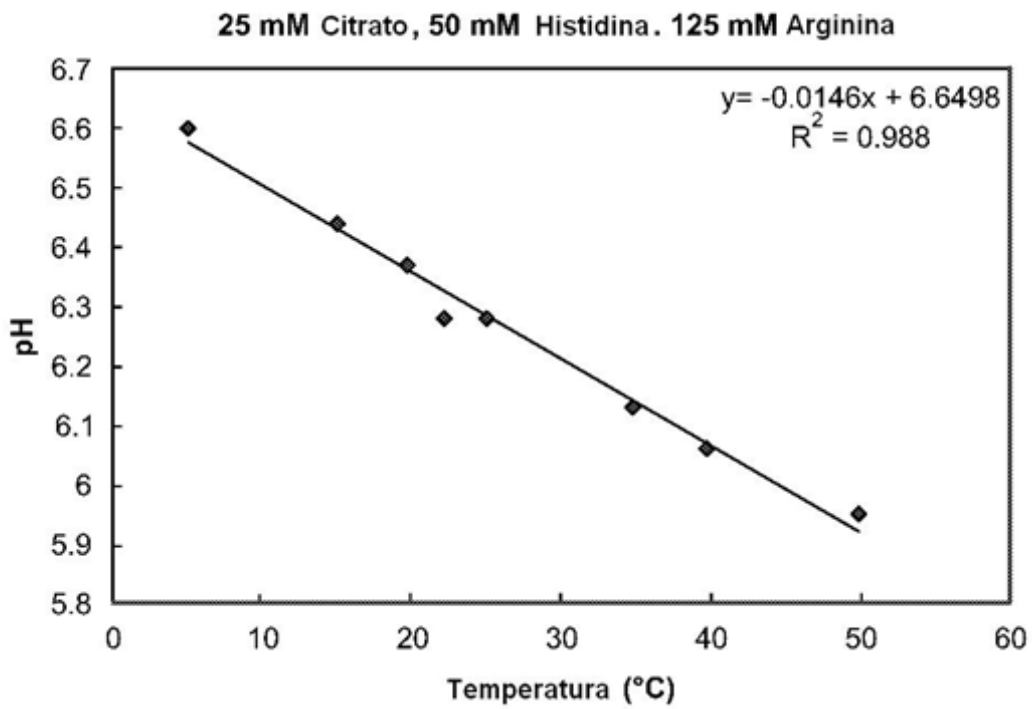


FIG. 12

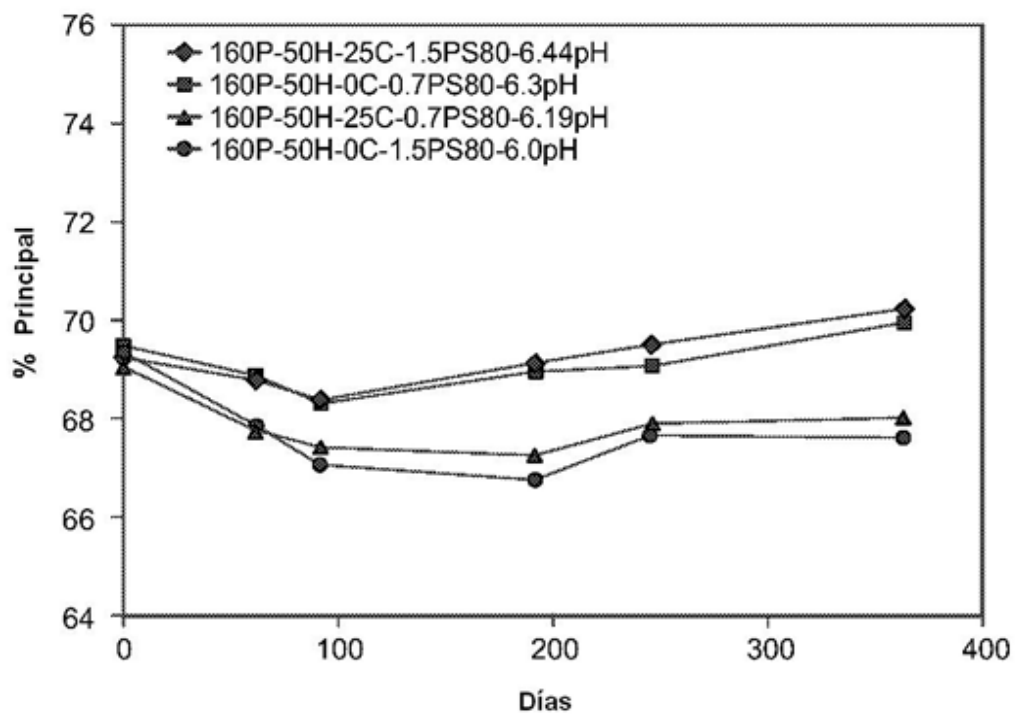


FIG. 13

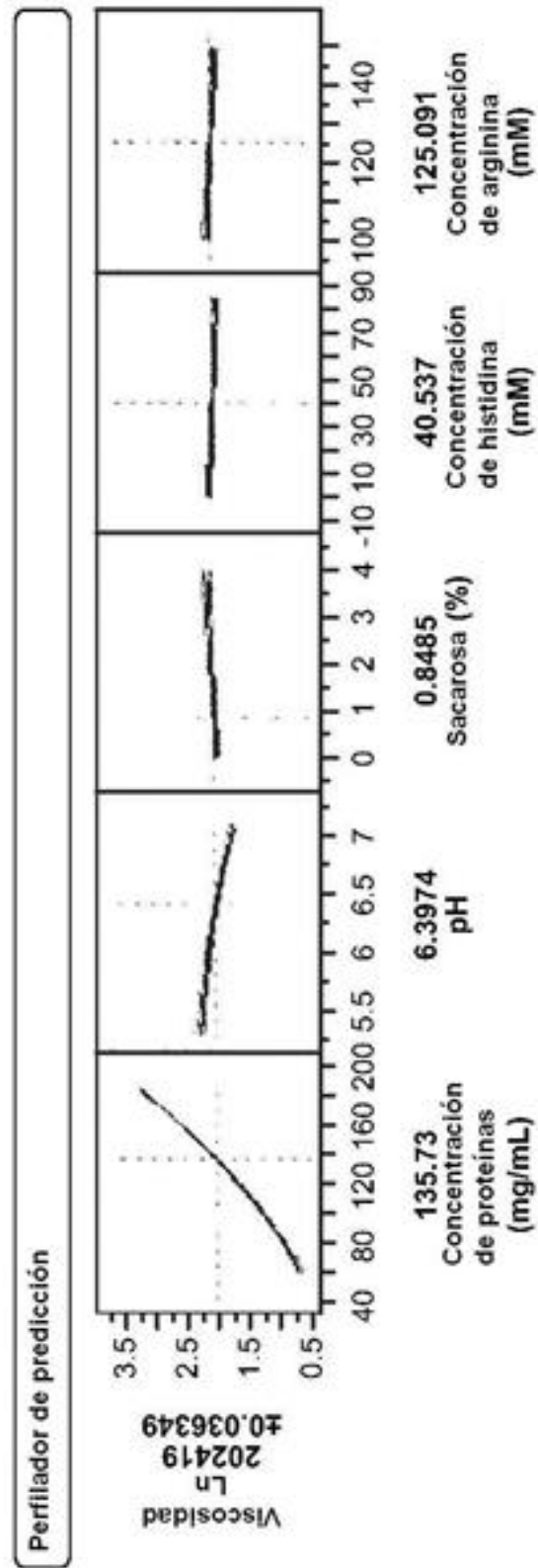


FIG. 14A

**Región variable de la cadena ligera
kappa del anticuerpo GM607'CI**

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 la cadena
pesada del 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. 14B

FIG. 15

Componentes de un producto proteico en una jeringa precargada

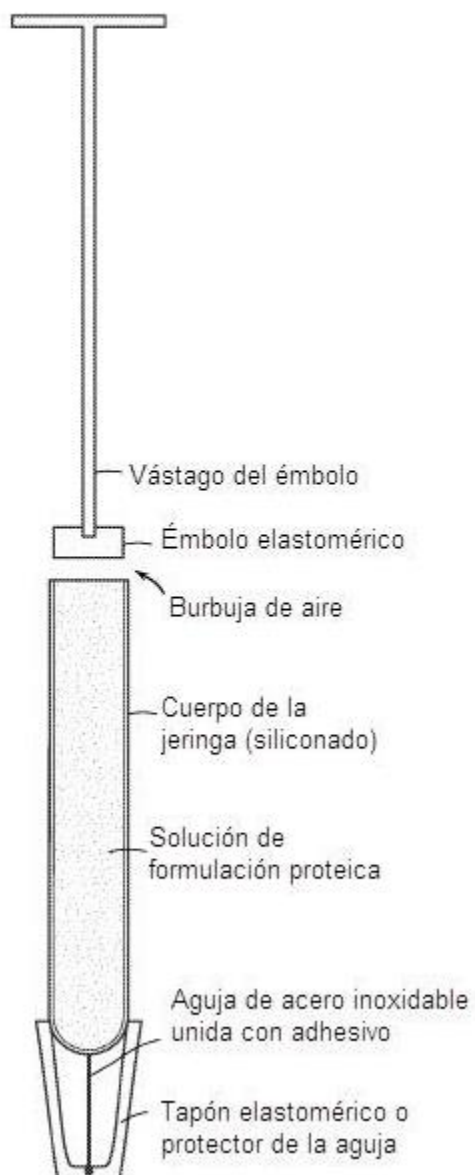


FIG. 16

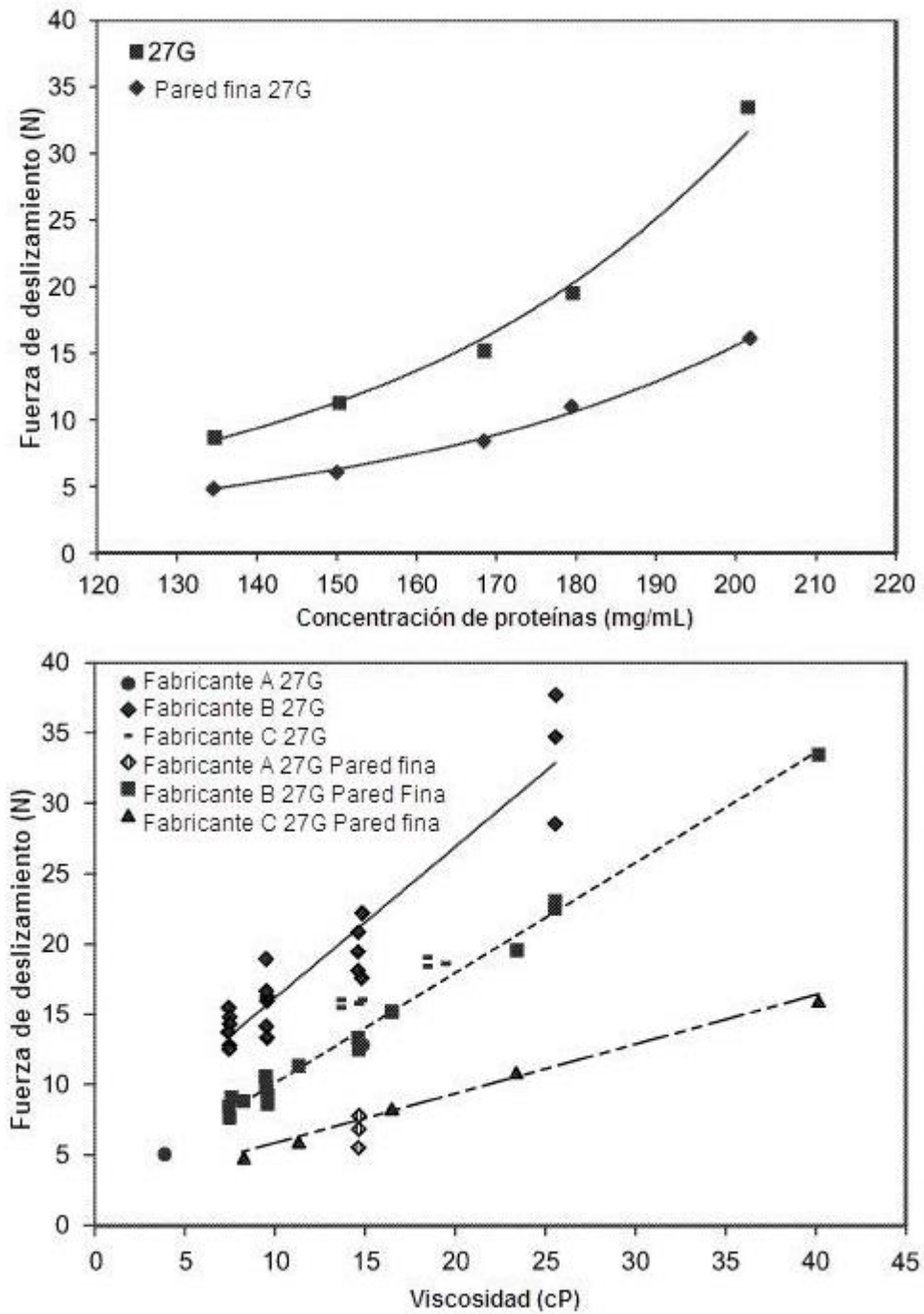


FIG. 17A

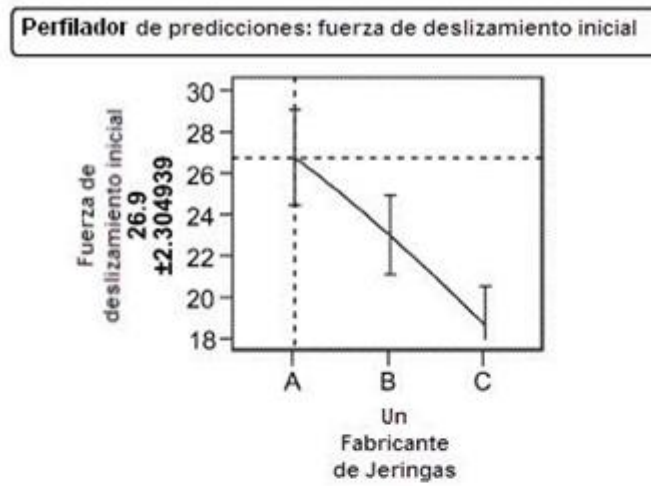


FIG. 17B

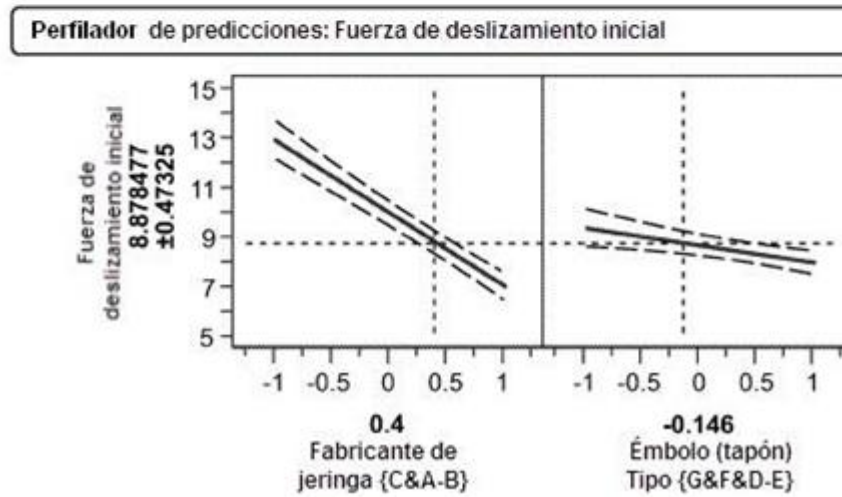


FIG. 18

