

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034583**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.21

(21) Номер заявки
201892377

(22) Дата подачи заявки
2012.05.02

(51) Int. Cl. *A61P 1/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЯ АНТИ- α 4 β 7 АНТИТЕЛА

(31) 61/481,533; 61/550,545; 61/585,859

(32) 2011.05.02; 2011.10.24; 2012.01.12

(33) US

(43) 2019.03.29

(62) 201391614; 2012.05.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МИЛЛЕННИУМ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Дилузио Уиллоу, Труонг Нобель Т.,
Варга Ксанад М., Паланиаппан
Ваитхианатхан, Браун Джейсон, Фокс
Ирвинг Х., Сколз Кэтрин (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) CLELAND J.L. ET AL.: "A SPECIFIC MOLAR RATIO OF STABILIZER TO PROTEIN IS REQUIRED FOR STORAGE STABILITY OF A LYOPHILIZED MONOCLONAL ANTIBODY", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 90, no. 3, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 310-321, XP001179875, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/1520-6017(200103)90:3<310::AID-JPS 6>3.0.CO; 2-R, abstract, page 313, column 1, paragraph 1; figures 1-4; tables 1, 2
WO-A2-0178779
US-A1-2007122404
WO-A2-9806248

(57) Изобретение относится к применению анти- α 4 β 7 антитела для лечения болезни Крона и язвенного колита путем внутривенного введения при безопасном режиме дозирования.

B1

034583

034583

B1

Родственные заявки

Данная заявка претендует на преимущества временной заявки США 61/585859, поданной 12 января 2012 г., временной заявки США 61/550545, поданной 24 октября 2011 г., и временной заявки США 61/481533, поданной 2 мая 2011 г. Содержание вышеуказанных заявок настоящим включены сюда в качестве ссылок.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в ASCII-формате через систему EFS-Web и настоящим целиком включен в настоящий документ в качестве ссылки. Указанный ASCII-документ, созданный 30 апреля 2012 г., имеет название 92596615.txt и размер 17024 байт.

Известный уровень техники

Прогресс в биотехнологии создал возможности получения различных белков, предназначенных для применения в фармацевтике, с использованием технологий рекомбинантных ДНК. Поскольку белки имеют большие размеры и более сложны, чем традиционные органические и неорганические лекарственные препараты (т.е. содержат многочисленные функциональные группы в дополнение к сложным трехмерным структурам), составление композиций таких белков связано с особыми проблемами. Для того чтобы белок оставался биологически активным, композиция должна сохранять конформационную целостность, по меньшей мере, коровой последовательности аминокислот белка, в то же самое время защищая многочисленные функциональные группы белка от деградации. Белки могут иметь недостаточную стабильность, и моноклональные и поликлональные антитела, в особенности, могут быть относительно нестабильными (см., например, Wang, et al., J. Pharm Sci. 96:1-26 (2007)). Имеется большое число вариантов составления композиций, и ни один из подходов или систем не является пригодным для всех белков. Было описано несколько факторов, которые необходимо учитывать (см., например, Wang et al.).

Стабильность белка может зависеть от многочисленных характеристик. Фактически, даже в случае очищенных антител, структуры антител могут быть гетерогенными, что дополнительно усложняет составление композиций таких систем. Кроме того, эксципиенты, включаемые в состав композиций антител, предпочтительно минимизируют любой потенциальный иммунный ответ.

В случае антител сохранение конформационной целостности является еще более важным. Пути деградации белков могут быть связаны с химической нестабильностью (т.е. с любым процессом, включающим модификацию белка путем образования или разрыва связи, приводящего к новой химической сущности) или физической нестабильностью (т.е. изменениями структуры белка более высокого порядка). Химическая нестабильность проявляется, например, в деамидировании, изомеризации, гидролизе, окислении, фрагментации, бета-элиминировании гликана или дисульфидном обмене. Физическая нестабильность может быть вызвана, например, денатурацией, агрегированием, преципитацией или адсорбцией. Четырьмя наиболее распространенными путями деградации белка являются фрагментация, агрегирование, деамидирование и окисление белка. Последствия химической или физической нестабильности терапевтического белка включают уменьшение эффективной введенной дозы, снижение безопасности терапии вследствие, например, облучения или иммунологической реактивности, и большая частота производства из-за короткого срока хранения.

Сушка вымораживанием является методикой, обычно используемой для консервации белков; сушка вымораживанием предназначена для удаления воды из белковых препаратов, представляющих интерес. Сушка вымораживанием или лиофилизация представляет собой процесс, в котором материал, который необходимо высушить, сначала замораживают, а затем лед или замороженный растворитель удаляют путем сублимации под вакуумом. Эксципиенты могут быть включены в композицию перед лиофилизацией для стабилизации белков в процессе лиофилизации и/или для улучшения стабильности композиций лиофилизированных белков (Pikal M., Biopharm. 3(9)26-30 (1990) и Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)).

Несколько публикаций раскрывают в общем различные способы лечения воспалительных болезней кишечника и предусматривают схемы дозирования для введения агентов, предназначенных для лечения воспалительной болезни кишечника. Например, WO 96/24673 раскрывает мукозальные сосудистые адресины и лечение заболеваний, ассоциированных с рекрутментом лейкоцитов в желудочно-кишечный тракт в результате связывания лейкоцитов с клетками, экспрессирующими MAdCAM. US 2005/0095238 описывает способы лечения болезни, ассоциированной с инфильтрацией лейкоцитов в мукозальную ткань, и введение человеку эффективного количества человеческого или гуманизированного иммуноглобулина или антигенсвязывающего фрагмента, обладающего специфичностью связывания с интегрином $\alpha 4\beta 7$. US 2005/0095238 дополнительно описывает различные дозы (например, 0,15, примерно 0,5, примерно 1,0, примерно 1,5 или примерно 2,0 мг иммуноглобулина или фрагмента на 1 кг веса тела) и различные интервалы между дозами (7, 14, 21, 28 или 30 дней). Однако вышеуказанные патенты и публикации не раскрывают конкретные композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела или конкретные дозы и режимы дозирования, описанные и заявляемые в данном документе. Важно отметить, что вышеуказанные патенты не раскрывают композиции, дозы и режимы дозирования, обеспечивающие способы лечения (подтвержденные данными клинических испытаний), описанные и заявляемые в данном документе.

Композиции антител по настоящему изобретению могут быть полезны для ингибирования связывания лейкоцитов с клетками, экспрессирующими MAdCAM, и тем самым способствовать лечению воспалительной болезни кишечника у пациентов. Соответственно существует насущная потребность в определении пригодных дозировок и режимов дозирования таких соединений и в разработке композиций, предпочтительно композиций для внутривенного введения, позволяющих обеспечить стабильные, терапевтически эффективные уровни в крови композиций антител на протяжении длительного периода времени, в стабильной и удобной форме.

Сущность изобретения

Изобретение относится к идентификации невосстанавливающего сахара и по меньшей мере одной аминокислоты в качестве пригодных эксципиентов для составления композиций анти- $\alpha 4\beta 7$ антител, нестабильность которых делает их восприимчивыми к деамидированию, окислению, изомеризации и/или агрегированию. Композиция улучшает стабильность, уменьшает образование агрегатов и замедляет дегградацию антитела, входящего в ее состав.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к стабильной композиции, содержащей смесь невосстанавливающего сахара, анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела и по меньшей мере одной свободной аминокислоты, причем молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1. Композиция может быть жидкой композицией или сухой композицией (например, лиофилизированной). Композиция может также содержать буферный агент. В некоторых вариантах исполнения невосстанавливающий сахар представляет собой маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах исполнения свободная аминокислота композиции представляет собой гистидин, аланин, аргинин, глицин, глутаминовую кислоту или любую их комбинацию. Композиция может включать от примерно 50 до примерно 175 мМ свободной аминокислоты. Композиция может включать от примерно 100 до примерно 175 мМ свободной аминокислоты. Молярное соотношение свободной аминокислоты к антителу может составлять по меньшей мере 250:1.

Композиция может также содержать поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер или любую их комбинацию.

В некоторых аспектах композиция может минимизировать иммуногенность анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Композиция, например, в высушенном состоянии, может быть стабильной в течение по меньшей мере трех месяцев при 40°C, 75% относительной влажности (RH).

В другом аспекте композиция является лиофилизированной и содержит по меньшей мере от примерно 5 до примерно 10% анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела перед лиофилизацией. Композиция может содержать по меньшей мере примерно 6% анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела перед лиофилизацией. Композиция может быть восстановлена из лиофилизированной композиции (например, восстановлена до стабильной жидкой композиции).

В другом аспекте изобретение относится к стабильной композиции, содержащей смесь невосстанавливающего сахара, анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела и по меньшей мере одной свободной аминокислоты, причем молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1 и соотношение свободной аминокислоты к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 250:1.

В другом аспекте изобретение относится к стабильной жидкой композиции, содержащей в водном растворе невосстанавливающий сахар, анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу и по меньшей мере одну свободную аминокислоту, где молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1. В еще одном аспекте изобретение касается жидкой композиции, содержащей по меньшей мере от примерно 40 до примерно 80 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, по меньшей мере примерно 50-175 мМ одной или нескольких аминокислот и от по меньшей мере примерно 6 до по меньшей мере примерно 10% (мас./об.) сахара. Жидкая композиция может также содержать буферный агент. В некоторых вариантах исполнения жидкая композиция также содержит хелатирующий агент, взаимодействующий с металлами. В некоторых вариантах исполнения жидкая композиция также содержит антиоксидант.

В другом аспекте изобретение относится к жидкой композиции, содержащей по меньшей мере примерно 60 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, по меньшей мере примерно 10% (мас./об.) невосстанавливающего сахара и по меньшей мере примерно 125 мМ одной или нескольких свободных аминокислот.

В другом аспекте изобретение относится к жидкой композиции, содержащей по меньшей мере примерно 60 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, по меньшей мере примерно 10% (мас./об.) невосстанавливающего сахара и по меньшей мере примерно 175 мМ одной или нескольких свободных аминокислот.

В еще одном аспекте изобретение также относится к сухой, например, лиофилизированной композиции, содержащей смесь невосстанавливающего сахара, анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, гистидина, аргинина и полисорбата 80, где композиция находится в твердой форме и молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1.

В еще одном аспекте изобретение относится к лиофилизированной композиции, содержащей смесь

невосстанавливающего сахара, анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, гистидина, аргинина и полисорбата 80. В этом аспекте молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1. Кроме того, молярное соотношение аргинина к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) в композиции имеет значение более 250:1.

В другом аспекте изобретение относится к способу изготовления композиции, описанной в настоящем изобретении, включающему поддержание температуры продукта ниже температуры коллапса при первичном высушивании. Способ может также включать стадию отжига.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего от воспалительной болезни кишечника, где способ включает стадию введения пациенту, страдающему от воспалительной болезни кишечника, гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента, обладающего специфичностью связывания с человеческим интегрином $\alpha 4\beta 7$, где гуманизированный иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающую область нечеловеческого происхождения и по меньшей мере часть антитела человеческого происхождения, причем гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в соответствии со следующим режимом дозирования: (а) начальная доза 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии; (б) с последующей второй дозой 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии примерно через две недели после начальной дозы; (с) с последующей третьей дозой 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии через примерно шесть недель после начальной дозы; (д) с последующей четвертой и последующими дозами 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии раз в четыре недели или раз в восемь недель после третьей последовательной дозы гуманизированного антитела при необходимости; где режим дозирования вызывает клинический ответ и/или клиническую ремиссию воспалительной болезни кишечника у пациента; и где дополнительно гуманизированный иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью связывания с комплексом $\alpha 4\beta 7$, причем антигенсвязывающая область содержит три гипервариабельных участка (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области легкой цепи и три гипервариабельных участка (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи аминокислотных последовательностей, указанных ниже: легкая цепь: CDR1 SEQ ID NO: 11, CDR2 SEQ ID NO: 12, CDR3 SEQ ID NO: 13; тяжелая цепь: CDR1 SEQ ID NO: 8, CDR2 SEQ ID NO: 9, CDR3 SEQ ID NO: 10.

В другом аспекте изобретение относится к режиму дозирования для терапевтического лечения воспалительной болезни кишечника, где режим дозирования включает стадию введения пациенту, страдающему от воспалительной болезни кишечника, гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента, обладающего специфичностью связывания с человеческим интегрином $\alpha 4\beta 7$, где гуманизированный иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающую область нечеловеческого происхождения и по меньшей мере часть антитела человеческого происхождения, причем гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент вводят пациенту в соответствии со следующим режимом дозирования: (а) начальная доза 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии; (б) с последующей второй дозой 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии через примерно две недели после начальной дозы; (с) с последующей третьей дозой 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии через примерно шесть недель после начальной дозы; (д) с последующей четвертой и последующими дозами 300 мг гуманизированного иммуноглобулина или его антигенсвязывающего фрагмента путем внутривенной инфузии раз в четыре недели или раз в восемь недель после третьей последовательной дозы гуманизированного антитела при необходимости; где режим дозирования вызывает клинический ответ и/или клиническую ремиссию воспалительной болезни кишечника у пациента; и где дополнительно гуманизированный иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент обладает специфичностью связывания с комплексом $\alpha 4\beta 7$, причем антигенсвязывающая область содержит три гипервариабельных участка (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области легкой цепи и три гипервариабельных участка (CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи аминокислотных последовательностей, указанных ниже: легкая цепь: CDR1 SEQ ID NO: 11, CDR2 SEQ ID NO: 12, CDR3 SEQ ID NO: 13; тяжелая цепь: CDR1 SEQ ID NO: 8, CDR2 SEQ ID NO: 9, CDR3 SEQ ID NO: 10.

В некоторых аспектах способ лечения композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, доза или режим дозирования могут минимизировать иммуногенность анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Пациент может демонстрировать отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или быть интолерантным к лечению по меньшей мере одним иммуномодулятором, антагонистом фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) или их комбинациями.

Воспалительной болезнью кишечника может быть болезнь Крона или неспецифический язвенный колит. Воспалительная болезнь кишечника может быть неспецифическим язвенным колитом от умерен-

ной до тяжелой степени активности.

Режим дозирования может приводить к заживлению слизистой у пациентов, страдающих от неспецифического язвенного колита от умеренной до тяжелой степени активности.

Пациент может ранее получать лечение воспалительной болезни кишечника по меньшей мере одним кортикостероидом. Режим дозирования может приводить к уменьшению, прекращению или уменьшению и прекращению применения кортикостероида пациентом.

В некоторых аспектах гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в готовой лекарственной форме при концентрации от примерно 1,0 до примерно 1,4 мг/мл. Гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент может быть введен в виде готовой лекарственной формы при примерно 1,2 мг/мл. Гуманизированный иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент может быть введен пациенту на протяжении примерно 30 мин.

Гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент может быть восстановлен из лиофилизированной композиции.

Гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент может быть восстановлен с получением стабильной жидкой композиции.

В некоторых аспектах режим дозирования не изменяет соотношение CD4 к CD8 в спинномозговой жидкости пациентов, получающих указанное лечение.

Пациент может быть особой в возрасте 65 лет или старше и не требовать какой-либо коррекции режима дозирования.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой изображение нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 1), кодирующей тяжелую цепь гуманизованного анти- $\alpha 4\beta 7$ иммуноглобулина и расшифрованной аминокислотной последовательности тяжелой цепи (SEQ ID NO: 2). Нуклеотидная последовательность содержит сайты клонирования (строчные буквы), последовательность Козака (прописные буквы, нуклеотиды 18-23 SEQ ID NO: 1) и лидерную последовательность (строчные буквы, нуклеотиды 24-86 SEQ ID NO: 1) на 5'-конце тяжелой цепи. Открытая рамка считывания нуклеотидной последовательности включает нуклеотиды 24-1433 SEQ ID NO: 1.

Фиг. 2 представляет собой изображение нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 3), кодирующей легкую цепь гуманизованного иммуноглобулина, называемого в данном документе ведолизумаб, и расшифрованной аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 4) легкой цепи. Нуклеотидная последовательность содержит сайты клонирования (строчные буквы), последовательность Козака (прописные буквы, нуклеотиды 18-23 SEQ ID NO: 3) и лидерную последовательность (строчные буквы, нуклеотиды 24-80 SEQ ID NO: 3) на 5'-конце тяжелой цепи. Открытая рамка считывания нуклеотидной последовательности включает нуклеотиды 24-737 SEQ ID NO: 3.

Фиг. 3 изображает выравнивание аминокислотных последовательностей (A) зрелой гуманизованной легкой цепи (аминокислоты 20-238 SEQ ID NO: 4) гуманизованного иммуноглобулина, называемого в данном документе ведолизумаб, и (B) зрелой гуманизованной легкой цепи гуманизованного иммуноглобулина, называемого в данном документе LDP-02 (SEQ ID NO: 5) (касательно LDP-02, см. WO 98/06248 и Feagan et al., N. Eng. J. Med. 352:2499-2507 (2005). Feagan et al. описывают клинические исследования LDP-02, но в их статье LDP-02 называется MLN02.) Выравнивание показывает, что аминокислотные последовательности легких цепей ведолизумаба и LDP-02 различаются в положениях 114 и 115 зрелых легких цепей.

Фиг. 4 изображает выравнивание аминокислотных последовательностей (A) родовой человеческой константной области каппа-легкой цепи (SEQ ID NO: 6) и (B) родовой мышинной константной области каппа-легкой цепи (SEQ ID NO: 7). Аминокислотные остатки Thr и Val (находящиеся в положениях 114 и 115 зрелой легкой цепи ведолизумаба (аминокислоты 133 и 134 SEQ ID NO: 4)) присутствуют в константной области человеческой каппа-легкой цепи, тогда как аминокислотные остатки Ala и Asp (находящиеся в положениях 114 и 115 зрелой легкой цепи LDP-02 (SEQ ID NO: 5)) присутствуют в константной области мышинной каппа-легкой цепи.

Фиг. 5 представляет собой карту вектора pLKТОК38D (также называемого pТОК38MLN02-TV), который кодирует гуманизованную тяжелую цепь и гуманизованную легкую цепь MLN02 и является пригодным для продуцирования ведолизумаба в клетках CHO (см. публикацию патентной заявки США № 2004/0033561 A1, которая раскрывает pLKТОК38. pLKТОК38D представляет собой вариант pLKТОК38, в котором сайты рестрикции, указанные на карте, фланкируют последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи).

Фиг. 6A изображает прогностические модели изменения процентного содержания мономера, изменения процентного содержания агрегатов и изменения процентного содержания главной изоформы лиофилизированной композиции анти- $\alpha 4\beta 7$. Модели основаны на статистическом анализе данных, приведенных в примере 1. Средняя линия показывает результаты для прогностических моделей и внешние линии показывают 95% доверительные пределы для прогностических моделей. Фиг. 6B изображает альтернативные модели, основанные на статистическом анализе данных для 40°C из табл. 1-3, входными

параметрами которых являются рН, молярное соотношение сахар:белок и молярное соотношение аргинин:белок. Средняя линия показывает результаты для прогностических моделей и внешние линии показывают 95% доверительные пределы для прогностических моделей.

Фиг. 7 изображает аминокислотные последовательности (А) варибельной области каппа-легкой цепи зрелого человеческого GM607'CL антитела и (В) варибельной области тяжелой цепи человеческого 21/28'CL.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий, что содержание твердых веществ и нагрузка влияют на время высушивания (числа на линиях указывают время высушивания в минутах).

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий, что ведолизумаб не задерживает начало проявления клинических симптомов экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) по сравнению с контролем по плацебо. Натализумаб существенно ($p < 0,05$) задерживает проявление клинических симптомов ЕАЕ по сравнению с контролем по плацебо.

Детальное описание изобретения

Изобретение относится к композиции, содержащей анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Композиции могут быть смесями, содержащими невосстанавливающий сахар, анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело и одну или несколько свободных аминокислот, причем молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу имеет значение более 600 моль невосстанавливающий сахар:1 моль анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Композиции могут находиться в твердой или жидкой форме.

Определения.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, содержащему анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело в форме, позволяющей эффективно обеспечить биологическую активность антитела, и не содержащей дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция.

"Стабильной" является композиция, в которой содержащееся в ней антитело в значительной степени сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или свою биологическую активность при хранении. В одном аспекте композиция в значительной степени сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Период хранения обычно выбирают на основании предполагаемого срока годности композиции. Различные аналитические методики измерения стабильности белка известны специалистам и рассмотрены, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993).

"Деамидированное" моноклональное антитело представляет собой антитело, в котором один или несколько аспарагиновых или глутаминовых остатков были дериватизированы, например, до аспарагиновой кислоты или изоаспарагиновой кислоты.

Антитело, "восприимчивое к деамидированию", представляет собой антитело, включающее один или несколько остатков, демонстрирующих склонность к деамидированию.

Антитело, "восприимчивое к окислению", представляет собой антитело, включающее один или несколько остатков, демонстрирующих склонность к окислению.

Антитело, "восприимчивое к агрегированию", представляет собой антитело, которое демонстрирует агрегирование с другой (другими) молекулами антитела, особенно, при замораживании, нагревании, высушивании, восстановлении и/или перемешивании.

Антитело, "восприимчивое к фрагментации", представляет собой антитело, которое демонстрирует расщепление на два или больше фрагментов, например, в своей шарнирной области.

"Восстановительное деамидирование, окисление, агрегирование или фрагментация" используются для обозначения предотвращения или снижения (например, до 80, 60, 50, 40, 30, 20 или 10%) величины деамидирования, агрегирования или фрагментации по сравнению с моноклональным антителом, приготовленным при отличном значении рН или в другом буфере.

"Агрегат", "агрегат SEC (агрегат, определяемый методом эксклюзионной хроматографии)" или "растворимый агрегат" представляют собой от более одного до не более десяти белков и/или фрагментов антител, ассоциированных друг с другом путем ковалентных или ионных или гидрофобных взаимодействий с образованием более крупного белкового тела.

"Нерастворимый агрегат" или "частица" представляет собой более десяти белков и/или фрагментов антител, ассоциированных друг с другом путем ковалентных или ионных или гидрофобных взаимодействий с образованием более крупного белкового тела.

В используемом тут значении, "биологическая активность" моноклонального антитела относится к способности антитела связываться с антигеном и приводить к измеримому биологическому ответу, который может быть измерен *in vitro* или *in vivo*. Такая активность может быть антагонистической или агонистической.

Молекула клеточной поверхности, "интегрин $\alpha 4\beta 7$ ", или " $\alpha 4\beta 7$ ", представляет собой гетеродимер $\alpha 4$ цепи (CD49D, ITGA4) и $\beta 7$ цепи (ITGB7). Каждая цепь может формировать гетеродимер с альтернативной цепью интегрина, с образованием $\alpha 4\beta 1$ или $\alpha E\beta 7$. Человеческие гены $\alpha 4$ и $\beta 7$ (GenBank (National

Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) RefSeq номера доступа NM_000885 и NM_000889 соответственно) экспрессируются В- и Т-лимфоцитами, в частности лимфоцитами памяти CD4+. Типично для многих интегринов $\alpha 4\beta 7$ может существовать в состоянии покоя или в активированном состоянии. Лиганды $\alpha 4\beta 7$ включают молекулу адгезии сосудистых клеток (VCAM), фибронектин и мукозальный адрессин (MAdCAM, например MAdCAM-1).

В используемом тут значении человеческий иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий "специфичностью связывания с комплексом $\alpha 4\beta 7$ ", связывается с $\alpha 4\beta 7$, но не с $\alpha 4\beta 1$ или $\alpha 4\beta 7$.

В используемом тут значении "изотоническая" композиция имеет, по существу, такое же осмотическое давление, как и человеческая кровь. Изотонические композиции будут обычно иметь осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена, например, по давлению пара или с помощью осмометра замораживающего типа.

В используемом тут значении, "буферный агент" относится к буферу, который противодействует изменениям pH в результате воздействия конъюгированных компонентов кислота-основание. Буферный агент может присутствовать в жидкой или твердой композиции по изобретению. Буферный агент устанавливает величину pH композиции в интервале от примерно 5,0 до примерно 7,5, от примерно 5,5 до примерно 7,5, от примерно 6,0 до примерно 6,5, или величину pH, равную примерно 6,3. В одном аспекте примеры буферных агентов, которые будут регулировать величину pH в диапазоне значений от 5,0 до 7,5, включают ацетат, сукцинат, глюконат, гистидин, цитрат, фосфат, малеат, какодилат, 2-[N-морфолино]этансульфоновую кислоту (MES), бис-(2-гидроксиэтил)иминоtris[гидроксиметил]метан (Bis-Tris), N-[2-ацетиламидо]-2-иминодиуксусную кислоту (ADA), глицилглицин и другие буферы на основе органических кислот. В другом аспекте буферный агент по настоящему изобретению представляет собой гистидин или цитрат.

"Гистидиновый буфер" представляет собой буфер, содержащий ионы гистидина. Примеры гистидиновых буферов включают растворы гистидина хлорида, гистидина ацетата, гистидина фосфата, гистидина сульфата. Гистидиновый буфер или буфер гистидин-HCl имеет pH примерно от 5,5 до 6,5, примерно от 6,1 до 6,5 или примерно pH 6,3.

"Сахарид" в данном документе означает соединение, имеющее общую формулу $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, и его производные, включая топосахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахароспирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и т.п. В одном аспекте примеры сахаридов по настоящему изобретению включают глюкозу, сахарозу, трегалозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, декстран, эритрит, глицерин, арабит, силит, сорбит, маннит, мелибиозу, мелицитозу, рафинозу, маннотриозу, стахиозу, мальтозу, лактулозу, мальтулозу, глюцит, мальтит, лактит, изомальтулозу и т.п. Сахарид может быть лиопротектантом. В другом аспекте сахарид в данном документе означает невосстанавливающий дисахарид, такой как сахароза.

"Поверхностно-активное вещество" в данном документе относится к агенту, который понижает поверхностное натяжение жидкости. Поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом. В одном аспекте примеры поверхностно-активных веществ в данном документе включают полисорбат (полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат, например полисорбат 20 и полисорбат 80); TRITON (т-октилфеноксиполиэтоксизтанол, неионный детергент, Union Carbide, дочерняя компания Dow Chemical Co., Midland MI); додецилсульфат натрия (ДСН); лаурилсульфат натрия; натрия октилгликозид; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетанин; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсаркозин; линолеил-, миристил-или цетилбетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, палмаамидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, палмаамидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; натрия метилкокоил- или динатрия метилолеилтаурат; сорбитанмонопальмитат; и серия продуктов MONAQUAT (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); полиэтилгликоль (PEG), полипропиленгликоль (PPG) и сополимеры полоксиэтилен- и полоксипропиленгликоля (например, плуроник (Pluronic)/полоксамер (Poloxamer), PF68 и т.д.) и т.д. В другом аспекте поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и, более конкретно, охватывает полноразмерные моноклональные антитела, иммуноглобулины, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух полноразмерных антител, например, каждое к отличному антигену или эпитопу, и индивидуальные антигенсвязывающие фрагменты, включая dAbs, scFv, Fab, F(ab)₂, Fab', включая человеческие, гуманизированные и антитела от видов, не являющихся человеком, и рекомбинантные антигенсвязывающие формы, такие как монотела и диатела.

Молярные количества и соотношения анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела к другим эксципиентам, описанным в данном документе, рассчитывают на основе предположения о приблизительном молекулярном весе антитела примерно 150000 Да. Фактический молекулярный вес антитела может отличаться от 150000 Да в зависимости от аминокислотного состава или посттрансляционной модификации, например, в зависимо-

сти от клеточной линии, используемой для экспрессии антитела. Фактический молекулярный вес антитела может находиться в пределах $\pm 5\%$ от 150000 Да.

Термин "человеческое антитело" включает антитело, содержащее последовательность, выделенную из последовательности человеческого зародышевого иммуноглобулина, такое как антитело, полученное от трансгенных мышей, содержащих гены человеческого иммуноглобулина (например, XENOMOUSE генно-инженерных мышей (Abgenix, Fremont, CA), HUMAB-MOUSE®, KIRIN TC MOUSE™ трансхромосомных мышей, KMMOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ)), их человеческих библиотек фагового дисплея, клеток человеческой миеломы или человеческих В-клеток.

Термин "моноклональное антитело" в используемом тут значении относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов, которые могут возникать при продуцировании моноклональных антител, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые типично включают разные антитела, направленные против разных детерминантов (эпитопов), где каждое моноклональное антитело направлено против отдельного детерминанта антигена. Определение "моноклональный" указывает на характер антитела как полученного от в значительной степени гомогенной популяции антител и не должно истолковываться как требующее продуцирования антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены гибридным способом, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из библиотеки фаговых антител с использованием методик, описанных, например, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-591 (1991).

Моноклональные антитела по настоящему изобретению, в частности, включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична с или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (цепей) идентична с или гомологична соответствующей последовательности антител, полученной от другого вида или принадлежащей к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (патент США № 4816567 и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес по настоящему изобретению, включают "приматизированные" антитела, содержащие вариабельный домен антигенсвязывающих последовательностей, полученный от не являющегося человеком примата (например, мартышки, человекообразной обезьяны и т.д.) и последовательности человеческой константной области.

"Антигенсвязывающие фрагменты" гуманизированного иммуноглобулина, приготовленные в композиции по изобретению, содержат, по меньшей мере, вариабельные области тяжелой и/или легкой цепей анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Например, антигенсвязывающий фрагмент везолизумаба содержит аминокислотные остатки 20-131 последовательности гуманизированной легкой цепи SEQ ID NO: 4. Примеры таких антигенсвязывающих фрагментов включают фрагменты Fab, фрагменты Fab', scFv и фрагменты F(ab')₂ гуманизированного иммуноглобулина, известные специалистам. Антигенсвязывающие фрагменты гуманизированного иммуноглобулина по изобретению могут быть получены путем ферментативного расщепления или рекомбинантными методами. Например, гидролиз папаином или пепсином может быть использован для получения фрагментов Fab или F(ab')₂ соответственно. Антитела могут также быть получены в различных укороченных формах с использованием генов антитела, в которые были введены один или несколько терминирующих кодонов левее природного сайта терминации. Например, рекомбинантный конструктор, кодирующий тяжелую цепь фрагмента F(ab')₂, может быть сконструирован таким образом, чтобы он включал ДНК-последовательности, кодирующие CH₁ домен и шарнирную область тяжелой цепи. В одном аспекте антигенсвязывающие фрагменты ингибируют связывание интегрина $\alpha 4\beta 7$ с одним или несколькими из его лигандов (например, мукозальным адрессином MAdCAM (например, MAdCAM-1), фибронектином).

Гидролиз антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами "Fab", каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт и остаточный фрагмент "Fc", название которого отображает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который содержит два антигенсвязывающих сайта и сохраняет способность к перекрестному связыванию с антигеном.

"Fv" представляет собой фрагмент антитела, состоящий из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи с нековалентной ассоциацией.

Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH₁) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбокси-конце CH₁-домена тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном документе обозначает Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) кон-

стантных доменов несет по меньшей мере одну свободную тиольную группу. F(ab')₂-фрагменты антител первоначально получали в виде пар Fab'-фрагментов с шарнирными цистеинами между ними. Также известны другие химические связи фрагментов антител.

"Одноцепочечные Fv" или "scFv" фрагменты антител содержат V_H и V_L домены антител, в которых такие домены присутствуют в отдельной полипептидной цепи. В одном аспекте полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который обеспечивает возможность образования желательной для связывания антигена структуры scFv. Обзор scFv приведен Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Термин "диатела" относится к малым фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, содержащим вариабельный тяжелый домен (V_H), соединенный с вариабельным легким доменом (V_L) в той же полипептидной цепи (V_H-V_L). Благодаря использованию линкера, слишком короткого для того, чтобы обеспечить возможность спаривания двух доменов одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела описаны более подробно, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

"Полноразмерное антитело" представляет собой антитело, содержащее антигенсвязывающую вариабельную область, а также константный домен легкой цепи (C_L) и константные домены тяжелой цепи, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Константные домены могут быть константными доменами нативной последовательности (например, константными доменами нативной последовательности человека) или вариантами их аминокислотной последовательности. В одном аспекте полноразмерное антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями.

"Вариант аминокислотной последовательности" антитела по настоящему изобретению означает антитело с аминокислотной последовательностью, которая отличается от основного типа антител. Обычно, варианты аминокислотных последовательностей будут обладать по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% гомологии с основным типом антител. Варианты аминокислотных последовательностей имеют замещения, делеции и/или аддиции в определенных положениях в или рядом с аминокислотной последовательностью основного типа антител, но сохраняют антигенсвязывающую активность. Варианты в последовательностях константных областей антитела будут обладать меньшим эффектом на антигенсвязывающую активность, чем варианты в вариабельных областях. В вариабельных областях, варианты аминокислотных последовательностей будут по меньшей мере на примерно 90% гомологичны, по меньшей мере на примерно 95% гомологичны, по меньшей мере на примерно 97% гомологичны, по меньшей мере на примерно 98% гомологичны или по меньшей мере на примерно 99% гомологичны основному типу антител.

"Гомология" определяется как процентное содержание в варианте аминокислотной последовательности идентичных остатков после выравнивания последовательности и введения пробелов, при необходимости, для достижения максимального процента гомологии. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны специалистам.

"Терапевтическое моноклональное антитело" представляет собой антитело, используемое для терапии человека. Терапевтические моноклональные антитела, раскрытые в данном документе, включают анти-α4β7 антитела.

"Вариант гликозилирования" антитела по настоящему изобретению означает антитело с присоединенными к нему одним или несколькими углеводными фрагментами, которые отличаются от одного или нескольких углеводных фрагментов, присоединенных к основному типу антител. Примеры вариантов гликозилирования по настоящему изобретению включают антитело с G1 или G2 олигосахаридной структурой, вместо G0 олигосахаридной структуры, присоединенной к его Fc-области, антитело с одним или двумя углеводными фрагментами, присоединенными к одной или двум его легким цепям, антитело, не имеющее углеводов, присоединенных к одной или двум тяжелым цепям антитела и т.д., и комбинации изменений гликозилирования.

"Эффекторные функции" антитела относятся к тем биологическим активностям, которые приписываются Fc-области (Fc-области нативной последовательности или Fc-области варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR) и т.п.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена своих тяжелых цепей полноразмерные антитела могут быть отнесены к разным "классам". Существует пять основных классов полноразмерных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие разным классам антител, называются α, δ, ε, γ и μ соответственно. Струк-

туры субъединиц и трехмерные конфигурации разных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

"Легкие цепи" антител любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

"Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "ADCC" относятся к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксичные клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcRs) (например, природные клетки-убийцы (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и затем вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки, медирующие ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, в то время как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на гематопоетических клетках суммирована в табл. 3 на с. 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки ADCC активности молекулы, представляющей интерес, может быть проведен *in vitro* анализ ADCC, такой как описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-убийцы (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC активность молекулы, представляющей интерес, может быть оценена *in vivo*, например, на животной модели, такой как раскрытая в Clynes et al. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

Термины "Fc-рецептор" или "FcR" используются для описания рецептора, который связывается с Fc-областью антитела. В одном аспекте FcR представляет собой последовательность человеческого FcR. В другом аспекте FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы таких рецепторов. Рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют схожие аминокислотные последовательности, различающиеся преимущественно в их цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор Fc γ RIIA содержит иммунорецепторный тирозин-активируемый мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc γ RIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. обзор в M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcRs приведен Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:33-41 (1995). Другие FcRs, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охвачены в данном документе термином "FcR". Термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Термин "гипервариабельная область" при использовании в данном документе относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "участок, определяющий комплементарность" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) и/или остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Остатки "каркасного участка" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена кроме остатков гипервариабельной области, как они определены в данном документе. Гипервариабельная область или ее CDR могут быть перенесены из одной цепи антитела в другую или в другой белок для придания специфичности связывания антигена полученному (комплексному) антителу или связывающему белку.

"Гуманизированные" формы не-человеческих (например, принадлежащих грызунам) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, выделенную из не-человеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области не являющегося человеком вида (антитело-донор), такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, обладающего желательной специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях, остатки каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют на соответствующие не-человеческие остатки. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Такие модификации осуществляют для дополнительного улучшения характеристик антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все из по меньшей мере одного, типично двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют не-человеческому иммуноглобулину и все или по существу все FR принадлежат последовательностям человеческого иммуноглобулина.

Гуманизированное антитело, необязательно, будет также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), типично, человеческого иммуноглобулина. Дополнительные подробности приведены в Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329

(1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Антитело, "подвергнутое аффинному созреванию", представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его гипервариабельных областях, которые приводят к улучшению аффинности антитела к антигену, по сравнению с родительским антителом, не имеющим такого изменения (изменений). В одном аспекте подвергнутые аффинному созреванию антитела будут иметь наномолярны или даже пикомолярные аффинности к антигену-мишени. Подвергнутые аффинному созреванию антитела получают с помощью процедур, известных специалистам. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описывает аффинное созревание путем перемешивания доменов VH и VL. Случайный мутагенез CDR и/или каркасных остатков описан: 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) и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

"Изолированное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его природного окружения. В определенных вариантах исполнения антитело будет очищено (1) до более 95 мас.% белка, при определении по методу Лоури, альтернативно, более 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при определении методом ДСН-ПААГ в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием окрашивания кумасси синим или серебром. Изолированное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, изолированное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

"Лечение" относится как к терапевтическому, так и профилактическому лечению или предохранительным мерам. Особы, нуждающиеся в лечении, включают тех, кто уже болен, а также тех, кому нужно предотвратить болезнь или ее рецидив. Таким образом, пациент, подлежащий лечению по настоящему изобретению, может иметь установленный диагноз болезни или может быть предрасположен или восприимчив к болезни. Термины "пациент" и "субъект" в настоящем изобретении используются взаимозаменяемо.

Антитело, используемое для приготовления композиции, является, по существу, чистым и, желательно, в значительной степени гомогенным (т.е. не содержащим белковых загрязнений и т.д.). "По существу, чистое" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 90 мас.% антитела, в пересчете на общий вес белка в композиции по меньшей мере примерно 95 или 97 мас.%. "В значительной степени гомогенное" антитело означает композицию, содержащую белок, в которой по меньшей мере примерно 99 мас.% белка представляет собой специфическое антитело, например анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело, в пересчете на общий вес белка.

"Клиническая ремиссия" в используемом тут значении по отношению к субъектам с неспецифическим язвенным колитом относится к оценке по полной шкале Мейо 2 или меньше баллов и отсутствию оценок по индивидуальным подшкалам более 1 балла. "Клиническая ремиссия" болезни Крона относится к оценке по шкале CDAI, равной 150 баллам или меньше.

"Клинический ответ" в используемом тут значении по отношению к субъектам с неспецифическим язвенным колитом относится к снижению по полной шкале Мейо на 3 или больше балла и на 30% от базовой линии (или по частичной шкале Мейо на 2 или больше балла и на 25% или больше от базовой линии, если оценка по полной шкале Мейо не проводилась при посещении врача) с сопровождающим снижением по подшкале ректального кровотечения на 1 или больше баллов или по абсолютной шкале ректального кровотечения на 1 или меньше баллов. "Клинический ответ" в используемом тут значении по отношению к субъектам с болезнью Крона относится к снижению на 70 баллов или больше оценки по шкале CDAI от базовой линии (неделя 0).

"Заживление слизистой" в используемом тут значении по отношению к субъектам с неспецифическим язвенным колитом относится к оценке по эндоскопической подшкале 1 балл или меньше.

В используемом тут значении "терапевтическая неудача" относится к ухудшению болезни, необходимости в применении препаратов неотложной терапии или хирургическом вмешательстве для лечения неспецифического язвенного колита или болезни Крона. Препараты неотложной терапии представляют собой любой новый лекарственный препарат или любое увеличение дозы препарата базовой линии, необходимые для лечения новых или некупированных симптомов неспецифического язвенного колита или болезни Крона (за исключением противодиарейных средств для борьбы с хронической диареей).

Композиции.

Как описано в настоящем изобретении, было обнаружено, что анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела являются высокостабильными в сухой, например лиофилизированной, композиции с избытком (в пересчете на молярное количество) невосстанавливающего сахара. В частности, в настоящем изобретении было показано, что лиофилизированные композиции, в которых соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1, являются стабильными на протяжении по меньшей мере 2 лет.

Настоящее изобретение предусматривает в первом аспекте стабильную композицию анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. В одном аспекте композиция содержит буфер, по меньшей мере один стабилизатор и анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело. В одном аспекте сухая композиция содержит один или несколько невосстанавливающих сахаров и анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело, где соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1. Композиция также содержит одну или несколько свободных аминокислот. Одна или несколько аминокислот могут также выступать в роли буфера. В одном аспекте одна или несколько аминокислот могут действовать как стабилизатор. Композиция может необязательно дополнительно содержать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. В одном варианте исполнения композиция является сухой, например лиофилизированной. Антитело в композиции может быть полноразмерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, таким как фрагмент Fab, Fv, scFv, Fab' или F(ab')₂.

Композиция может содержать любые желательные невосстанавливающие сахара. В одном аспекте невосстанавливающие сахара, которые могут быть использованы в композиции, включают, например, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу, рафинозу, стахиозу, мелицитозу, декстран, мальтит, лактит, изомальтулозу, палатинит и их комбинации. В другом аспекте невосстанавливающими сахарами являются сахароза, трегалоза, маннит и сорбит. Абсолютное количество невосстанавливающего сахара в композиции не является критичным, но соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более 400:1. В другом аспекте соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение по меньшей мере примерно 600:1, по меньшей мере примерно 625:1, по меньшей мере примерно 650:1, по меньшей мере примерно 675:1, по меньшей мере примерно 700:1, по меньшей мере примерно 750:1, по меньшей мере примерно 800:1, по меньшей мере примерно 1000:1, по меньшей мере примерно 1200:1, по меньшей мере примерно 1400:1, по меньшей мере примерно 1500:1, по меньшей мере примерно 1600:1, по меньшей мере примерно 1700:1, по меньшей мере примерно 1800:1, по меньшей мере примерно 1900:1 или по меньшей мере примерно 2000:1. В общем является желательным, чтобы невосстанавливающий сахар присутствовал в количестве, уменьшающем образование растворимых агрегатов в жидкой композиции, такое как образование агрегатов, происходящее при замораживании и оттаивании и/или высушивании и восстановлении. Отношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) выше примерно 730:1 может давать немного сниженное образование растворимых агрегатов в лиофилизированном состоянии. Весовое отношение сахар:белок может иметь значение более 1,5:1 (мас./мас.). В другом аспекте концентрации невосстанавливающего сахара для жидких (например, до высушивания или после восстановления) композиций находятся в диапазоне значений от примерно 10 мМ до примерно 1 М, например от примерно 60 до примерно 600 мМ, примерно 100 до примерно 450 мМ, примерно 200 до примерно 350 мМ, примерно 250 до примерно 325 мМ, до примерно 275 до примерно 300 мМ. В другом аспекте количество невосстанавливающего сахара в сухой (например, лиофилизированной) композиции имеет значение в диапазоне от примерно 40 до примерно 70% (мас./мас. сухой композиции). В другом аспекте количество невосстанавливающего сахара в сухой (например, лиофилизированной) композиции находятся в диапазоне значений от примерно 40 до примерно 60%, от примерно 45 до примерно 55% или примерно 51% (мас./мас.). В других аспектах количество невосстанавливающего сахара в сухой (например, лиофилизированной) композиции составляет более примерно 51% (мас./мас. сухой композиции), когда количество белка составляет примерно 31% (мас./мас. сухой композиции), или массовое отношение невосстанавливающего сахара к белку в сухой композиции имеет значение более примерно 1,6:1. В еще одном аспекте невосстанавливающим сахаром для использования в композиции является сахароза.

Композиция может содержать любую желательную свободную аминокислоту, которая может находиться в L-форме, D-форме или любой желательной смеси таких форм. В одном аспекте свободные аминокислоты, которые могут быть включены в композиции, включают, например, гистидин, аланин, аргинин, глицин, глутаминовую кислоту, серин, лизин, триптофан, валин, цистеин и их комбинации. Некоторые аминокислоты могут стабилизировать белки от деградации в процессе производства, при высушивании, лиофилизации и/или хранении, например, благодаря образованию водородных связей, солевых мостиков, антиоксидантным свойствам или гидрофобным взаимодействиям или путем исключения из белковой поверхности. Аминокислоты могут действовать как модификаторы тоничности или могут вызывать снижение вязкости композиции. В другом аспекте свободные аминокислоты, такие как гистидин и аргинин, могут действовать как криопротектанты и лиопротектанты и не кристаллизуются при лиофилизации в качестве компонентов композиции. Свободные аминокислоты, такие как глутаминовая кислота и гистидин, сами или в комбинации, могут действовать как буферные агенты в водном растворе в диапазоне значений pH от 5 до 7,5. В еще одном аспекте композиция содержит гистидин или гистидин и аргинин. В еще одном аспекте концентрация свободной аминокислоты для жидких композиций находится в диапазоне значений от примерно 10 до примерно 0,5 М, например от примерно 15 до примерно 300 мМ, примерно 20 до примерно 200 мМ или примерно 25 до примерно 150 мМ, от примерно 50 или примерно 125 мМ. В еще одном аспекте количество гистидина в сухой (например, лиофилизированной) композиции находится в диапазоне значений от примерно 1 до примерно 10% (мас./мас. сухой композиции) или

от примерно 3 до примерно 6% (мас./мас.). В некоторых вариантах исполнения количество гистидина в сухой (например, лиофилизированной) композиции составляет более примерно 4% (мас./мас. сухой композиции), когда количество белка составляет примерно 31% (мас./мас. сухой композиции) или массовое отношение гистидина к белку в сухой композиции составляет более примерно 0,15:1. В еще одном аспекте количество аргинина в сухой (например, лиофилизированной) композиции находится в диапазоне значений от примерно 4 до примерно 20% (мас./мас. сухой композиции) или от примерно 10 до примерно 15% (мас./мас.). В некоторых вариантах исполнения количество аргинина в сухой (например, лиофилизированной) композиции составляет более примерно 13% (мас./мас. сухой композиции), когда количество белка составляет от примерно 31% (мас./мас. сухой композиции) или массовое отношение аргинина к белку в сухой композиции имеет значение более примерно 0,4:1. В вариантах исполнения комбинаций аминокислот, таких как гистидин и аргинин, молярное соотношение общей аминокислоты к антителу может составлять по меньшей мере 200:1, от примерно 200:1 до примерно 500:1 или по меньшей мере 400:1.

Композиция может необязательно дополнительно содержать по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество. В одном аспекте поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в композиции, включают, например, полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер (Pluronic®) и их комбинации. В случае его присутствия поверхностно-активное вещество обычно используется в количестве, которое уменьшает образование нерастворимых агрегатов антитела, например, при разливе во флаконы, замораживании, высушивании, лиофилизации и/или восстановлении. Концентрация поверхностно-активного вещества, например, в композиции до высушивания (например, лиофилизации) или после восстановления обычно составляет от примерно 0,0001 до примерно 1,0%, от примерно 0,01 до примерно 0,1%, например примерно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08 или 0,09% (мас./об.), от 0,05 до 0,07% или 0,06% (мас./об.). Количество поверхностно-активного вещества, например, в сухой (например, лиофилизированной) композиции обычно составляет от примерно 0,01 до примерно 3,0% (мас./мас.), от примерно 0,10 до примерно 1,0%, например примерно 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40 или 0,50% (мас./мас.). В другом аспекте молярное соотношение поверхностно-активное вещество:антитело составляет примерно 1:1. Анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может присутствовать в композиции в любом желательном количестве, при условии, что соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу (моль:моль) имеет значение более примерно 600:1. Однако композиция может содержать высокую концентрацию анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Например, жидкие композиции могут содержать по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 90, по меньшей мере примерно 100, от примерно 40 до примерно 80 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, примерно 60 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Сухие композиции (например, лиофилизированные) могут содержать по меньшей мере примерно 5, по меньшей мере примерно 10, по меньшей мере примерно 15, по меньшей мере примерно 20, по меньшей мере примерно 25, по меньшей мере примерно 30, или примерно 31 или примерно 32% анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по весу.

При необходимости, композиция может дополнительно содержать хелатирующий агент, взаимодействующий с металлами, и/или антиоксидант, а также другие фармацевтически приемлемые эксципиенты. Пригодные хелатирующие агенты для связывания металлов включают, например, метиламин, этилендиамин, десфероксамин, триентин, гистидин, малатные, фосфонатные соединения, например этидроновую кислоту, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), этиленгликольтетрауксусную кислоту (EGTA) и т.п. Пригодные антиоксиданты включают, например, лимонную кислоту, мочевую кислоту, аскорбиновую кислоту, липоевую кислоту, глутатион, токоферол, каротин, ликопен, цистеин и т.п.

Композиция может быть жидкостью или твердым веществом. Жидкие композиции могут быть водными растворами или суспензиями, приготовленными в пригодном водном растворителе, таком как вода или водно-органическая смесь, такая как водно-спиртовые смеси. Жидкие композиции могут иметь pH от примерно 5,5 до примерно 7,5, от примерно 6,0 до примерно 7,0 или от примерно 6,0 до примерно 6,5, такие как примерно 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. Жидкие композиции могут охлаждаться (например, 2-8°C) или замораживаться (например, при -20 или -80°C) для хранения. Твердые композиции могут быть приготовлены любым пригодным способом и могут иметь форму, например, брикета или порошка. Твердую композицию готовят высушиванием жидкой композиции, как описано в настоящем изобретении, например путем лиофилизации, распылительной сушки, сушки на воздухе в виде пленки (например, для трансдермальной доставки), смешивания с липидной эмульсией и высушивания в виде сфер для пероральной доставки или пленки для трансдермальной доставки. В тех случаях, когда композиция представляет собой твердую композицию, она может иметь влагосодержание не более чем примерно 5, не более чем примерно 4,5, не более чем примерно 4, не более чем примерно 3,5, не более чем примерно 3, не более чем примерно 2,5, не более чем примерно 2, не более чем примерно 1,5, не более чем примерно 1%, или быть, по существу, безводной. Твердые композиции могут быть растворены, т.е. восстановлены, в пригодной среде или растворителе для получения жидкости, пригодной для введения. Пригодные растворители для восстановления твердой композиции включают воду, изотонический солевой раствор, бу-

фер, например фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера (с лактозой или декстрозой), минимальной поддерживающей средой, спиртово-водные растворы, раствор декстрозы и т.д. Количество растворителя может обеспечивать терапевтическую концентрацию белка выше, равную или ниже концентрации до высушивания. В одном аспекте концентрация восстановленного анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела представляет собой ту же самую концентрацию, что концентрация жидкой композиции перед высушиванием.

Композиция может быть стерильной, и это может быть достигнуто в соответствии с известными квалифицированному специалисту процедурами получения стерильных фармацевтических композиций, пригодных для введения людям, до или после приготовления композиции. Композиция может быть стерилизована в виде жидкости, например, перед высушиванием и/или после восстановления путем фильтрации через мелкие поры, путем асептической обработки или путем воздействия ультрафиолетового излучения. Размеры пор фильтра могут составлять 0,1 или 0,2 мкм для фильтрации микроорганизмов или от 10 до 20 нм для фильтрации вирусных частиц. Альтернативно или дополнительно, высушенная композиция может быть стерилизована, например, путем облучения гамма-излучением. В одном аспекте жидкую композицию анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела стерилизуют путем фильтрации перед высушиванием.

В одном аспекте композиция является стабильной при хранении. В другом аспекте композиция является стабильной при хранении в сухом состоянии. Стабильность может быть протестирована путем оценки физической стабильности, химической стабильности и/или биологической активности антитела в композиции во время приготовления композиции, а также после хранения при указанных температурах. Физическая и/или химическая стабильность жидкой композиции или восстановленного сухого порошка может быть оценена качественно и/или количественно множеством различных способов (см., например, *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*, Rodriguez-Diaz et al. eds. Informa Healthcare (2005)), включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной (или гель-фильтрационной) хроматографии, хроматография (SEC), матрично-активированной лазерной десорбционной/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS), аналитического ультрацентрифугирования, светорассеяния (фотонно-корреляционная спектроскопия, динамическое светорассеяние (DLS), многоугловое лазерное светорассеяние (MALLS)), микроскопической визуализации в потоке, подсчета методом электронного импеданса (культеровским), затемнения света или с помощью других систем подсчета частиц в жидкости, путем измерения мутности, центрифугированием в градиенте плотности и/или путем визуального контроля); путем оценки гетерогенности заряда с использованием катионообменной хроматографии (см. также Vlasak and Ionescu, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:468-481 (2008) и Harris et al. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752:233-245 (2001)), изоэлектрического фокусирования (IEF), например капиллярной методики (cIEF), или электрофореза в капиллярной зоне; анализа аминоконцевых или карбоксиконцевых последовательностей; масс-спектрометрического анализа; анализа методом ДСН-ПААГ или SEC (эксклюзионной хроматографии) для сравнения фрагментированных, интактных и мультимерных (т.е. димерных, тримерных и т.д.) антител; пептидных карт (например, триптических или LYS-, и т.п.), оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.п. Биологическая активность или антигенсвязывающие функции, например связывание анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела с MAdCAM (например, MAdCAM-1) или ингибирование связывания клетки, экспрессирующей интегрин $\alpha 4\beta 7$, с MAdCAM (например, MAdCAM-1), например иммобилизованным MAdCAM (например, MAdCAM-1), может быть оценена с использованием различных методик, доступных квалифицированному специалисту-практику (см., напр., Soler et al., *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 330:864-875 (2009)). Измерение влагосодержания сухой композиции может указывать вероятность протекания химической или физической деградации композиции, причем большая влажность вызывает более сильную деградацию.

Стабильность твердофазной композиции может также быть оценена качественно и/или количественно множеством различных способов, включая прямые испытания, такие как определение кристаллической структуры методом рентгеновской порошковой дифракции (XRPD); оценка структуры антитела в твердом состоянии с использованием инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (FTIR); и измерение термических переходов в лиофилизированном твердом веществе (плавление, стеклование и т.д.) с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК, например, для оценки денатурации), и непрямые испытания, такие как измерение влагосодержания с помощью теста Карла Фишера, например, для экстраполяции вероятности химической нестабильности вследствие гидролиза. Измерение влагосодержания сухой композиции может указывать вероятность протекания химической или физической деградации композиции, причем большая влажность вызывает более сильную деградацию.

Стабильность может быть измерена при выбранной температуре для выбранного периода времени. В одном аспекте сухая (например, лиофилизированная) композиция является стабильной при примерно 40°C, 75% RH, в течение по меньшей мере примерно 2-4 недель, по меньшей мере примерно 2, по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 6, по меньшей мере примерно 9, по меньшей мере примерно 12 или по меньшей мере примерно 18 месяцев. В другом аспекте композиция (жидкая или сухая (например, лиофилизированная)) является стабильной при примерно 5 и/или 25°C и 60% RH в течение по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 6, по меньшей мере примерно 9, по мень-

шей мере примерно 12, по меньшей мере примерно 18, по меньшей мере примерно 24, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 36 или по меньшей мере примерно 48 месяцев. В другом аспекте композиция (жидкая или сухая (например, лиофилизированная)) является стабильной при примерно -20°C в течение по меньшей мере примерно 3, по меньшей мере примерно 6, по меньшей мере примерно 9, по меньшей мере примерно 12, по меньшей мере примерно 18, по меньшей мере примерно 24, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 36, по меньшей мере примерно 42 или по меньшей мере примерно 48 месяцев. Кроме того, жидкая композиция может в некоторых вариантах исполнения быть стабильной после замораживания (например, до -80°C) и оттаивания, такого как, например, после 1, 2 или 3 циклов замораживания и оттаивания.

Нестабильность может включать любое одно или несколько из следующих явлений: агрегирование (например, нековалентное агрегирование растворимых веществ (вызванное гидрофобными или зарядовыми взаимодействиями), ковалентное агрегирование растворимых веществ (например, перегруппировка/перемешивание дисульфидных связей), агрегирование нерастворимых веществ (вызванное денатурированием белка на поверхностях раздела жидкость/воздух и жидкость/твердое вещество)), деамидирование (например, деамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризация (например, изомеризация Asp), денатурация, отсечение/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимидов, N-концевое удлинение, C-концевой процессинг, различия в гликозилировании и т.п.

Стабильная композиция может способствовать низкой иммуногенности анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Иммуногенное анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может приводить к ответу с образованием человеческих антител против иммуноглобулина человека (НАНА) у людей или пациентов. У пациентов с возникающим НАНА-ответом на анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело могут наблюдаться нежелательные эффекты (например, реакция места инфузии) при лечении или анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может быстро элиминироваться, приводя к более низкой дозе, чем запланированная для лечения. В отчете (Feagen et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:2499-2507) о ранних исследованиях лечения анти- $\alpha 4\beta 7$ антителами указывалось, что человеческие антитела против иммуноглобулина человека образовывались к неделе 8 у 44% получавших лечение пациентов. Антитело в данных исследованиях хранилось в виде жидкости не содержало полисорбата.

В некоторых вариантах исполнения композиция увеличивать долю НАНА-негативных пациентов до по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80 или по меньшей мере 90% пациентов по сравнению с результатами НАНА для менее стабильной композиции.

В некоторых вариантах исполнения композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\geq 50\%$ главной заряженной изоформы, $\geq 55\%$ главной заряженной изоформы или от 65 до 70% главной заряженной изоформы. В других аспектах стабильная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\leq 45\%$ кислотных заряженных изоформ, $\leq 40\%$ кислотных заряженных изоформ, $\leq 30\%$ кислотных заряженных изоформ или от 22 до 28% кислотных изоформ. В других аспектах стабильная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\leq 25\%$ основных изоформ, $\leq 20\%$ основных изоформ, $\leq 15\%$ основных изоформ, примерно 5% основных изоформ или примерно 10% основных изоформ. В одном аспекте стабильная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\geq 55\%$ главной изоформы, $\leq 30\%$ кислотных изоформ и/или $\leq 20\%$ основных изоформ, например, при определении по методу СЕХ. В другом аспекте стабильная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\geq 50\%$ главной изоформы, $\leq 45\%$ кислотных изоформ и/или $< 10\%$ основных изоформ, например, при определении по методу сIEF.

В некоторых аспектах сухая твердая композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела имеет $\leq 10\%$ влагосодержания, $\leq 5\%$ влагосодержания или $< 2,5\%$ влагосодержания. Время, необходимое для восстановления, составляет ≤ 60 , ≤ 50 или ≤ 40 , или ≤ 30 , или ≤ 20 мин.

Содержание мономеров и/или содержание агрегатов (например, в виде димеров, тримеров, тетрамеров, пентамеров, олигомеров и агрегатов более высокого порядка), например, в жидкой композиции или в сухой композиции после восстановления может быть измерено методами SEC, MALDI-TOF MS, аналитического ультрацентрифугирования, светорассеяния (DLS или MALLS) или наномасштабных измерений, таких как анализ траекторий наночастиц (NTA) (NanoSight Ltd., Wiltshire, UK). Разрешение, характеристика и количественное определение агрегатов могут быть осуществлены рядом способов, включая увеличение длины разделения на колонке для эксклюзионной хроматографии, например, путем использования более длинной колонки или путем последовательного присоединения второй или большего числа SEC-колонок к исходной аналитической SEC-колонке, дополнение количественного определения мономеров методом SEC светорассеянием, или путем использования NTA.

В одном варианте исполнения композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\geq 90\%$ мономерного антитела, $\geq 95\%$ мономерного антитела или от 97 до 99% мономерного антитела. В другом варианте исполнения большая часть материала в композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела имеет средний радиус ≤ 20 , ≤ 15 , ≤ 10 или от примерно 5 до примерно 7 нм. В одном аспекте композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела содержит $\geq 80\%$ по количеству тяжелой плюс легкой цепей по результатам белкового анализа. В одном аспекте присутствует

≥90% тяжелой плюс легкой цепей. В другом аспекте композиция анти-α4β7 антитела содержит ≤10, ≤5, ≤2,5, ≤1,5, ≤1,0 или ≤0,5% агрегатов. В другом аспекте стабильная композиция анти-α4β7 антитела содержит ≥96% мономеров и/или ≤2,5% агрегатов. В еще одном аспекте стабильная композиция анти-α4β7 антитела содержит примерно 99% мономеров и/или примерно <1% агрегатов.

Размеры частиц, например, агрегатов или нерастворенного эксципиента, например, в восстановленной композиции могут быть измерены методом затемнения света (например, система для подсчета частиц в жидкости (НИАС) фирмы Nach Ultra Analytics (Grants Pass, OR)), микроскопии, культеровским счетчиком или системой на основе цифровой (например, поточной) микроскопической визуализации, такой как микрофлюидная визуализация (MFI) фирмы Brightwell (Ottawa, CA) или анализатор частиц FLOWCAM® Image фирмы Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME). В одном аспекте размер частиц в препарате анти-α4β7 антитела составляет примерно 30, примерно 25, примерно 10, примерно 5, примерно 2 или 1 мкм или меньше. Количество частиц в композиции антител должно быть минимальным. В одном аспекте композиция анти-α4β7 антитела содержит <6000 частиц ≥10 мкм и/или <600 частиц диаметром ≥25 мкм в одной дозе (US Pharmacopoeia Chp. 788, способ подсчета методом затемнения света; составляет половину от количества, измеренного микроскопическими способами количественного определения). В еще одном аспекте количество частиц на 1 мл, например, определенное путем измерения методом MFI, в дозе композиции анти-α4β7 антитела, например восстановленной композиции, составляет от примерно 500 до примерно 2000 или от примерно 1000 до примерно 3000 частиц размером 2-10 мкм на 1 мл, от примерно 50 до примерно 350 частиц размером ≥10 мкм на 1 мл, от примерно 0 до примерно 50 частиц размером ≥25 мкм на 1 мл.

В одном варианте исполнения композиция анти-α4β7 антитела имеет аффинность связывания от примерно 60 до примерно 140% от значения для эталонного стандарта анти-α4β7 антитела. В одном аспекте анти-α4β7 антитело в композиции, описанной в настоящем изобретении, связывается с α4β7, например, на клетке (WO98/06248 или патент США № 7147851), со значением, составляющим от примерно 80 до примерно 120% от значения для эталонного стандарта. В другом варианте исполнения композиция анти-α4β7 антитела обладает способностью ингибировать по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% связывания клетки, экспрессирующей интегрин α4β7, с MAdCAM, например MAdCAM-1, химерой MAdCAM-Ig (см. публикацию патентной заявки США № 20070122404, где также приведены примеры эталонных стандартов).

Как было отмечено выше, замораживание композиции специально предусматривается по настоящему изобретению. Следовательно, композиция может быть испытана на стабильность при замораживании и оттаивании. Соответственно антитело в жидкой композиции может быть стабильно при замораживании и оттаивании композиции, например антитело может быть стабильно после одного, двух, трех, четырех, пяти или больше циклов замораживание/оттаивание.

В некоторых вариантах исполнения композиция представляет собой жидкую композицию, содержащую по меньшей мере примерно 50 до примерно 100 мг/мл анти-α4β7 антитела, буферный агент (например, гистидин) и по меньшей мере примерно 9% (мас./мас.) невосстанавливающего сахара (например, сахарозы, трегалозы или маннита). В одном варианте исполнения композиция содержит по меньшей мере от примерно 50 до примерно 80 мг/мл, примерно 60 мг/мл анти-α4β7 антитела, буферный агент (например, гистидин), свободную аминокислоту (например, аргинин) и по меньшей мере примерно 9 или 10% (мас./мас.) невосстанавливающего сахара (например, сахарозы, трегалозы или маннита).

В другом варианте исполнения композиция содержит по меньшей мере примерно 60 мг/мл анти-α4β7 антитела, буферный агент (например, гистидин), свободную аминокислоту (например, аргинин) и по меньшей мере примерно 10% (мас./мас.) невосстанавливающего сахара (например, сахарозы, трегалозы или маннита). В таких вариантах исполнения концентрация буфера составляет от примерно 15 до примерно 75, от примерно 25 до примерно 65 мМ или примерно 50 мМ. Концентрация свободной аминокислоты составляет от примерно 50 до примерно 250 мМ, от примерно 75 до примерно 200 мМ, от примерно 100 до примерно 150 мМ, или примерно 125 мМ.

В одном варианте исполнения композиция представляет собой сухую твердую композицию (например, лиофилизированную композицию), содержащую смесь невосстанавливающего сахара, анти-α4β7 антитела, гистидина, аргинина и полисорбата 80, и молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти-α4β7 антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1.

В другом варианте исполнения композиция представляет собой сухую твердую аморфную композицию (например, лиофилизированную композицию), содержащую смесь невосстанавливающего сахара, анти-α4β7 антитела, гистидина, аргинина и полисорбата 80, и молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти-α4β7 антителу (моль:моль) имеет значение более 600:1.

В одном варианте исполнения композиция является лиофилизированной композицией, содержащей невосстанавливающий сахар, анти-α4β7 антитело, гистидин, аргинин и полисорбат 80, и молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти-α4β7 антителу (моль:моль) в композиции имеет значение более 600:1.

В одном варианте исполнения композиция является лиофилизированной композицией, содержащей невосстанавливающий сахар, анти- $\alpha\beta 7$ антитело, гистидин, аргинин и полисорбат 80, где молярное соотношение невосстанавливающего сахара к анти- $\alpha\beta 7$ антителу (моль:моль) в композиции имеет значение более 600:1 и молярное соотношение аргинина к анти- $\alpha\beta 7$ антителу (моль:моль) в композиции имеет значение более 250:1.

В одном варианте исполнения композиция представляет собой жидкую композицию и содержит по меньшей мере примерно 60 мг/мл анти- $\alpha\beta 7$ антитела, по меньшей мере примерно 10% (мас./об.) невосстанавливающего сахара и по меньшей мере примерно 125 мМ одной или нескольких свободных аминокислот.

В одном варианте исполнения композиция представляет собой жидкую композицию и содержит по меньшей мере примерно 60 мг/мл анти- $\alpha\beta 7$ антитела, по меньшей мере примерно 10% (мас./об.) невосстанавливающего сахара и по меньшей мере примерно 175 мМ одной или нескольких свободных аминокислот.

В одном варианте исполнения композиция представляет собой жидкую композицию и содержит от примерно 60 до примерно 80 мг/мл анти- $\alpha\beta 7$ антитела, буферный агент и по меньшей мере примерно 10% (мас./мас.) сахара.

В одном варианте исполнения композиция представляет собой жидкую композицию и содержит от примерно 60 до примерно 80 мг/мл анти- $\alpha\beta 7$ антитела, гистидин и по меньшей мере примерно 10% (мас./мас.) сахарозы.

В одном варианте исполнения композиция лиофилизирована и хранится в виде разовой дозы в одном флаконе. Флакон желательно хранится при примерно 2-8°C до момента введения нуждающемуся в этом субъекту. Флакон может, например, представлять собой флакон на 20 или 50 см³ (например, для дозы 60 мг/мл). Флакон может содержать по меньшей мере примерно 120, по меньшей мере примерно 180, по меньшей мере примерно 240, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 360, по меньшей мере примерно 540 или по меньшей мере примерно 900 мг анти- $\alpha\beta 7$ антитела. В одном аспекте флакон содержит примерно 300 мг анти- $\alpha\beta 7$ антитела.

Один или несколько других фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов или стабилизаторов, таких как описанные в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Hendrickson, R. Ed. (2005), могут быть включены в композиции при условии, что они не будут оказывать нежелательного эффекта на требуемые характеристики композиции. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают дополнительные буферные агенты; соразтворители; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биodeградируемые полимеры, такие как полиэфиры; консерванты и/или солеобразующие противоионы, такие как натрий.

$\alpha\beta 7$ Антитела.

Анти- $\alpha\beta 7$ антитела, пригодные для использования в композициях, включают антитела из любого желательного источника, такого как полностью человеческие антитела, мышинные антитела, кроличьи антитела и т.п., и любые желательные сконструированные антитела, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела и т.п. Антигенсвязывающие фрагменты любых таких типов антител, такие как фрагменты Fab, Fv, scFv, Fab' и F(ab')₂, также являются пригодными для использования в композициях.

Анти- $\alpha\beta 7$ антитело может связываться с эпитопом на $\alpha 4$ цепи (например, гуманизированного MAb 21,6 (Bendig et al., патент США № 5840299)), на $\beta 7$ цепи (например, F1B504 или гуманизированного производного (например, Fong et al., патент США № 7528236)) или с комбинационным эпитопом, образующимся при ассоциации цепи $\alpha 4$ с цепью $\beta 7$. В одном аспекте антитело связывает комбинационный эпитоп на комплексе $\alpha\beta 7$, но не связывает эпитоп на $\alpha 4$ цепи или $\beta 7$ цепи, если цепи не ассоциированы друг с другом. Ассоциация $\alpha 4$ интегрина с $\beta 7$ интегрином может создавать комбинационный эпитоп, например, в результате сближения вследствие образования мостиковых связей остатков, расположенных в обеих цепях, которые вместе образуют эпитоп, или в результате конформационного обнажения на одной цепи, например $\alpha 4$ цепи интегрин или $\beta 7$ цепи интегрин, эпитопного связывающего сайта, который является недоступным для связывания антителом в отсутствие соответствующего партнера интегрин или без активации интегрин. В другом аспекте анти- $\alpha\beta 7$ антитело связывает как $\alpha 4$ цепь интегрин, так и $\beta 7$ цепь интегрин, и, таким образом, является специфическим по отношению к интегриновому комплексу $\alpha\beta 7$. Такие антитела могут связывать $\alpha\beta 7$, но не связывают, например, $\alpha\beta 1$ и/или не связывают $\alpha\beta 7$. В другом аспекте анти- $\alpha\beta 7$ антитело связывается с таким же или по существу с таким же эпитопом, как и Act-1 антитело (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). Клеточная линия мышино-гибридомы АСТ-1, которая продуцирует мышинное моноклональное антитело Act-1, была депонирована согласно Будапештскому договору 22 августа 2001 г. от имени фирмы Millennium Pharmaceuticals, Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, Mass. 02139, U.S.A., в Американской коллек-

ции типовых культур (American Type Culture Collection), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, U.S.A., под номером доступа РТА-3663. В другом аспекте анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело представляет собой человеческое антитело или $\alpha 4\beta 7$ связывающий белок, в котором используются CDR, предусмотренные в публикации патентной заявки США № 2010/0254975.

В одном аспекте анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело ингибирует связывание $\alpha 4\beta 7$ с одним или несколькими из его лигандов (например, мукозальным адрессином, например MAdCAM (например, MAdCAM-1), фибронектином и/или сосудистым адрессином (VCAM)). MAdCAM приматов описаны в публикации PCT WO 96/24673, полное описание которой настоящим включено в данное описание в качестве ссылки. В другом аспекте анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело ингибирует связывание $\alpha 4\beta 7$ с MAdCAM (например, MAdCAM-1) и/или фибронектином без ингибирования связывания VCAM.

В одном аспекте анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела для использования в композициях представляют собой гуманизированные варианты мышинового Act-1 антитела. Пригодные способы получения гуманизированных антител хорошо известны специалистам. Обычно гуманизированное анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может содержать тяжелую цепь, которая включает 3 гипервариабельных участка тяжелой цепи (CDR - CDR1, SEQ ID NO: 8, CDR2, SEQ ID NO: 9 и CDR3, SEQ ID NO: 10) мышинового Act-1 антитела и пригодные каркасные участки человеческой тяжелой цепи; а также содержит легкую цепь, которая включает 3 CDR легкой цепи (CDR1, SEQ ID NO: 11, CDR2, SEQ ID NO: 12 и CDR3, SEQ ID NO: 13) мышинового Act-1 антитела и пригодные каркасные участки человеческой легкой цепи. Гуманизированное Act-1 антитело может содержать любые пригодные человеческие каркасные участки, включая консенсусные каркасные участки, с аминокислотными замещениями или без них. Например, одна или несколько каркасных аминокислот может быть заменена на другую аминокислоту, такую как аминокислота в соответствующем положении мышинового Act-1 антитела. Человеческая константная область или ее часть в случае присутствия может быть выделена из κ - или λ -легких цепей и/или из γ - (например, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ -, α - (например, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ - или ϵ -тяжелых цепей человеческих антител, включая аллельные варианты. Конкретный вариант константной области или ее частей (например, IgG1) может быть выбран с целью регулирования эффекторной функции. Например, мутированная константная область (вариант) может быть включена в слитый белок для минимизации связывания с Fc-рецепторами и/или способности фиксировать комплемент (см., напр., Winter et al., GB 2209757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351, Dec. 22, 1994). Гуманизированные варианты Act-1 антитела были описаны в публикациях PCT №№ WO98/06248 и WO07/61679, содержание которых настоящим целиком включено в данное описание в качестве ссылки.

В другом аспекте анти- $\alpha 4\beta 7$ гуманизированные антитела для использования в композиции содержат вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислоты 20-140 SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислоты 20-131 SEQ ID NO: 4 или аминокислоты 21-132 SEQ ID NO: 5. При необходимости может присутствовать пригодная человеческая константная область (области). Например, гуманизированное анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может включать тяжелую цепь, содержащую аминокислоты 20-470 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислоты 21-239 SEQ ID NO: 5. В другом примере гуманизированное анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может включать тяжелую цепь, содержащую аминокислоты 20-470 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую аминокислоты 20-238 SEQ ID NO: 4. Фиг. 4 изображает выравнивание, сравнивающее типичные легкие цепи человеческих антител с мышинными антителами. Выравнивание показывает, что гуманизированная легкая цепь ведолизумаба (например, Chemical Abstract Service (CAS, American Chemical Society) № регистрации 943609-66-3) с двумя мышинными остатками, замененными на человеческие остатки, является более человеческой, чем легкая цепь LDP-02 (фиг. 3). Кроме того, LDP-02 содержит слабо гидрофобный, гибкий аланин 114 и гидрофильный сайт (аспартат 115), которые заменены в ведолизумабе на слабо гидрофильный гидроксил-содержащий треонин 114 и гидрофобный, потенциально направленный вовнутрь остаток валина 115.

Дополнительные замещения в последовательности антитела могут быть, например, мутациями каркасных участков тяжелой и легкой цепей, такими как мутация изолейцина на валин в положении остатка 2 SEQ ID NO: 14; мутация метионина на валин в положении остатка 4 SEQ ID NO: 14; мутация аланина на глицин в положении остатка 24 SEQ ID NO: 15; мутация аргинина на лизин в положении остатка 38 SEQ ID NO: 15; мутация аланина на аргинин в положении остатка 40 SEQ ID NO: 15; мутация метионина на изолейцин в положении остатка 48 SEQ ID NO: 15; мутация изолейцина на лейцин в положении остатка 69 SEQ ID NO: 15; мутация аргинина на валин в положении остатка 71 SEQ ID NO: 15; мутация треонина на изолейцин в положении остатка 73 SEQ ID NO: 15; или любую их комбинацию; и замещение CDR тяжелой цепи на CDR (CDR1, SEQ ID NO: 8, CDR2, SEQ ID NO: 9 и CDR3, SEQ ID NO: 10) мышинового Act-1 антитела; и замещение CDR легкой цепи на CDR легкой цепи (CDR1, SEQ ID NO: 11, CDR2, SEQ ID NO: 12 и CDR3, SEQ ID NO: 13) мышинового Act-1 антитела.

В некоторых вариантах исполнения анти- $\alpha 4\beta 7$ гуманизированные антитела для использования в композиции содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую примерно 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с аминокислотами 20-140 SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, имеющую примерно 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с аминокисло-

тами 20-131 SEQ ID NO: 4 или аминокислотами 21-132 SEQ ID NO: 5. Идентичность аминокислотной последовательности может быть определена с использованием пригодного алгоритма выравнивания последовательностей, такого как система Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), с использованием параметров по умолчанию. В варианте исполнения анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело для использования в композиции представляет собой ведолизумаб (CAS, American Chemical Society, № регистрации 943609-66-3).

Другие $\alpha 4\beta 7$ антитела также могут быть использованы в композициях и режимах дозирования, описанных в настоящем изобретении. Например, $\alpha 4\beta 7$ антитела, описанные в US 2010/0254975 (Amgen, Inc.), целиком включенном в настоящее изобретение в качестве ссылки, являются пригодными для использования в композициях и способах лечения воспалительной болезни кишечника у людей.

Анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело может быть получено путем экспрессии последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих каждую цепь в живых клетках, например клетках в культуре. Различные системы хозяин-экспрессионный вектор могут быть использованы для экспрессии молекул антител по изобретению. Такие системы экспрессии в хозяине предусматривают носители, с помощью которых кодирующие последовательности, представляющие интерес, могут быть получены, а затем очищены, но также предусматривают клетки, которые могут при трансформации или трансфекции пригодными кодирующими нуклеотидными последовательностями экспрессировать анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело *in situ*. Они включают, без ограничений, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*, *B. subtilis*), трансформированные рекомбинантной ДНК бактериофага, экспрессионными векторами плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими кодирующие последовательности антитела; системы клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирусными), содержащими кодирующие последовательности антитела; системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV), или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами (например, Ti-плазмиды), содержащими кодирующие последовательности антитела; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, BHK, 293, 3T3, NS0), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкторы, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлоницеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, аденовирусный поздний промотор; промотор вирус коровьей оспы 7,5K). Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент главного предраннего гена человеческого цитомегаловируса, являются эффективной системой экспрессии антител (Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)).

В бактериальных системах ряд экспрессионных векторов может быть предпочтительно выбран в зависимости от предполагаемого использования экспрессируемой молекулы антитела. Например, если нужно продуцировать большое количество такого белка для получения фармацевтических композиций молекулы антитела, могут быть желательными векторы, направляющие экспрессию высоких уровней продуктов слитых белков, которые могут быть легко очищены. Такие векторы включают, без ограничений, экспрессионный вектор *E. coli* pUR278 (Ruther et al., *EMBO J.* 2:1791 (1983)), в котором кодирующая последовательность антитела может быть лигирована индивидуально в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z* для получения слитого белка; векторы pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)) и т.п. Векторы pGEX также могут быть использованы для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В общем, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с матрицей глутатион-агарозных бусин с последующей элюцией в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX конструируют таким образом, чтобы они включали сайты расщепления протеазы тромбина или фактора Ха, чтобы клонированный целевой генный продукт мог быть отделен от GST-фрагмента.

В системах насекомых вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV) используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующая последовательность антитела может быть клонирована индивидуально в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, полиэдринового промотора).

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд экспрессионных систем на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используется аденовирус, кодирующая последовательность антитела, представляющая интерес, может быть лигирована с аденовирусным комплексом контроля транскрипции/трансляции, например, поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Этот химерный ген может быть затем вставлен в геном аденовируса путем *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) будет давать рекомбинантный вирус, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (например, см. Logan & Shenk, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). Специфические иницирующие сигналы также могут быть необходимы для эффективной трансляции вставленных кодирующих последовательностей антитела. Такие сигналы включают иницирующий кодон ATG и прилегающие к нему последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен быть согласован с рамкой считывания желательной кодирующей последовательности для обеспечения трансляции полной вставки. Такие экзогенные сигналы контроля трансляции и иницирующие кодоны могут иметь различное происхождение как природное, так и синтетическое. Эффективность экспрессии может быть усилена путем включения пригодных энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см. Bittner et al., *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

Кроме того, может быть выбран штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленной последовательности или модифицирует и процессирует генный продукт конкретным желательным образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функционирования белка. Разные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Пригодные клеточные линии или системы хозяев могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного чужеродного белка. С этой целью могут быть использованы эукариотические клетки-хозяева, обладающие клеточными механизмами для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, без ограничений, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NS0, HeLa, VERY, почки новорожденного хомяка (ВНК), почки обезьяны (COS), MDCK, 293, 3T3, WI38, человеческой почечноклеточной карциномы (например, Нер G2), клеточные линии рака молочной железы, такие как, например, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, и клеточные линии нормальной молочной железы, такой как, например, CRL7030 и Hs578Bst.

Механизмы гликозилирования разных типов клеток могут продуцировать антитела с составами гликозилирования, отличными от других типов клеток, или без гликозилирования, как в случае бактериальных клеток. В одном аспекте типами клеток, пригодными для продуцирования анти- $\alpha 4\beta 7$ антител, являются клетки млекопитающих, такие как NS0 или клетки CHO. В одном аспекте клетки млекопитающих могут включать делецию фермента, участвующего в клеточном метаболизме, и экзогенный ген, представляющий интерес, может быть функционально связан с замещающим ферментом, например, в конструкте или векторе для введения в клетки, например, путем трансформации или трансфекции. Конструкт или вектор с экзогенным геном создает для клеток-хозяев конструкта или вектора селекционное преимущество, способствующее продуцированию полипептида, кодируемым экзогенным геном. В одном варианте исполнения клетки CHO представляют собой клетки DG44 (Chasin and Urlaub (1980) *PNAS USA* 77:4216), включающие делецию или инактивацию гена дигидрофолатредуктазы. В другом варианте исполнения клетки CHO представляют собой клетки CHO K1, включающие делецию или инактивацию гена глутаминсинтазы (см., например, патенты США №№ 5122464 или 5827739).

Твердые композиции.

Твердые композиции по изобретению обычно получают высушиванием жидкой композиции. Может быть использован любой пригодный способ высушивания, такой как лиофилизация или распылительная сушка. Лиофилизация предусматривает замораживание жидкой композиции обычно в контейнере, который будет использоваться для хранения, транспортировки и распространения композиции (например, флакон) (см., например, Gatlin and Nail в *Protein Purification Process Engineering*, ed. Roger G. Hargison, Marcel Dekker Inc., 317-367 (1994)). После замораживания композиции атмосферное давление снижают и температуру регулируют таким образом, чтобы обеспечить удаление замороженного растворителя, например, путем сублимации. Эта стадия процесса лиофилизации иногда называется первичным высушиванием. При необходимости, температура может быть затем поднята для удаления какого-либо растворителя, остающегося связанным с сухой композицией, путем испарения. Эта стадия процесса лиофилизации иногда называется вторичным высушиванием. В тех случаях, когда композиция достигла желательной степени сухости, процесс высушивания завершается и контейнеры герметизируют. Готовую твердую композицию иногда называют "лиофилизированной композицией" или "сухарем" (cake). Процесс лиофилизации может быть проведен с использованием любого пригодного оборудования. Пригодное оборудование для лиофилизации является доступным из ряда коммерческих источников (например, SP Scientific, Stone Ridge, NY).

Различные пригодные аппараты могут быть использованы для высушивания жидких композиций для получения твердой (например, лиофилизированной) композиции. Обычно квалифицированные специалисты в данной области техники получают лиофилизированные композиции путем использования герметичной камеры, имеющей полки, на которых размещают флаконы с жидкой композицией для высушивания. Температура полок, а также скорость охлаждения и нагревания, могут контролироваться так же, как и давление внутри камеры. Следует понимать, что различные параметры процесса, описанные в настоящем изобретении, относятся к процессам, осуществляемым с использованием этого типа аппаратов. Рядовые специалисты при необходимости могут легко адаптировать параметры, описанные в настоящем изобретении, к другим типам аппаратов для высушивания.

Пригодные температуры и величина вакуума для первичного и вторичного высушивания могут быть легко определены рядовым специалистом. В общем, композицию замораживают при температуре примерно -30°C или ниже, такой как -40 или -50°C . Скорость охлаждения может влиять на количество и размеры кристаллов льда в матрице. Первичное высушивание обычно проводят при температуре на примерно 10, примерно 20, примерно 30, примерно 40 или примерно 50°C выше температуры замораживания. В одном аспекте условия первичного высушивания могут быть установлены для поддержания анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела ниже температуры стеклования или температуры коллапса композиции. Выше температуры коллапса аморфная замороженная матрица может течь (коллапсировать), в результате чего молекулы белка могут не быть окружены жесткой твердой матрицей и молекулы белка могут не быть стабильными в коллапсированной матрице. Также композицию может быть трудно полностью высушить в случае коллапса. Получаемые при этом более высокие количества влаги в композиции могут приводить к более высоким скоростям деградации белка и уменьшению продолжительности времени, в течение которого лиофилизированный продукт может храниться до снижения его качества до неприемлемого уровня. В одном аспекте температуру полки и давление в камере выбирают для поддержания температуры продукта ниже температуры коллапса при первичном высушивании. Температура стеклования замороженной композиции может быть измерена способами, известными специалистам, например дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК). Температура коллапса может быть измерена способами, известными специалистам, например микроскопии с вымораживанием жидкой фазы. Соотношение невосстанавливаемого сахара к белку (моль:моль) и количества других компонентов композиции будут влиять на температуру стеклования и температуру коллапса. В некоторых вариантах исполнения температура стеклования для композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет от примерно -35 до примерно -10°C , от примерно -35 до примерно -25°C или от примерно -35 до примерно -29°C . В другом варианте исполнения температура стеклования композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет примерно -29°C . В некоторых вариантах исполнения температура стеклования композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет примерно -30 , примерно -31 , примерно -32 , примерно -33 , примерно -34 , примерно -35 или примерно -36°C . В некоторых вариантах исполнения температура коллапса композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет от примерно -30 до примерно 0°C , от примерно -28 до примерно -25°C или от примерно -20 до примерно -10°C . В другом варианте исполнения температура коллапса композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет примерно -26°C . Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, укажем, что чем выше скорость нагрева, тем выше будет температура коллапса продукта. Первичная стадия высушивания может удалять по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70% или больше растворителя. В одном аспекте первичная стадия высушивания удаляет более 80% растворителя из композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Первичное высушивание зависит от температуры полки и давления. Условия первичного высушивания могут быть определены эмпирически путем проведения лиофилизации при разных параметрах процесса. Первичное высушивание также может быть математически смоделировано на основе температуры продукта. Уравнения массо- и теплопередачи (Milton, et al. (1997) PDA J of Pharm Sci & Tech, 51: 7-16) в сочетании со знанием значений R_p и K_v , позволяет понять комбинацию и взаимодействие входных переменных, включая входные переменные процесса, такие как температура полки и давление, и переменные композиции, входящие в значение R_p . Такие модели могут помочь определить параметры, которые должны использоваться для обеспечения эффективного процесса, на основании ограничений, накладываемых на температуру продукта температурой коллапса и производительностью оборудования.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A_p(P_o - P_c)}{R_p} \quad \ln P_o = -6144,96/T_p$$

Уравнение 1

Уравнение 2

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

Уравнение 3

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

Уравнение 4

Уравнение 1 связывает скорость сублимации (dm/dt) при первичном высушивании с площадью внутреннего поперечного сечения контейнера (A_p), давлением пара льда (P_o), давлением в камере (P_c) и нормированным по площади сопротивлением массопереносу для брикета и пробки (R_p). P_o на поверхности раздела сублимации может быть определено из уравнения 2, где P_o относится к температуре льда продукта на поверхности раздела сублимации, которая принимается приблизительно равной температуре продукта (T_p), которую можно измерить с помощью термпары на дне флакона, или может быть определена из приведенных выше уравнений после определения всех остальных переменных. Уравнение 3 связывает скорость теплопередачи от полки к флаконам, где A_v обозначает площадь флакона, K_v обозначает коэффициент теплопередачи флакона, T_s обозначает температуру полки и T_p обозначает температуру продукта. Уравнение 4 связывает уравнения тепло- и массопереноса, где ΔH_s обозначает теплоту сублимации.

Как видно из уравнений для первичного высушивания, на скорость сублимации могут влиять тем-

пература полки (T_s), температура продукта (T_p), давление в камере (P_c), сопротивление массопереносу брикета (R_p) и коэффициент теплопередачи (K_v).

Необязательной стадией после замораживания и перед первичным высушиванием является отжиг. На этой стадии температуру полки лиофилизатора поднимают выше температуры стеклования композиции на короткий период времени, например примерно 2-6 ч, примерно 3-5 ч или примерно 4 ч, после чего температуру полки снова снижают до значения ниже температуры стеклования композиции. Отжиг может быть использован для кристаллизации наполнителей и для образования более крупных, более однородных кристаллов льда. Процесс отжига может влиять на время восстановления, поскольку подвергнутый отжигу высушенный брикет имеет большую площадь поверхности, чем высушенный брикет, который не был подвергнут отжигу. Стадия отжига композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ может проводиться при температуре от примерно -30 до примерно -10°C или от примерно -25 до примерно -15°C . В одном аспекте температура отжига композиции антитела $\alpha 4\beta 7$ составляет примерно -20°C .

Вторичное высушивание обычно проводят при температуре выше температуры замораживания жидкой композиции. Например, вторичное высушивание может быть проведено при примерно 10 , примерно 20 , примерно 30 , примерно 40 или примерно 50°C . В одном аспекте температура вторичного высушивания представляет собой температуру окружающей среды, например $20-30^\circ\text{C}$. Время вторичного высушивания должно быть достаточным для уменьшения количества влаги до $<5\%$.

В другом аспекте цикл лиофилизации включает замораживание при примерно -45°C , отжиг при примерно -20°C , повторное замораживание при примерно -45°C , первичное высушивание при примерно -24°C и 150 мторр ($0,02$ кПа) и вторичное высушивание при примерно 27°C и 150 мторр.

R_p зависит от содержания твердых веществ в замороженном DP и от тепловой предыстории DP (стадии замораживания, отжига и повторного замораживания), которые влияют на пористую структуру брикета. Тепловая предыстория может также влиять на стадию вторичного высушивания, когда большая площадь поверхности может способствовать десорбции воды (Pikal, et al. (1990) Int. J. Pharm., 60: 203-217). Параметрами процесса, которые полезно контролировать на стадиях первичной и вторичной лиофилизации, могут быть температура полки и давление в камере на каждой стадии цикла высушивания.

При масштабировании загрузка сублимационной сушилки и содержание твердых веществ могут влиять на цикл высушивания. Время первичного высушивания может зависеть от содержания твердых веществ в композиции. При более высоком содержании твердых веществ, например, когда общая концентрация твердых веществ (эксципиентов и/или белка) находится, например, в диапазоне значений более 10 или более 15% мас./об., отличаясь на величину от 50 до 100% от композиций, время высушивания которых было определено, время высушивания может меняться. Например, композиция с высоким содержанием твердых веществ может иметь большее время высушивания, чем композиция с низким содержанием твердых веществ. В некоторых вариантах исполнения процент загрузки сублимационной сушилки по производительности может изменяться в диапазоне значений от примерно 25 до примерно 100% . При большем проценте загрузки по производительности время первичного высушивания может увеличиваться до 2 раз по сравнению с меньшим процентом загрузки по производительности. Разница между временами первичного высушивания при разных процентах загрузки возрастает с увеличением содержания твердых веществ. В одном варианте исполнения содержание твердых веществ составляет менее $20-25\%$ и загрузка находится в диапазоне значений $25-100\%$.

Размер флакона может быть выбран на основании площади поверхности, которая будет контактировать с полкой вакуума во время лиофилизации. Время высушивания прямо пропорционально высоте слоя, поэтому размер флакона может быть выбран на основании высоты слоя осадка, которая будет определена как разумная. Флакон с большей величиной отношения диаметра к объему может обеспечивать больший контакт с полкой для эффективной теплопередачи на протяжении цикла лиофилизации. Разбавленный раствор антитела в большом объеме жидкости потребует большего времени для высушивания. Необходимо обеспечить баланс между размером флакона и объемом композиции, потому что флаконы большего размера могут требовать больших затрат при хранении и транспортировке и имеют большее соотношение пустого пространства к композиции и могут увеличивать долю композиции, подверженную разрушительным эффектам влаги при долгосрочном хранении. Для дозы 300 мг композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела может иметь объем перед лиофилизацией, равный 3 , 5 , 6 , 10 , 20 , 50 или 100 мл. В одном аспекте размер флакона составляет 20 мл для 60 мг/мл раствора при дозе 300 мг.

После лиофилизации флакон может быть герметизирован, например закрыт пробкой, под вакуумом. Альтернативно, перед герметизацией во флакон может быть впущен газ, например сухой воздух или азот. В тех случаях, когда существует проблема окисления, газ, запускаемый в камеру лиофилизации, может включать газ, который замедляет или предотвращает окисление лиофилизированного продукта. В одном аспекте газ представляет собой бескислородный газ, например азот, или инертный газ, например гелий, неон, аргон, криптон или ксенон. В другом аспекте газ представляет собой азот или аргон.

В некоторых вариантах исполнения объем композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела перед лиофилизацией является таким же, как и объем восстановленного раствора перед введением. Например, композиция, имевшая перед лиофилизацией объем примерно $5,5$ мл, может быть восстановлена до объема, равного

примерно 5,5 мл, путем прибавления такого количества жидкости, например воды или солевого раствора, которое учитывает объем сухих твердых веществ. В других вариантах исполнения может быть желательным лиофилизировать композицию анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела в объеме, отличном от объема восстановленного раствора. Например, композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела может быть лиофилизирована в виде разбавленного раствора, например 0,25 \times , 0,5 \times или 0,75 \times , и восстановлена до 1 \times путем прибавления меньшего количества жидкости, например на 75% меньше, наполовину или на 25% меньше, чем объем перед лиофилизацией. В варианте исполнения доза 300 мг может быть лиофилизирована в виде раствора 30 мг/мл антитела в 5% сахарозе и восстановлена до раствора 60 мг/мл антитела в 10% сахарозе. Альтернативно, лиофилизированная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела может быть восстановлена до более разбавленного раствора, чем композиция перед лиофилизацией.

Лечение композицией антитела.

В одном аспекте изобретение предусматривает способ лечения болезни или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, описанной в настоящем изобретении, в количестве, эффективном для лечения болезни или расстройства, например, у людей. Человек может быть взрослым (например, 18 лет или старше), подростком или ребенком. Человек может быть особой в возрасте 65 лет или старше. В отличие от альтернативных терапевтических режимов дозирования, человек в возрасте 65 лет или старше не требует какой-либо модификации режима дозирования, описанного в настоящем изобретении, и ему может быть введена обычная композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, описанная в настоящем изобретении.

Субъект может демонстрировать отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или непереносимость лечения иммуномодулятором, антагонистом TNF- α или их комбинациями. Пациент может ранее получать лечение воспалительной болезни кишечника по меньшей мере одним кортикостероидом (например, преднизолоном).

Неадекватный ответ на кортикостероиды относится к признакам и симптомам персистентно активной формы болезни вопреки анамнезу по меньшей мере одной 4-недельной схемы индукции, которая включает эквивалент дозы преднизона 30 мг в день перорально в течение 2 недель или внутривенно в течение 1 недели. Потеря ответа на кортикостероиды относится к двум неудачным попыткам снизить кортикостероиды до уровня ниже соответствующего эквиваленту дозы преднизона 10 мг в день перорально. Непереносимость кортикостероидов включает анамнез синдрома Кушинга, омтеопении/омтеопороза, гипергликемии, бессонницы и/или инфекции.

Иммуномодулятор может быть, например, азатиоприном перорально, 6-меркаптопурином или метотрексатом. Неадекватный ответ на иммуномодулятор относится к признакам и симптомам персистентно активной болезни вопреки анамнезу по меньшей мере одной 8-недельной схемы или азатиоприна перорально ($\geq 1,5$ мг/кг), 6-меркаптопурина ($\geq 0,75$ мг/кг) или метотрексата ($\geq 12,5$ мг/неделю). Непереносимость иммуномодуляторов включает, без ограничений, тошноту/рвоту, боль в животе, панкреатит, аномалии функциональной пробы печени (LFT), лимфопению, генетическую мутацию тиопуринометилтрансферазы (TPMT) и/или инфекцию.

В одном аспекте субъект может демонстрировать отсутствие адекватного ответа с потерей ответа или непереносимостью лечения антагонистом ФНО- α . Антагонист ФНО- α (фактор некроза опухоли- α), например, представляет собой агент, который ингибирует биологическую активность ФНО- α и предпочтительно связывает ФНО- α , такой как моноклональное антитело, например ремикейд (инфликсимаб), хумира (адалimumаб), симзия (цертолизумаб пегол), сипони (голимумаб) или циркулирующий рецепторный слитый белок, такой как энзьрел (этанерцепт). Неадекватный ответ на антагонист ФНО- α относится к признакам и симптомам персистентно активной формы болезни вопреки анамнезу по меньшей мере одной 4-недельной схемы индукции инфликсимабом 5 мг/кг внутривенно (IV), 2 дозы с промежутком по меньшей мере 2 недели; одна 80 мг подкожная доза адалimumаба, с последующей одной 40 мг дозой с промежутком по меньшей мере в две недели; или 400 мг подкожно цертолизумаба пегола, 2 дозы с промежутком по меньшей мере в 2 недели. Потеря ответа на антагонист ФНО- α относится к рецидиву симптомов на стадии поддерживающего дозирования после ранее достигнутого клинического эффекта. Непереносимость антагониста ФНО- α включает, без ограничений, реакции, ассоциированные с инфузией, демиелинизацию, застойную сердечную недостаточность и/или инфекцию.

Потеря поддержания ремиссии в используемом тут значении для субъектов с неспецифическим язвенным колитом относится к увеличению оценки по шкале Мейо по меньшей мере на 3 балла и оценке по модифицированной шкале Вагон, равной по меньшей мере 2.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антител, которые (1) могут связывать интегрин $\alpha 4\beta 7$ *in vitro* и/или *in vivo*; и (2) могут модулировать активность или функцию интегрин $\alpha 4\beta 7$, такую как (а) функция связывания (например, способность интегрин $\alpha 4\beta 7$ связываться с MAdCAM (например, MAdCAM-1), фибронектином и/или VCAM-1) и/или (б) функция фильтрации лейкоцитов, включая рекрутмент и/или накопление лейкоцитов в тканях (например, способность ингибировать миграцию лейкоцитов к кишечной мукозальной ткани). В одном варианте исполне-

ния антитело в композиции может связывать интегрин $\alpha 4\beta 7$ и может ингибировать связывание интегрин $\alpha 4\beta 7$ с одним или несколькими из его лигандов (например, MAdCAM (например, MAdCAM-1), VCAM-1, фибронектин), тем самым ингибируя инфильтрацию тканей лейкоцитами (включая рекрутмент и/или накопление лейкоцитов в тканях). В другом варианте исполнения антитело в композиции может связывать интегрин $\alpha 4\beta 7$ и может селективно ингибировать связывание интегрин $\alpha 4\beta 7$ с одним или несколькими из его лигандов (например, MAdCAM (например, MAdCAM-1), VCAM-1, фибронектин), тем самым ингибируя инфильтрацию тканей лейкоцитами (включая рекрутмент и/или накопление лейкоцитов в тканях). Такие композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антител могут ингибировать клеточную адгезию клеток, несущих интегрин $\alpha 4\beta 7$, с клетками сосудистого эндотелия в мукозальных тканях, включая кишечник-ассоциированные ткани, лимфоидные органы или лейкоциты (особенно лимфоциты, такие как Т- или В-клетки) *in vitro* и/или *in vivo*. В еще одном варианте исполнения композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по настоящему изобретению может ингибировать взаимодействие $\alpha 4\beta 7$ с MAdCAM (например, MAdCAM-1) и/или фибронектином. В еще одном варианте исполнения композиция анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по настоящему изобретению может селективно ингибировать взаимодействие $\alpha 4\beta 7$ с MAdCAM (например, MAdCAM-1) и/или фибронектином, например, без ингибирования взаимодействия $\alpha 4\beta 7$ с VCAM.

Композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антител по настоящему изобретению могут быть использованы для модулирования (например, ингибирования (уменьшения или предотвращения)) функции связывания и/или функции инфильтрации лейкоцитов (например, лимфоцитов, моноцитов) интегрин $\alpha 4\beta 7$. Например, гуманизированные иммуноглобулины, ингибирующие связывание интегрин $\alpha 4\beta 7$ с лигандом (т.е. одним или несколькими лигандами), могут вводиться в соответствии со способом лечения заболеваний, ассоциированных с инфильтрацией лейкоцитов (например, лимфоцитов, моноцитов) в ткани (включая рекрутмент и/или накопление лейкоцитов в тканях), в частности в ткани, экспрессирующие молекулу MAdCAM (например, MAdCAM-1).

Эффективное количество композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по настоящему изобретению (т.е. одного или нескольких) вводят индивидууму (например, млекопитающему, такому как человек или другой примат) с целью лечения такой болезни. Например, воспалительные болезни, включая болезни, ассоциированные с инфильтрацией лейкоцитами желудочно-кишечного тракта (включая кишечник-ассоциированный эндотелий), другие мукозальные ткани или ткани, экспрессирующие молекулу MAdCAM (например, MAdCAM-1) (например, кишечник-ассоциированные ткани, такие как вены собственной пластинки тонкой и толстой кишки; и молочной железы (например, молочной железы в период лактации)), можно лечить в соответствии со способом по настоящему изобретению. Аналогично, индивидуум, имеющий болезнь, ассоциированную с инфильтрацией лейкоцитов в ткани в результате связывания лейкоцитов с клетками (например, эндотелиальными клетками), экспрессирующими MAdCAM (например, MAdCAM-1), может получать лечение в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте исполнения болезни, которые можно лечить, соответственно включают воспалительную болезнь кишечника (ВБК), такую как неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, илеит, глютеновую болезнь, нетропическую спру, энтеропатию, ассоциированную с серонегативными артропатиями, микроскопический или коллагеновый колит, эозинофильный гастроэнтерит или резервуарный илеит, возникающий после проктоколэктомии и илеоанального анастомоза. Предпочтительно воспалительная болезнь кишечника представляет собой болезнь Крона или неспецифический язвенный колит. Неспецифический язвенный колит может быть от умеренной до тяжелой активной формы неспецифического язвенного колита. Лечение может приводить к заживлению слизистой у пациентов, страдающих от умеренной до тяжелой активной формы неспецифического язвенного колита. Лечение может также приводить к уменьшению, прекращению или уменьшению и прекращению применения кортикостероида пациентом.

Другими болезнями, которые можно лечить с использованием композиции по изобретению, являются панкреатит и инсулин-зависимый сахарный диабет. Сообщалось, что MAdCAM (например, MAdCAM-1) экспрессируется некоторыми сосудами в экзокринной поджелудочной железе NOD (не страдающих ожирением диабетических) мышей, а также *from* BALB/c и SJL мышей. Сообщалось, что экспрессия MAdCAM-1 индуцируется на эндотелии воспаленных островков поджелудочной железы NOD-мыши, и MAdCAM-1 был преимущественным адрессином, экспрессируемым эндотелием островков NOD на ранних стадиях инсулита (Hanninen, A., et al., *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)). Лечение NOD-мышей с использованием анти-MAdCAM (например, анти-MAdCAM-1) или анти- $\beta 7$ антител предотвращало развитие диабета (Yang et al., *Diabetes*, 46:1542-1547 (1997)). Кроме того, наблюдалось накопление лимфоцитов, экспрессирующих $\alpha 4\beta 7$ в островках, и MAdCAM-1 был задействован в связывании клеток лимфомы через $\alpha 4\beta 7$ с сосудами воспаленных островков (Hanninen, A., et al., *J. Clin. Invest.*, 92: 2509-2515 (1993)) или с желудочно-кишечным трактом в лимфоме из клеток мантии (Geissmann et al., *Am. J. Pathol.*, 153:1701-1705 (1998)).

Примеры воспалительных болезней, ассоциированных с мукозальными тканями, которые можно лечить с использованием композиции по изобретению, включают холецистит, холангит (Adams and Eksteen *Nature Reviews* 6:244-251 (2006) Grant et al., *Hepatology* 33:1065-1072 (2001)), например первичный

склерозирующий холангит, болезнь Бехчета, например, кишечника или перихолангит (желчный проток и окружающая ткань печени) и болезнь "трансплантат против хозяина" (например, в желудочно-кишечном тракте (например, после трансплантации костного мозга) (Petrovic et al. Blood 103:1542-1547 (2004)). Как видно при болезни Крона, воспаление часто выходит за пределы мукозальной поверхности, соответственно восприимчивыми к лечению могут быть хронические воспалительные болезни, такие как саркоидоз, хронический гастрит, например аутоиммунный гастрит (Katakai et al., Int. Immunol., 14:167-175 (2002)), и другие идиопатические состояния.

Изобретение также относится к способу ингибирования инфильтрации лейкоцитами мукозальной ткани. Изобретение также относится к способу лечения рака (например, $\alpha 4\beta 7$ -положительная опухоль, такая как лимфома). Другие примеры воспалительных болезней, ассоциированных с мукозальными тканями, которые можно лечить с использованием композиции по изобретению, включают мастит (молочной железы) и синдром раздраженного кишечника.

Болезни или патогены, этиологии которых задействуют взаимодействие MAdCAM (например, MAdCAM-1) с $\alpha 4\beta 7$, можно лечить анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом в композициях, описанных в настоящем изобретении. Примеры таких болезней включают иммунодефицитные расстройства, такие как вызванные вирусом иммунодефицита человека (см., например, WO2008140602).

Композицию по изобретению вводят в эффективном количестве, ингибирующем связывание интегрин $\alpha 4\beta 7$ с его лигандом. Для терапии эффективное количество будет достаточным для достижения желательного терапевтического (включая профилактический) эффекта (таким как количество, достаточное для уменьшения или предотвращения интегрин $\alpha 4\beta 7$ -медируемого связывания и/или передачи сигналов, тем самым ингибируя адгезию и инфильтрацию лейкоцитов и/или ассоциированные клеточные ответы). Эффективное количество анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, например эффективный титр, достаточный для поддержания насыщения, например нейтрализации, интегрин $\alpha 4\beta 7$, может индуцировать клинический ответ или ремиссию воспалительной болезни кишечника. Композиция по изобретению может быть введена в виде разовой дозы или кратных доз. Дозировка может быть определена способами, известными специалистам, и может зависеть, например, от возраста индивидуума, восприимчивости, толерантности и общего самочувствия. Примеры схем введения включают местные пути, такие как назальное или ингаляционное или трансдермальное введение, энтеральные пути, такие как через питательную трубку или суппозиторий, и парентеральные пути, такие как внутривенное, внутримышечное, подкожное, интраартериальное, интраперитонеальное или интравитреальное введение. Пригодные дозы антитела могут составлять от примерно 0,1 до примерно 10,0 мг/кг веса тела за одно введение, например от примерно 2 до примерно 7 мг/кг, от примерно 3 до примерно 6 мг/кг или от примерно 3,5 до примерно 5 мг/кг. В конкретных вариантах исполнения вводимая доза составляет примерно 0,3, примерно 0,5, примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9 или примерно 10 мг/кг.

Готовая лекарственная форма, например, после разбавления восстановленного анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела (например, в системе для инфузии с солевым раствором или 5% декстрозой) может иметь концентрацию для введения от примерно 0,5 до примерно 5 мг/мл. Готовая лекарственная форма может иметь концентрацию от примерно 1,0 до примерно 1,4 мг/мл, от примерно 1,0 до примерно 1,3 мг/мл, от примерно 1,0 до примерно 1,2 мг/мл, от примерно 1,0 до примерно 1,1 мг/мл, от примерно 1,1 до примерно 1,4 мг/мл, от примерно 1,1 до примерно 1,3 мг/мл, от примерно 1,1 до примерно 1,2 мг/мл, от примерно 1,2 до примерно 1,4 мг/мл, от примерно 1,2 до примерно 1,3 мг/мл или от примерно 1,3 до примерно 1,4 мг/мл. Готовая лекарственная форма может иметь концентрацию примерно 0,6, 0,8, 1,0, 1,1 мг/мл, примерно 1,2, примерно 1,3, примерно 1,4, примерно 1,5, примерно 1,6, примерно 1,8 или примерно 2,0 мг/мл. В одном варианте исполнения общая доза составляет 180 мг. В другом варианте исполнения общая доза составляет 300 мг. Доза 300 мг анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела может быть разбавлена 250 мл солевого раствора или 5% раствора декстрозы для введения.

В некоторых аспектах режим дозирования имеет две фазы, индукционную фазу и поддерживающую фазу. В индукционной фазе, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят способом, быстро обеспечивающим эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пригодное для определенных целей, таких как индуцирование иммунной толерантности к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или для индуцирования клинического ответа и облегчения симптомов воспалительной болезни кишечника. Пациенту может быть проведена индукционная фаза лечения при его начальном лечении анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом, при лечении после длительного перерыва в терапии, например более трех, более четырех, более шести, более девяти месяцев, более одного года, более восемнадцати месяцев или более двух лет после терапии анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом, или во время поддерживающей фазы терапии анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом, если наблюдается возврат симптомов воспалительной болезни кишечника, например рецидив из ремиссии болезни. В некоторых вариантах исполнения режим индукционной фазы приводит к более высокому значению средней минимальной остаточной концентрации, например концентрации непосредственно перед введением следующей дозы, чем средняя минимальная остаточная концентрация в состоянии равновесия в сыворотке, поддерживаемая на протяжении

поддерживающего режима.

В поддерживающей фазе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят способом, обеспечивающим продолжение ответа, достигнутого при индукционной терапии, со стабильным уровнем антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Поддерживающий режим может предотвращать возврат симптомов или рецидив воспалительной болезни кишечника. Поддерживающий режим может обеспечивать удобство для пациента, например представлять собой простой режим дозирования или требовать нечастых поездок для лечения. В некоторых вариантах исполнения поддерживающий режим может включать введение анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в композиции, описанной в настоящем изобретении, в соответствии со стратегией, выбранной из группы, состоящей из низких доз, нечастого введения, самовведения и комбинации любых вышеперечисленных элементов.

В одном варианте исполнения, например во время индукционной фазы терапии, режим дозирования предусматривает эффективное количество анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела или антигенсвязывающего фрагмента в композиции, описанной в настоящем изобретении, для индуцирования ремиссии воспалительной болезни кишечника у пациента. В некоторых вариантах исполнения эффективное количество анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела является достаточным для достижения средней минимальной остаточной концентрации анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела от примерно 5 до примерно 60 мкг/мл, от примерно 15 до примерно 45 мкг/мл, от примерно 20 до примерно 30 мкг/мл или от примерно 25 до примерно 35 мкг/мл к концу индукционной фазы. Продолжительность индукционной фазы может составлять примерно четыре недели, примерно пять недель, примерно шесть недель, примерно семь недель или примерно восемь недель лечения. В некоторых вариантах исполнения схема индукции может использовать стратегию, выбранную из группы, состоящей из высокой дозы, частого введения и комбинации высокой дозы и частого введения анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в композиции, описанной в настоящем изобретении. Индукционная доза может быть введена один раз или множество раз, составляющее несколько доз, например по меньшей мере две дозы. На протяжении индукционной фазы доза может вводиться раз в день, через день, два раза в неделю, раз в неделю, раз в десять дней, раз в две недели или раз в три недели. В некоторых вариантах исполнения индукционная доза вводится в первые две недели терапии анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом. В одном варианте исполнения индукционная доза может быть введена один раз при начале лечения (день 0) и один раз примерно через две недели после начала лечения. В другом варианте исполнения продолжительность индукционной фазы составляет шесть недель. В другом варианте исполнения продолжительность индукционной фазы составляет шесть недель, и множество индукционных доз вводится в течение первых двух недель.

В некоторых вариантах исполнения, например, при начале лечения пациента с тяжелой воспалительной болезнью кишечника (например, пациентов с неудачной анти-ФНО α терапией) индукционная фаза должна иметь большую продолжительность, чем у пациентов со слабой или умеренной формой болезни. В некоторых вариантах исполнения индукционная фаза для пациента с тяжелой болезнью может иметь продолжительность, составляющую по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12 или по меньшей мере 14 недель. В одном варианте исполнения индукционный режим дозирования для пациента с тяжелой болезнью может включать дозу в неделю 0 (начало лечения), дозу в неделю 2 и дозу в неделю 6. В другом варианте исполнения индукционный режим дозирования для пациента с тяжелой болезнью может включать дозу в неделю 0 (начало лечения), дозу в неделю 2, дозу в неделю 6 и дозу в неделю 10.

В одном варианте исполнения, например, на протяжении поддерживающей фазы терапии режим дозирования поддерживает среднюю минимальную остаточную концентрацию в состоянии равновесия в сыворотке, например концентрацию плато непосредственно перед введением следующей дозы, от примерно 5 до примерно 25 мкг/мл, от примерно 7 до примерно 20 мкг/мл, от примерно 5 до примерно 10 мкг/мл, от примерно 10 до примерно 20 мкг/мл, от примерно 15 до примерно 25 мкг/мл или от примерно 9 до примерно 13 мкг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. В другом варианте исполнения режим дозирования, например, на протяжении поддерживающей фазы терапии поддерживает среднюю минимальную остаточную концентрацию в состоянии равновесия в сыворотке от примерно 20 до примерно 30 мкг/мл, от примерно 20 до примерно 55 мкг/мл, от примерно 30 до примерно 45 мкг/мл, от примерно 45 до примерно 55 мкг/мл или от примерно 35 до примерно 40 мкг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Доза может быть введена раз в неделю, раз в 2 недели, раз в 3 недели, раз в 4 недель, раз в 6 недель, раз в 8 недель или раз в 10 недель. Более высокая или более частое введение дозы, например раз в неделю, раз в 2 недели, раз в 3 недели или раз в 4 недели, может быть полезным для индуцирования ремиссии активной формы болезни или для лечения нового пациента, например, для индуцирования толерантности к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу. Меньшая частота введения доз, например раз в 4 недели, раз в 5 недель, раз в 6 недель, раз в 8 недель или раз в 10 недель, может быть полезной для профилактической терапии, например, для поддержания ремиссии у пациента с хронической болезнью. В одном аспекте схема лечения предусматривает проведение лечения в день 0, примерно в неделю 2, примерно в неделю 6 и через каждые 4 или 8 недель после этого. В одном варианте исполнения поддерживающий режим включает введе-

ние дозы раз в 8 недель. В варианте исполнения, когда пациент на поддерживающем режиме с введением дозы раз в восемь недель испытывает возврат одного или нескольких симптомов болезни, например имеет рецидив, частота введения доз может быть увеличена, например, до раза в 4 недели.

Доза может быть введена пациенту в течение примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35 или примерно 40 мин.

Режим дозирования может быть оптимизирован для индукции клинического ответа и клинической ремиссии воспалительной болезни кишечника у пациента. В некоторых вариантах исполнения режим дозирования не изменяет соотношение CD4 к CD8 в спинномозговой жидкости пациентов, получающих лечение.

В некоторых аспектах стойкая клиническая ремиссия, например клиническая ремиссия, которая сохраняется на протяжении по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех посещений лечащего врача на протяжении периода времени шесть месяцев или один год после начала лечения, может быть достигнута при оптимизированном режиме дозирования.

В некоторых аспектах стойкий клинический ответ, например клинический ответ, сохраняющийся на протяжении по меньшей мере 6, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере одного года после начала лечения, может быть достигнут при оптимизированном режиме дозирования.

В одном варианте исполнения режим дозирования включает начальную дозу 300 мг, вторую последовательную дозу 300 мг примерно через две недели после начальной дозы, третью последовательную дозу 300 мг через примерно шесть недель после начальной дозы, с последующей четвертой и последующими дозами 300 мг раз в четыре недели или раз в восемь недель после третьей последовательной дозы.

В некоторых вариантах исполнения способ лечения, доза или режим дозирования уменьшают вероятность развития у пациента НАНА-ответа на анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело. Развитие НАНА, например, измеряемое по антителам, реактивным к анти- $\alpha 4\beta 7$ антителу, может увеличить клиренс анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, например снизить концентрацию в сыворотке анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, например уменьшить число анти- $\alpha 4\beta 7$ антител, связанных с интегрином $\alpha 4\beta 7$, тем самым снижая эффективность лечения. В некоторых вариантах исполнения для предотвращения НАНА пациента можно лечить по схеме индукции с последующим поддерживающим режимом. В некоторых вариантах исполнения между схемой индукции и поддерживающим режимом отсутствует перерыв. В некоторых вариантах исполнения схема индукции включает введение пациенту множества доз анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Для предотвращения НАНА пациента можно лечить с высокой начальной дозой, например по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2, по меньшей мере 2,5, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5, по меньшей мере 8, по меньшей мере 10 мг/кг или от примерно 2 до примерно 6 мг/кг, или с частыми начальными введениями, например примерно раз в неделю, примерно раз в две недели или примерно раз в три недели, стандартной дозы при начале терапии анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом. В некоторых вариантах исполнения способ лечения поддерживает по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95% пациентов в НАНА-отрицательном состоянии. В других вариантах исполнения способ лечения поддерживает пациенты в НАНА-отрицательном состоянии в течение по меньшей мере 6, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 недель, по меньшей мере шести месяцев, по меньшей мере 1 года, по меньшей мере 2 лет или на протяжении периода проведения терапии. В некоторых вариантах исполнения пациенты или по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 60% пациентов, у которых развивается НАНА, сохраняют низкий титр, например ≤ 125 , анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. В варианте исполнения способ лечения поддерживает по меньшей мере 70% пациентов в НАНА-отрицательном состоянии в течение по меньшей мере 12 недель после начала терапии анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом.

Композиция может быть введена индивидууму (например, человеку) сама по себе или в сочетании с другим агентом. Композиция по изобретению может быть введена до, одновременно с, или после введения дополнительного агента. В одном варианте исполнения вводят несколько композиций, ингибирующих связывание интегрин $\alpha 4\beta 7$ с его лигандами. В таком варианте исполнения может быть введен агент, например моноклональное антитело, такое как анти-MAdCAM (например, анти-MAdCAM-1) или анти-VSCAM-1 моноклональное антитело. В другом варианте исполнения дополнительный агент ингибирует связывание лейкоцитов с эндотелиальным лигандом в пути, отличном от пути $\alpha 4\beta 7$. Такой агент может ингибировать связывание, например, хемокинового (C-C мотив) рецептора 9 (CCR9)-экспрессирующих лимфоцитов экспрессированным тимусом хемокином (TECK или CCL25) или агентом, который препятствует связыванию LFA-1 с молекулой межклеточной адгезии (ICAM). Например, в дополнение к композиции по настоящему изобретению вводят анти-TECK или анти-CCR9 антитело или ингибитор малой молекулы CCR9, такой как ингибиторы, раскрытые в публикациях PCT WO03/099773 или WO04/046092, или анти-ICAM-1 антитело или олигонуклеотид, предотвращающий экспрессию ICAM. В еще одном варианте исполнения дополнительный активный ингредиент (например, противовоспалительное соединение, такое как сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурин, противовоспалительные средства, содержащие 5-аминосалициловую кислоту, другое нестероидное противовоспалительное соединение, стероидное противовоспалительное соединение или антибиотики, которые обычно вво-

дят для борьбы с ВБК (например, ципрофлоксацин, метронидазол) или другой биологический агент (например, антагонисты ФНО-альфа) может быть введен в сочетании с композицией по настоящему изобретению.

В варианте исполнения доза совместно вводимого лекарственного препарата может снижаться со временем на протяжении периода лечения с помощью композиции, содержащей анти- $\alpha 4\beta 7$ антитело. Например, пациент, которого лечат стероидом (например, преднизолоном, преднизолоном) в начале или перед лечением композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, будет следовать схеме со снижением дозы стероида, начиная с 6 недель лечения композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. Доза стероида будет уменьшена примерно на 25% на протяжении 4-8 недель после начала снижения, до 50% через примерно 8-12 недель и 75% через примерно 12-16 недель уменьшения дозы во время лечения композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела. В одном аспекте примерно через 16-24 недель лечения композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, доза стероида может быть отменена. В другом примере пациент, которого лечат противовоспалительным соединением, таким как 6-меркаптопурин, в начале или перед лечением композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, будет следовать схеме с уменьшением доз противовоспалительного соединения, аналогичной схеме уменьшения дозы стероида, описанной выше.

В одном варианте исполнения способ включает введение пациенту эффективного количества композиции по изобретению. Если композиция находится в твердой форме, например в сухом состоянии, процесс введения может включать стадию превращения композиции в жидкое состояние. В одном аспекте сухая композиция может быть восстановлена, например, жидкостью, как описано выше, для использования в инъекции, например внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции. В другом аспекте твердая или сухая композиция может быть введена местно, например, в виде пластыря, крема, аэрозоля или суппозитория.

Изобретение также относится к способу лечения болезни, ассоциированной с инфильтрацией лейкоцитами тканей, экспрессирующих молекулу MAdCAM (например, MAdCAM-1). Способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по изобретению. В варианте исполнения болезнь представляет собой болезнь "трансплантат против хозяина". В некоторых вариантах исполнения болезнь представляет собой болезнь, ассоциированную с инфильтрацией лейкоцитами тканей в результате связывания лейкоцитов, экспрессирующих интегрин $\alpha 4\beta 7$, с кишечник-ассоциированным эндотелием, экспрессирующим молекулу MAdCAM (например, MAdCAM-1). В других вариантах исполнения болезнь представляет собой гастрит (например, эозинофильный гастрит или аутоиммунный гастрит), панкреатит или инсулинзависимый сахарный диабет. В других вариантах исполнения болезнь представляет собой холецистит, холангит или перихолангит.

Изобретение также относится к способу лечения воспалительной болезни кишечника у пациента. В одном варианте исполнения способ включает введение пациенту эффективного количества композиции анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела по изобретению. В некоторых вариантах исполнения воспалительная болезнь кишечника представляет собой неспецифический язвенный колит или болезнь Крона. В других вариантах исполнения воспалительная болезнь кишечника представляет собой глютеновую болезнь, энтеропатию, ассоциированную с серонегативными артропатиями, микроскопический или коллагеновый колит, гастроэнтерит (например, эозинофильный гастроэнтерит) или резервуарный илеит.

В некоторых вариантах исполнения лечение анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом не изменяет соотношения CD4:CD8 лимфоцитов. Соотношения CD4:CD8 могут быть измерены в крови, аспирате лимфатических узлов и спинномозговой жидкости (СМЖ). Соотношения CD4+:CD8+ лимфоцитов в СМЖ здоровых особ типично имеют значения больше или равные примерно 1 (Svenningsson et al., J. Neuroimmunol. 1995;63:39-46; Svenningsson et al., Ann Neurol. 1993; 34:155-161). Иммуномодулятор может изменять соотношение CD4:CD8 до значений менее 1.

Промышленные изделия.

В другом аспекте изобретение представляет собой изделие, содержащее фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, и предусматривает инструкции по его использованию. Изделие содержит контейнер. Пригодные контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы, флакон жидкой композиции с иглой или без нее, флакон твердой композиции с флаконом жидкости для восстановления или без него и с иглой или без нее), шприцы (такие как двухкамерные шприцы, предварительно наполненные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть сформован из различных материалов, таких как стекло, металл или пластик. Контейнер содержит композицию, а ярлык на контейнере или ассоциированный с ним может содержать указания по использованию. В другом варианте исполнения композиция может быть подготовлена для самовведения и/или содержать инструкции для самовведения. В одном аспекте контейнер, содержащий композицию, может быть флаконом для одноразового использования. В другом аспекте контейнер, содержащий композицию, может быть флаконом для многократного использования, позволяющим осуществлять повторное введение (например, 2-6 введений) композиции, например, с использованием нескольких порций восстановленной композиции. Изделие может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с

инструкциями по применению, как указано в предыдущем разделе.

Клинические анализы и анализ качества.

В другом аспекте изобретение предусматривает способ определения соответствия фармацевтической композицией стандартам качества продукта. Способ может включать оценку лиофилизированной фармацевтической композиции (например, гуманизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела), включающую осмотр композиции для оценки внешнего вида, определение времени восстановления, определение влагосодержания лиофилизированной композиции, измерение агрегатов в лиофилизированной композиции, измерение фрагментации, измерение окисления/деамидирования и, необязательно, оценку биологической активности и эффективности, где достижение предварительно определенных стандартов демонстрирует, что продукт показан для клинического применения.

Приемлемые уровни качества включают влажность $\leq 5,0\%$, время восстановления ≤ 40 мин, значение pH восстановленной жидкости, равное $6,3 \pm 0,3$, концентрацию антитела от 54,0 до 66, 0 мг/мл, содержание главной изоформы $\geq 55, 0\%$ при определении методом СЕХ (катионообменной хроматографии), содержание мономер $\geq 96,0\%$ при определении методом SEC (эксклюзионной хроматографии), содержание высокомолекулярных веществ (агрегатов) $\leq 2,5\%$, содержание Н+L цепей $\geq 90\%$ при определении методом ДСН-ПААГ, показатели адгезии в пределах 60-140% от эталонного стандарта.

Изобретение можно более полно понять со ссылкой на приведенные далее примеры. Однако они не должны истолковываться как ограничивающие объем изобретения. Все литературные и патентные источники целиком включены в настоящий документ в качестве ссылок.

Разработка протокола приготовления композиции.

А. Раствор анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Бутылки с замороженным высококонцентрированным препаратом анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела (ведолизумаб, 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбат 80, pH 6,3) оттаивают при комнатной температуре в течение 16-24 ч. Оттаявшие бутылки сливают в смесительный сосуд из нержавеющей стали и перемешивают. Препарат затем разбавляют буфером для разбавления А (50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбата 80, pH 6,3) до 80 мг/мл vedoлизумаба и перемешивают. Затем прибавляют сахарозу путем разбавления препарата буфером для разбавления В, содержащим сахарозу (50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 40% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, pH 6,3). На этой стадии препарат разбавляют анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела до жидкой композиции с 60 мг/мл vedoлизумаба, 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 10% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, pH 6,3.

В. Лиофилизация.

Жидкой композицией анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела с концентрацией 60 мг/мл в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбата 80, 10% сахарозы, pH 6,3 заполняют стеклянные флаконы на 20 мл по 5,52 мл на флакон и пробки устанавливают в положение для лиофилизации. Флаконы устанавливают в лиофилизатор на полки с заданной температурой примерно 20°C. После загрузки всех флаконов и закрытия дверцы температуру полок снижают для замораживания раствора до примерно -45°C. Через 3 ч при этой температуре температуру полок повышают до -20°C для отжига. После отжига в течение 4 ч температуру полок понижают для повторного замораживания раствора до примерно -45°C. После уравнивания флаконов при этой температуре из камеры откачивают воздух. Когда давление достигает 150 мторр (0,02 кПа), температуру полок постепенно повышают до температуры первичного высушивания, равной примерно -24°C. Первичное высушивание проводится до тех пор, пока из флаконов не сублимируется весь кристаллический лед. Затем температуру полок повышают до 27°C для вторичного высушивания в течение 16 ч, пока влажность лиофилизированной композиции не достигнет значения менее приблизительно 2,5%. После завершения вторичного высушивания камеру заполняют газообразным азотом до достижения давления окружающей среды. Флаконы закрывают пробками и вынимают из лиофилизатора.

С. Хранение и использование лиофилизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела.

Флаконы с лиофилизированным анти- $\alpha 4\beta 7$ антителом хранят при -70, -20, 2-8 или 25°C на протяжении желательных периодов времени. Перед использованием флакон уравнивают при комнатной температуре. Затем содержимое флакона восстанавливают с помощью шприца, содержащего воду для инъекций ("WFI"), с использованием иглы калибра 21G. Количество воды для инъекций определяют таким образом, чтобы конечный объем восстановленного раствора антитела был равен объему раствора перед лиофилизацией. Для величины объема перед лиофилизацией, равной 5,52 мл, прибавляют 4,8 мл воды для инъекций. Флакон осторожно перемешивают с помощью вихревой мешалки, а затем выдерживают в течение 10-30 мин для восстановления композиции, после чего раствор антитела набирают в шприц и прибавляют в мешок для внутривенной (IV) инфузии пациенту.

Иллюстративные примеры

Пример 1. Сравнительные данные для переменного содержания сахара и аминокислот (%) в лиофилизированных композициях.

Была разработана схема эксперимента с целью изучения эффекта изменения молярного соотношения сахара (сахарозы и маннита) к белку, молярного соотношения аргинина к белку и молярного количе-

ства гистидинового буфера. Известно, что гистидин и аргинин не кристаллизуются в процессе лиофилизации, что делает их потенциальными крио- или лиопротектантами. Помещают во флаконы на 5 по 1,5 мл композиции, лиофилизируют при первичном высушивании при -30°C , 150 мторр и вторичном высушивании при 20°C , 150 мторр. Стабильность лиофилизированных композиций, восстановленных до 1,5 мл после хранения в разных условиях, приведена в табл. 1-3 (объединяющих результаты двух экспериментов для 60 мг/мл). Фиг. 6А изображает прогностические модели изменения процентного содержания мономера, процентного содержания агрегатов и процентного содержания главной изоформы для хранения при 40°C с меняющимися значениями pH и молярного соотношения сахара и аргинина. Стабильность композиции была наилучшей при низком pH и высоком молярном соотношении (сахар + аргинин) к белку. При исследованных молярных количествах гистидина он не влиял на стабильность композиции. Все композиции имели влажность при хранении 1-2%.

Таблица 1
Изменение процентного содержания мономера в условиях хранения при $5^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}$ (относительной влажности) и $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$ в течение 3 месяцев. Процентное содержание мономера измеряли методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

Композиция 60 мг/мл ведолизумаба +	% мономера по методу SEC			
	t=0	5°C 3 мес.	25°C 60%RH 3 мес.	40°C 75% RH 3 мес.
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, pH 6,3	98,1	98,1	97,8	96,5
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, pH 6,9	98,0	98,2	98,0	97,5
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, pH 6,7	98,0	98,3	98,1	97,4
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, pH 6,9	98,0	98,3	98,1	97,4
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 6% сахарозы, 1,5% маннита, 0,06% полисорбата 80, pH 6,3	98,7	98,4	98,4	98,1
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 9% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, pH 6,3	98,7	98,3	98,1	98,3

Таблица 2
Изменения процентного содержания агрегатов при хранении при 5, 25°C/60% RH и 40°C/75% RH в течение 3 месяцев. Процентное содержание мономера измеряли методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

Композиция 60 мг/мл ведолизумаба +	% агрегатов по методу SEC			
	t=0	5°C 3 мес.	25°C 60%RH 3 мес.	40°C 75% RH 3 мес.
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,3	0,42	0,53	0,89	1,99
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,9	0,41	0,51	0,62	1,15
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,7	0,42	0,47	0,60	1,23
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,9	0,36	0,44	0,52	0,82
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 6% сахарозы, 1,5% маннита, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3	0,53	0,49	0,51	0,56
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 9% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3	0,51	0,51	0,59	0,56

Таблица 3

Изменения процентного содержания главной изоформы в условиях хранения при 5, 25°C/60% RH и 40°C/75% RH в течение 3 месяцев. Главную изоформу измеряли методом катионообменной хроматографии (СЕХ)

Композиция 60 мг/мл ведолизумаба +	% главной изоформы по методу СЕХ			
	t=0	5°C 3 мес.	25°C 60%RH 3 мес.	40°C 75% RH 3 мес.
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,3	70,5	68,8	67,4	66,3
25 мМ гистидина, 75 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,9	70,8	98,9	68,0	67,7
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 2% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,7	70,5	68,9	67,8	66,5
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 4% сахарозы, 0,05% полисорбата 80, рН 6,9	70,6	68,9	68,0	67,4
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 6% сахарозы, 1,5% маннита, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3	69,6	69,5	69,3	67,4
50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 9% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3	69,5	69,3	69,2	68,1

Фиг. 6А изображает прогностические модели, основанные на статистическом анализе данных для 40°C из табл. 1-3. Модель изменений процентного содержания мономера за месяц при 40°C, определенного методом анализа SEC, описывается уравнением $-3,10 + (0,386) \times \text{pH} + 0,000516 \times ((\text{число молей сахара} + \text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Модель изменений процентного содержания агрегатов за месяц при 40°C, определенного методом анализа SEC, имеет вид $2,43 - (0,263) \times \text{pH} - 0,000787 \times ((\text{число молей сахара} + \text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Модель изменений процентного содержания главной изоформы за месяц при 40°C, определенного методом анализа СЕХ, имеет вид $-2,54 + (0,109) \times \text{pH} - 0,00130 \times ((\text{число молей сахара} + \text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Средняя линия показывает результаты для прогностических моделей, и внешние линии показывают 95% доверительные пределы для прогностических моделей.

Фиг. 6В изображает альтернативные модели, основанные на статистическом анализе данных для 40°C из табл. 1-3, входными факторами для которых являются pH, молярное соотношение сахар:белок и молярное соотношение аргинин:белок. Модель изменений процентного содержания мономера за месяц при 40°C, определенного методом анализа SEC, имеет вид $-3,02 + (0,370) \times \text{pH} + 0,000482 \times ((\text{число молей сахара}) / \text{число молей белка}) + 0,000657 \times ((\text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Модель изменений процентного содержания агрегатов за месяц при 40°C, определенного методом анализа SEC, имеет вид $2,35 - (0,244) \times \text{pH} - 0,000727 \times ((\text{число молей сахара}) / \text{число молей белка}) - 0,00102 \times ((\text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Модель изменений процентного содержания главной изоформы за месяц при 40°C, определенного методом анализа СЕХ, имеет вид $-2,92 + (0,210) \times \text{pH} + 0,00164 \times ((\text{число молей сахара}) / \text{число молей белка}) - 0,000220 \times ((\text{число молей аргинина}) / \text{число молей белка})$. Средняя линия показывает результаты для прогностических моделей, и внешние линии показывают 95% доверительные пределы для прогностических моделей.

Пример 2. Данные по стабильности.

Были проведены испытания трех партий композиции для определения первичной стабильности (партии А, В и С) на стабильность после хранения в заданных условиях хранения (5 и 25°C/60% RH на протяжении до 24 месяцев). Все три партии содержали одну и ту же жидкую композицию, которую подвергали лиофилизации: 60 мг/мл анти- $\alpha 4\beta 7$ антитела, 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 10% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3. Для партии А 3,5 мл раствора помещали во флаконы на 20 мл и лиофили-

зировали, для партий В и С 5,52 мл раствора помещали во флаконы на 20 мл и лиофилизировали.

В отдельных исследованиях одну композицию лекарственного препарата с 60 мг/мл анти- α 4 β 7 антитела, 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 10% сахарозы, 0,06% полисорбата 80, рН 6,3, лиофилизировали в двух объемах - 3,5 и 9,5 мл соответственно, для получения партий R и S образцов на стабильность, которые анализировали на протяжении 38 месяцев. Холостые пробы не тестировались (NT).

Данные (табл. 4-19) продемонстрировали, что композиции антител оставались стабильными при хранении на протяжении до 38 месяцев при 5°C и до 30 месяцев при 25°C/60% RH. Все характеристики продуктов не выходили за пределы, установленные техническими условиями, до момента времени 38 месяцев.

Таблица 4

Изменение процентного содержания мономера, определяемого методом SEC, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,8	99,2
3	99,8	99,1	99,1	98,8	98,8
6	99,8	99,8	99,8	98,9	99,0
9	99,1	99,2	99,2	99,2	99,1
12	99,4	99,0	99,0	98,8	98,9
15	99,4	99,1	99,1		
18	99,5	99,4	99,4	98,9	98,9
24	99,4	99,2	99,2	99,0	99,0
30		99,2	99,2		
38				99,3	99,3

Таблица 5

Изменения процентного содержания агрегатов, определяемого методом SEC, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1
3	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
9	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
15	0,2	0,2	0,2		
18	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
30		0,2	0,2		
38				0,2	0,2

Таблица 6

Изменения процентного содержания главной изоформы,
определяемого методом СЕХ, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,5	68,9	68,8	71,2	72,0
3	68,7	68,8	68,7	70,4	70,3
6	67,7	68,2	68,2	71,9	71,9
9	70,0	68,3	67,8	69,2	69,7
12	67,8	68,3	68,1	70,8	70,9
15	66,9	67,5	67,5		
18	67,4	67,0	66,7	71,0	70,8
24	68,1	69,6	69,1	71,3	70,9
30		68,5	68,6		
38				73,6	73,1

Таблица 7

Изменение процентного содержания кислотных изоформ,
определяемого по методу СЕХ, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,7	22,3	21,6	20,3
3	21,7	22,2	22,8	22,0	22,0
6	22,9	23,1	23,6	21,1	21,4
9	19,8	22,2	22,9	21,8	21,8
12	22,9	21,3	22,1	21,2	21,2
15	22,7	22,3	22,8		
18	22,8	22,3	22,6	21,1	21,5
24	21,7	22,1	22,9	20,6	20,7
30		22,8	23,2		
38				18,9	19,1

Таблица 8

Изменение процентного содержания основных изоформ,
определяемого по методу СЕХ, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,7	9,4	8,9	7,3	7,7
3	9,7	9,0	8,5	7,6	7,8
6	9,5	8,7	8,2	7,0	6,7
9	10,2	9,6	9,3	9,0	8,4
12	9,3	10,3	9,9	8,0	7,9
15	10,4	10,1	9,7		
18	9,8	10,7	10,7	7,9	7,7
24	10,2	8,3	8,1	8,1	8,3
30		8,7	8,2		
38				7,5	7,7

Таблица 9

Изменение процента (Н+L), определяемое методом ДСН-ПААГ в
восстанавливающих условиях, в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	98	98	98	96	96
1	98	94	98	98	98
3	98	98	98	98	98
6	98	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	97	98	98
15	97	98	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	98	98	99	99
30		97	97		
38				99	99

Таблица 10

Изменение эффективности связывания в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	107	106	105	93	102
1	106	106	103	103	111
3	101	109	108	91	98
6	97	106	105	114	121
9	100	93	88	102	102
12	103	101	87	119	116
15	105	90	94		
18	86	101	96	95	104
24	92	82	95	81	101
30		87	94		
38				89	91

Таблица 11

Изменение процента влажности, определяемой по методу
Фишера (KF), в условиях хранения при 5°C

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,4	0,6		
3	0,5	0,6	0,6		
6	0,6	0,7	0,5	0,8	1,3
12	0,6	0,6	0,7	0,9	0,9
24	0,5	0,7	0,7	0,9	0,9
30		0,7	0,7		

Таблица 12

Изменение процентного содержания мономера, определяемого по методу SEC, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	99,8	99,8	99,8	98,9	98,8
1	99,8	99,1	99,2	98,7	98,7
3	99,8	99,0	99,0	98,6	98,5
6	99,8	99,7	99,7	98,9	98,9
9	99,0	99,1	99,1	99,1	99,1
12	99,3	98,9	98,9	98,8	98,9
15	99,3	99,0	99,0		
18	99,4	99,3	99,3	98,7	98,9
24	99,2	99,1	99,1	98,9	98,9
30		99,0	99,0		

Таблица 13

Изменения процентного содержания агрегатов, определяемого по методу SEC, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
9	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
12	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
15	0,3	0,3	0,3		
18	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
24	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
30		0,4	0,3		

Таблица 14

Изменения процентного содержания главной изоформы, определяемого по методу SEC, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	68,6	69,9	69,5	71,7	71,6
1	67,2	68,4	68,6	71,2	71,0
3	68,1	68,6	68,2	70,3	70,3
6	65,9	67,8	67,8	71,5	71,1
9	69,3	67,5	66,3	68,6	69,0
12	66,7	67,5	67,4	70,1	70,2
15	66,2	66,6	66,8		
18	66,1	65,8	64,9	70,0	70,3
24	66,7	68,4	68,2	70,6	70,1
30		67,2	67,2		

Таблица 15

Изменение процентного содержания кислотных изоформ, определяемого по методу СЕХ, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	22,8	20,8	21,4	20,3	20,6
1	21,9	21,8	22,2	21,4	21,6
3	21,7	22,2	22,8	21,8	22,0
6	22,6	22,9	23,5	21,1	21,4
9	19,9	22,1	23,1	21,8	21,8
12	23,0	21,4	22,0	21,3	21,3
15	22,5	22,1	22,7		
18	22,6	22,1	22,6	21,3	21,5
24	21,7	21,9	22,6	20,7	20,7
30		22,7	23,2		

Таблица 16

Изменение процентного содержания основных изоформ, определяемого по методу СЕХ, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	8,5	9,3	9,1	8,1	7,8
1	10,8	9,8	9,2	7,4	7,3
3	10,3	9,3	9,0	7,8	7,7
6	11,5	9,3	8,7	7,4	7,5
9	10,8	10,4	10,6	9,7	9,3
12	10,3	11,1	10,7	8,7	8,5
15	11,3	11,2	10,6		
18	11,2	12,1	12,5	8,7	8,2
24	11,6	9,7	9,1	8,7	9,2
30		10,2	9,6		

Таблица 17

Изменение процента (H+L), определяемое методом ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	98	98	98	96	96
1	98	98	98	98	98
3	97	98	98	98	98
6	97	97	97	97	97
9	97	97	97	98	98
12	98	96	96	98	98
15	97	97	97		
18	98	97	97	99	99
24	98	97	98	99	99
30		97	98		

Таблица 18

Изменение эффективности связывания в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	107	106	105	93	102
1	115	103	109		
3	92	113	100	96	94
6	109	89	97	101	114
9	97	89	85	97	102
12	83	91	123		
15	96	91	96		
18	106	123	87	92	102
24	103	82	90	98	94
30		84	114		

Таблица 19

Изменение процента влажности, определяемой по методу Фишера, в условиях хранения при 25°C/60%RH

Время (месяцев)	Партия А	Партия В	Партия С	Партия R	Партия S
0	0,5	0,6	0,6	0,8	1,0
1	0,5	0,6	0,5		
3	0,5	0,7	0,6		
6	0,5	0,7	0,7	1,3	1,2
12	0,6	0,8	0,6	0,9	1,0
24	0,7	0,8	0,6	1,1	1,0
30		0,8	0,7		

Катионообменная хроматография (СЕХ).

Градиент фосфата/хлорида натрия на колонке со слабым катионообменником использовали в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии для выделения заряженных материалов в композиции анти- $\alpha\beta 7$ антител и определения заряда материалов композиции антитела. Кислотные изоформы элюируются раньше главной изоформы, а основные изоформы элюируются после главной изоформы.

Данные по стабильности для всех партий ведолизумаба, полученные с использованием анализа методом СЕХ, приведены в табл. 3, 6-8 и 14-16. Таблицы показывают, что в таких условиях хранения не наблюдалось тенденции снижения процента главной изоформы до значений ниже 55,0%.

Эксклюзионная хроматография (SEC).

Эксклюзионную хроматографию (SEC) проводят с использованием колонки для аналитической SEC (Tosoh Bioscience, LLC, King of Prussia, PA). Подвижная фаза представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор, и оптическое поглощение контролируют при 280 нм.

Данные по стабильности, полученные с использованием метода анализа SEC, приведены в табл. 1, 2, 4, 5, 12 и 13. Таблицы показывают, что ни одни из перечисленных условий хранения не приводили к снижению процента мономера ниже 96,0%. Аналогично, процентные агрегаты оставались $\leq 2,5\%$ для всех партий во всех перечисленных условиях хранения.

Анализ ДСН-ПААГ.

ДСН-ПААГ проводят с использованием Трис-глицинового геля фирмы Invitrogen (Carlsbad, CA), 4-20% для восстанавливающих условий и 4-12% для невосстанавливающих условий. Восстановленный образец композиции антитела разбавляют в буфере жидкой композиции, затем разбавляют один к двум буфером Трис-глицин ДСН для образца (2 \times , Invitrogen) с 10% 2-меркаптоэтанола (восстанавливающий буфер образца) или без 2-меркаптоэтанола (невосстанавливающий буфер образца). Образцы кратковременно нагревают и загружают для анализа в сравнении с маркером молекулярного веса (Invitrogen). Гели окрашивают коллоидным кумасси синим (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Полосы белка анализируют методом денситометрии для определения процента тяжелой и легкой цепей для восстановленных гелей и процента IgG для невосстановленных гелей.

Данные по стабильности, полученные с использованием метода анализа ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях приведены в табл. 9 и 17. Не наблюдалось заметных изменений в проценте тяжелых + легких цепей (H+L) во всех перечисленных условиях хранения для всех партий, использованных для определений стабильности. Характер сегментации был аналогичен эталонному стандарту и процент (H+L)

оставался на уровне $\geq 90\%$.

Эффективность связывания.

Клетки Н1Т78 (клетки Т-клеточной лимфомы человека, American Type Culture Collection, Manassas, VA), суспендированные в 1% BSA (бычий сывороточный альбумин) в PBS (фосфатно-солевой буфер), вводят в контакт с 0,01% азидом натрия с серийными разведениями первичного испытуемого антитела. После инкубации на льду клетки промывают и обрабатывают флуоресцентно меченым вторичным антителом. После дополнительного промывания клетки фиксируют и суспендируют в реагенте FACS для анализа методом проточной цитометрии (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ); см. также патент США № 7147851.

Эффективность связывания ведолизумаба измеряли по отношению к эталонному стандарту и определяли в проценте от эталонного стандарта и ЕС50. Данные по стабильности приведены в табл. 10 и 18. Данные для процента от эталонного стандарта показали наличие изменчивости, но оставались в пределах, определенных техническими условиями, во всех условиях хранения. Ни одна из исследованных партий ведолизумаба не продемонстрировала тенденции к снижению эффективности связывания в перечисленных условиях хранения.

Влажность по методу Карла Фишера.

Композицию титруют метанолом для кулонометрического определения влажности по методу Карла Фишера. Данные по влажности приведены в табл. 11 и 19. Все исследованные партии ведолизумаба имели влажность менее 5% во всех перечисленных условиях хранения.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF).

Проводят cIEF с использованием системы iCE280 с детектированием на полной колонке cIEF (Convergent Biosciences, Toronto, Ontario). Амфолит может быть выбран в соответствии с рекомендациями производителя или может быть комбинацией коммерчески доступных амфолитов. Пригодной комбинацией является смесь 3-10 и 5-8 PHARMALYTE™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Пример 3. Моделирование масштабирования процесса лиофилизации.

Был использован принцип "качество на этапе проектирования" при манипулировании загрузкой сублимационной сушилки и содержанием твердых веществ в композиции. Загрузка изменялась от 33 до 100%. Содержание твердых веществ в композиции изменялось от 9 до 27% путем включения в загрузку композиций с концентрациями, составляющими 0,5×, 1,0× и 1,5× от целевой композиции. Эти композиции имели близкие значения T_g . При более высоком содержании твердых веществ (%) время первичного высушивания возрастало. Кроме того, при увеличении содержания твердых веществ температура продукта возрастала вследствие более высокого значения R_p . Загрузка также оказывала влияние на обе стадии высушивания (фиг. 8).

Пример 4. Неклинические исследования безопасности.

Были спроектированы исследования для сравнения эффекта натализумаба и ведолизумаба на иммунологический надзор ЦНС при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) макака-резус. Восемь животных получали дозы контроля плацебо, раз в неделю. Семь животных получали дозы 30 мг/кг натализумаба, раз в неделю. Семь животных получали дозы 30 мг/кг ведолизумаба, раз в неделю. Наблюдались клинические симптомы ЭАЭ; частоту и соотношение подгрупп лейкоцитов в СМЖ измеряли методом проточной цитометрии; общую нагрузку поражениями T2 в мозгу измеряли с использованием магниторезонансной визуализации (МРВ) и нагрузку поражениями и демиелинизацию мозга измеряли путем гистопатологии.

Ведолизумаб не задерживает начало проявления клинических симптомов ЭАЭ по сравнению с контролем плацебо. Он не снижает частоту случаев ЭАЭ или величину клинических показателей. Натализумаб значительно ($p < 0,05$) задерживает проявление клинических симптомов ЭАЭ по сравнению с контролем плацебо. Он снижает частоту случаев ЭАЭ и величину клинических показателей (фиг. 9).

Ведолизумаб не предотвращает инфильтрацию СМЖ лейкоцитами, Т-лимфоцитами (Т-лимфоцитами-помощниками, цитотоксичными Т-лимфоцитами), В-лимфоцитами, природными клетками-убийцами или моноцитами. В отличие от него, натализумаб ингибировал инфильтрацию СМЖ.

Ведолизумаб не ингибирует накопление поражений мозга, на что указывают повышенные значения T2 и пониженные значения MTR (коэффициент передачи намагничивания), полученные при МРВ. Натализумаб предотвращал образование поражений у всех животных, кроме одного. Значительное ($p < 0,05$) ингибирование в инфильтратах мозга и демиелинизацию измеряли гистологически.

Интегрин $\alpha 4\beta 7$ был насыщен ведолизумабом при проведении исследований, на что указывает анализ методом конкурентного связывания между ведолизумабом, вводимым *in vivo*, и аналитическим анти- $\alpha 4\beta 7$ моноклональным антителом (mAb), добавляемым *ex vivo*. Аналитическое анти- $\alpha 4\beta 7$ mAb не связывается с Т-лимфоцитами-помощниками памяти у животных, получавших дозы ведолизумаба. Отсутствие эффекта ведолизумаба в ЦНС поэтому связано с ЖКТ-тропной биологией интегрин $\alpha 4\beta 7$.

В общем, ведолизумаб (антагонист $\alpha 4\beta 7$) не ингибирует ЭАЭ. В отличие от него, натализумаб (антагонист $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$) ингибирует ЭАЭ. Интегрин $\alpha 4\beta 1$ медирует инфильтрацию ЦНС при ЭАЭ. Таким образом, ведолизумаб может характеризоваться меньшим риском вызывать предрасположенность

пациентов к PML (прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия), чем натализумаб, поскольку он не антагонизирует интегрин $\alpha 4\beta 1$ и не нарушает иммунологический надзор ЦНС при ЭАЭ у резусамака.

Пример 5. Клинические испытания фазы I с использованием ведолизумаба.

49 здоровых субъектов были рандомизированы и получили разовую дозу исследуемого лекарственного препарата: 39 субъектов получили ведолизумаб (5 мг/мл антитела, 20 мМ цитрата/лимонной кислоты, 125 мМ хлорида натрия, 0,05% полисорбата 80, pH 6,0 (долгосрочное хранение при -70°C и до 3 месяцев при -20°C)) и 10 субъектов получили плацебо. Из 39 субъектов, которые получили ведолизумаб, по 8 субъектов получили каждый дозы 0,2, 2,0, 6,0 и 10,0 мг/кг, и 7 субъектов получили ведолизумаб 0,5 мг/кг. Все 49 субъектов завершили испытания.

Не наблюдалось заметной разницы между когортами ведолизумаба по любым демографическим показателям или характеристикам базовой линии. Средний возраст составлял от 35,4 лет до 51,0 года; возраст индивидуальных субъектов менялся в диапазоне от 21 года до 63 лет.

Фармакокинетические (ПК) результаты.

Ведолизумаб был введен в виде 30-минутной внутривенной инфузии от 0,2 до 10,0 мг/кг. Значения C_{\max} и площадь под кривой зависимости концентрации препарата в сыворотке от времени (AUC) возрастали с увеличением дозы. Скорректированные по дозе значения C_{\max} были приблизительно одинаковыми для всех когорт, что указывает на пропорциональность доз по этому параметру. Нормированное по дозе значение площади под кривой концентрации препарата в сыворотке от начала отсчета времени до бесконечности ($AUC_{0-\text{inf}}$) возрастало с увеличением дозы до 2,0 мг/кг, указывая на нелинейный рост $AUC_{0-\text{inf}}$ с увеличением дозы для более низких доз, использовавшихся в данных испытаниях. Затем $AUC_{0-\text{inf}}$ возрастала пропорционально дозе, указывая на линейность зависимости $AUC_{0-\text{inf}}$ в диапазоне доз от 2,0 до 10,0 мг/кг. Увеличение $AUC_{0-\text{inf}}$ превышало ожидаемые значения приблизительно в 2,4-раза при дозе 10,0 мг/кг по сравнению с дозой 0,2 мг/кг.

Аналогично, оценки клиренса, объема распределения и периода полувыведения были дозозависимыми для диапазона доз от 0,2 до 2,0 мг/кг. С увеличением дозы клиренс уменьшался, объем распределения возрастал и, вследствие этого, период полувыведения увеличивался. Однако от 2 до 10,0 мг/кг не наблюдалось видимых изменений этих параметров, что позволяет предположить насыщение процесса быстрой элиминации для ведолизумаба в низких концентрациях. Более медленные процессы линейной элиминации, вероятно, обеспечивают большую часть клиренса ведолизумаба при более высоких дозах.

У некоторых субъектов, у которых вырабатывались НАНА к ведолизумабу, наблюдался более быстрый клиренс ведолизумаба по сравнению с НАНА-отрицательными субъектами с соответствующим уровнем доз.

Таблица 20

Обзор фармакокинетики (ПК) ведолизумаба (VDZ) по дозовым когортам после внутривенного (IV) введения 0,2-10,0 мг/кг ведолизумаба здоровым субъектам (популяция для ПК-анализа)

Параметр	Доза VDZ	N	Среднее	Ст. откл.	Геом. среднее	%CV	Медиана	Мин.	Макс.
C _{max} (мкг/мл)	0,2 мг/кг	4	5,65	0,629	5,62	11,1	5,45	5,13	6,56
	0,5 мг/кг	4	10,6	2,09	10,4	19,7	10,6	8,07	13,1
	2,0 мг/кг	7	59,3	11,6	58,4	19,6	58,4	47,6	78,4
	6,0 мг/кг	6	151	19,1	150	12,6	157	120	168
	10,0 мг/кг	7	243	22,1	243	9,07	242	213	281
AUC _{0-last} (день*мкг/мл)	0,2 мг/кг	4	31,6	4,98	31,3	15,8	31,6	25,7	37,5
	0,5 мг/кг	4	127	48,0	119	37,9	129	70,9	178
	2,0 мг/кг	7	964	147	955	15,2	972	772	1170
	6,0 мг/кг	6	3090	749	3020	24,2	2830	2360	4100
	10,0 мг/кг	7	4870	624	4840	12,8	4750	4120	5870
AUC _{0-inf} (день*мкг/мл)	0,2 мг/кг	4	39,5	5,79	39,1	14,7	40,2	31,7	45,7
	0,5 мг/кг	4	134	48,9	127	36,5	134	79,2	188
	2,0 мг/кг	7	979	146	969	14,9	993	784	1180
	6,0 мг/кг	6	3100	750	3030	24,2	2840	2390	4110
	10,0 мг/кг	7	4880	637	4850	13,0	4750	4130	5920
V _z (л)	0,2 мг/кг	4	4,02	0,151	4,02	3,76	4,03	3,83	4,18
	0,5 мг/кг	4	4,92	0,620	4,89	12,6	4,66	4,52	5,84
	2,0 мг/кг	7	3,34	0,665	3,28	19,9	3,23	2,29	4,27
	6,0 мг/кг	6	2,98	0,644	2,92	21,6	2,98	2,06	3,98
	10,0 мг/кг	7	2,89	1,02	2,73	35,2	2,98	1,49	4,58
CL (л/день)	0,2 мг/кг	4	0,413	0,042	0,412	10,1	0,395	0,388	0,476
	0,5 мг/кг	4	0,310	0,106	0,297	34,3	0,291	0,212	0,446
	2,0 мг/кг	7	0,165	0,018	0,164	10,7	0,162	0,145	0,194
	6,0 мг/кг	6	0,140	0,031	0,136	22,0	0,145	0,083	0,166
	10,0 мг/кг	7	0,140	0,024	0,139	16,9	0,135	0,103	0,171
t _{1/2} (день)	0,2 мг/кг	4	6,79	0,736	6,76	10,8	6,95	5,79	7,47
	0,5 мг/кг	4	11,7	2,83	11,4	24,2	11,4	9,09	14,8
	2,0 мг/кг	7	14,1	2,67	13,9	18,9	14,3	10,6	17,5
	6,0 мг/кг	6	15,1	3,15	14,8	20,9	14,0	11,9	20,3
	10,0 мг/кг	7	14,8	7,38	13,7	49,8	12,5	8,26	30,7

Сокращения: AUC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного препарата от времени, экстраполированная до бесконечности; AUC_{0-last} = площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного препарата от времени от момента введения до момента последнего измерения, при котором концентрация была выше нижнего предела количественного определения; CL = общий клиренс; C_{max} = максимальная концентрация лекарственного препарата; t_{1/2} = период полувыведения; V_z = объем распределения, определенный на основе фазы выведения.

После достижения C_{max} концентрация ведолизумаба в сыворотке снижается обычно по моноэкспоненциальному закону до достижения концентрации приблизительно от 1 до 10 мг/л. После этого концентрации, по-видимому, снижаются нелинейно.

Значения C_{max} и AUC возрастали с увеличением дозы. Для имеющихся данных скорректированные по дозе C_{max} были приблизительно одинаковыми для всех когорт, что указывает на пропорциональность доз по этому параметру. Нормированная по дозе AUC_{0-inf} возрастала с увеличением дозы до 2,0 мг/кг, указывая на нелинейный рост AUC_{0-inf} с увеличением дозы для более низких значений доз, использованных в данных испытаниях. Затем AUC_{0-inf} увеличивалась пропорционально дозе, что указывает на линейность AUC_{0-inf} для диапазона доз от 2,0 до 10,0 мг/кг. Увеличение AUC_{0-inf} было приблизительно в 2,4-раза выше ожидаемых значений при дозе 10,0 мг/кг по сравнению с дозой 0,2 мг/кг.

Фармакодинамические (PD) результаты.

Фармакодинамические (PD) параметры ведолизумаба после 30-минутной внутривенной инфузии от 0,2 до 10,0 мг/кг ведолизумаба по когортам приведены в табл. 21 и 22 для Act-1 и MAdCAM соответственно.

Таблица 21

Обзор фармакодинамики ведолизумаба, процент ингибирования %Act-1⁺ [CD4⁺ CD45RO^{high}] по дозовым когортам после внутривенного (IV) введения 0,2-10,0 мг/кг ведолизумаба здоровым субъектам (популяция для PD-анализа)

Параметр	Доза VDZ	N	Среднее	Ст. откл.	Геом. среднее	%CV	Медиана	Мин.	Макс.
E _{max} (% ингибирования)	0,2 мг/кг	4	99,6	0,387	99,6	0,388	99,6	99,1	100
	0,5 мг/кг	4	99,5	0,599	99,5	0,602	99,5	98,9	100
	2,0 мг/кг	6	99,9	0,172	99,9	0,172	100	99,6	100
	6,0 мг/кг	6	100	0000	100	0000	100	100	100
	10,0 мг/кг	6	99,7	0,326	99,7	0,327	99,8	99,3	100
AUEC _{0-inf} (% ингибирования*день)	0,2 мг/кг	4	4030	1010	3920	25,2	4090	2760	5160
	0,5 мг/кг	4	6430	1450	6300	22,6	6530	4860	7810
	2,0 мг/кг	6	13200	623	13200	4,72	12900	12800	14500
	6,0 мг/кг	6	16700	3030	16500	18,1	16300	13300	20100
	10,0 мг/кг	6	19300	644	19300	3,33	19600	18200	19900

AUEC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости эффекта лекарственного препарата от времени: от момента времени 0 до момента времени, соответствующего последней ненулевой концентрации; E_{max} = максимальный эффект лекарственного препарата.

Таблица 22

Обзор фармакодинамики ведолизумаба, процент ингибирования %MAdCAM⁺ [CD4⁺ CD45RO^{high}] по дозовым когортам после внутривенного (IV) введения 0,2-10,0 мг/кг ведолизумаба здоровым субъектам (популяция для PD-анализа)

Параметр	Доза VDZ	N	Среднее	Ст. откл.	Геом. среднее	%CV	Медиана	Мин.	Макс.
E _{max} (% ингибирования)	0,2 мг/кг	4	99,2	0,537	99,2	0,542	99,4	98,4	99,6
	0,5 мг/кг	4	99,6	0,323	99,6	0,324	99,5	99,3	100
	2,0 мг/кг	6	99,7	0,365	99,7	0,366	99,7	99,2	100
	6,0 мг/кг	6	99,8	0,279	99,8	0,280	100	99,4	100
	10,0 мг/кг	6	100	0000	100	0000	100	100	100
AUEC _{0-inf} (% ингибирования*день)	0,2 мг/кг	4	4000	576	3970	14,4	4210	3160	4440
	0,5 мг/кг	4	6770	1400	6660	20,6	6840	5170	8230
	2,0 мг/кг	6	13000	796	13000	6,12	13000	11700	13900
	6,0 мг/кг	6	16200	3320	15900	20,5	15800	11800	20000
	10,0 мг/кг	6	17700	1330	17700	7,5	17700	16500	19000

AUEC_{0-inf} = площадь под кривой зависимости эффекта лекарственного препарата от времени: от момента времени 0 до момента времени, соответствующего последней ненулевой концентрации; E_{max} = максимальный эффект лекарственного препарата.

Ведолизумаб ингибировал фармакодинамические (PD) параметры, Act-1 и MAdCAM-1-Fc, почти максимально во все моменты времени, когда концентрация ведолизумаба в сыворотке была измеримой. После того как концентрации ведолизумаба опускались ниже предела детектирования метода анализа, ингибирование Act-1 и MAdCAM-1-Fc возвращалось приблизительно на уровень базовой линии.

У некоторых субъектов, у которых вырабатывались НАНА к ведолизумабу, наблюдалась более быстрая утрата насыщения рецепторов α4β7 по сравнению с НАНА-отрицательными субъектами с соответствующим уровнем доз.

Результаты по безопасности.

Ведолизумаб обычно был безопасным и хорошо переносился при разовых внутривенных (IV) дозах до 10,0 мг/кг. На протяжении исследований не наблюдалось случаев смерти, серьезных нежелательных эффектов (SAE) или нежелательных эффектов (AE), приводивших к прекращению участия в исследованиях.

Иммуногенность/образование человеческих антител против иммуноглобулина человека (НАНА).

Один (10%) субъект в группе плацебо и 21 (54%) субъект в объединенной группе доз ведолизумаба

были НАНА-положительными в какие-либо моменты времени на протяжении испытаний. Хотя НАНА-положительные образцы наблюдались во всех дозовых когортах, титры НАНА >125 были обнаружены только в 2 группах с наименьшими дозами ведолизумаба. Ранее для ведолизумаба наблюдалось дозозависимое подавление образования НАНА. У 19 из 22 получавших ведолизумаб субъектов, которые были НАНА-положительными, присутствие НАНА было нейтрализовано.

Таблица 23

Обзор результатов определения человеческих антител против иммуноглобулина человека: популяция испытаний безопасности

	Плацебо N=10	0,2 мг/кг VDZ N=8	0,5 мг/кг VDZ N=7	2,0 мг/кг VDZ N=8	6,0 мг/кг VDZ N=8	10,0 мг/кг VDZ N=8	Общая VDZ N=39
Субъекты, участвующие в испытаниях	10	8	7	8	8	8	39
Все НАНА-положительные, n (%)	1 (10)	6 (75)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	21 (54)
Наивысший титр НАНА <125, n (%)	1 (10)	4 (50)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	6 (75)	17 (44)
Наивысший титр НАНА ≥125, n (%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)
Все случаи нейтрализации НАНА-положительных, n (%)	0	5 (63)	4 (57)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	19 (49)
Наивысший нейтрализованный титр НАНА <125, n (%)	0	3 (38)	2 (29)	2 (25)	3 (38)	5 (63)	15 (38)
Наивысший нейтрализованный титр НАНА ≥125, n (%)	0	2 (25)	2 (29)	0	0	0	4 (10)

1 субъект в группе плацебо и 11 субъектов в группе ведолизумаба были персистентно НАНА-положительными.

Таблица 24

Общий статус человеческих антител против иммуноглобулина человека: (популяция испытаний безопасности)

	Плацебо N=10	0,2 мг/кг VDZ N=8	0,5 мг/кг VDZ N=7	2,0 мг/кг VDZ N=8	6,0 мг/кг VDZ N=8	10,0 мг/кг VDZ N=8	Общая VDZ N=39
НАНА-отрицательные ^a n (%)	9 (90)	2 (25)	3 (43)	6 (75)	5 (63)	2 (25)	18 (46)
Изолированные НАНА ^b n (%)	0	2 (25)	1 (14)	1 (13)	1 (13)	5 (63)	10 (26)
Персистентные НАНА ^c n (%)	1 (10)	4 (50)	3 (43)	1 (13)	2 (25)	1 (13)	11 (28)

^a НАНА-отрицательные: субъекты, не имеющие положительных результатов определения НАНА.

^b Изолированные НАНА: субъекты, имеющие только 1 НАНА-положительный образец с титром <25.

^c Персистентные НАНА: субъекты с 2 или больше НАНА-положительными образцами или с 1 положительным образцом с титром ≥25.

Выводы.

Эти испытания фазы 1 охарактеризовали фармакокинетику (PK)/фармакодинамику (PD) и начальные профили безопасности ведолизумаба, полученного из клеток CHO. Результаты этих испытаний были использованы для обоснования выбора доз для базовых клинических испытаний фазы 3 больных с воспалительной болезнью кишечника.

Ведолизумаб продемонстрировал пропорциональность доз в испытанном диапазоне доз для параметра C_{max} ; однако дозозависимые изменения AUC_{0-inf} , CL, V_z и $t_{1/2}$ наблюдались при дозах от 0,2 до 2,0 мг/кг, что позволяет предположить нелинейный фармакокинетический (PK) характер поведения ведолизумаба. При уровнях доз выше 2,0 мг/кг никаких дополнительных изменений этих параметров не наблюдалось, что позволяет предположить насыщение процесса быстрого элиминирования ведолизумаба при низких концентрациях. Более медленные процессы линейного элиминирования, вероятно, отвечают за большую часть клиренса ведолизумаба при более высоких дозах.

Ведолизумаб ингибировал фармакодинамические (PD) параметры, Act-1 и MAdCAM-1-Fc, при максимальных или близких к ним уровнях во все моменты времени, когда концентрация ведолизумаба в сыворотке была измеримой. После уменьшения концентрации ведолизумаба ниже предела детектирования метода анализа, ингибирование Act-1 и MAdCAM-1-Fc возвращалось на уровень, приблизительно соответствующий базовой линии.

У некоторых субъектов, у которых вырабатывались НАНА к ведолизумабу, наблюдался более быстрый клиренс ведолизумаба и утрата насыщения рецептора $\alpha 4\beta 7$ по сравнению с НАНА-отрицательными субъектами с соответствующим уровнем доз.

Ведолизумаб хорошо переносился. На протяжении исследований не наблюдалось случаев смерти, серьезных нежелательных эффектов (SAE) или нежелательных эффектов (AE), приводящих к отказу от участия в испытаниях введения лекарственного препарата, а также не наблюдалось каких-либо взаимосвязей доза-токсичность. Не было сообщений о системных оппортунистических инфекциях (включая PML (прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия)) или неоплазмах.

В отличие от неспецифических антагонистов $\alpha 4$ ведолизумаб не был ассоциирован с лимфоцитозом или увеличением средних значений циркулирующих эозинофилов, базофилов или моноцитов, также не наблюдалось свидетельств истощения лимфоцитов.

Ведолизумаб вызывал образование НАНА, но наивысшие титры (>125) наблюдались только в 2 группах наименьших доз, что подтверждает полученные ранее наблюдения о дозозависимом снижении иммуногенности. Эти данные показывают, что введение более высоких доз ведолизумаба может минимизировать клинически значимое образование НАНА.

В заключение, ведолизумаб обычно был безопасным и хорошо переносился при введении разовых доз от 0,2 до 10,0 мг/кг здоровым субъектам.

Пример 6. Определение эффекта ведолизумаба на соотношение CD4:CD8.

Здоровым субъектам в возрасте 18-45 вводили разовую дозу 450 мг ведолизумаба, восстановленного из лиофилизированной композиции с 10% сахарозы и разбавленной в системе для инфузии 0,9% солевым раствором. Спинальную жидкость (СМЖ) брали люмбальной пункцией перед (базовая линия) и через 5 недель после разовой дозы 450 мг ведолизумаба. Каждый субъект использовался в качестве своего собственного контроля.

Момент времени 5 недель был выбран на основании предыдущих испытаний, которые продемонстрировали, что пациенты с рассеянным склерозом (MS), получавшие лечение натализумабом, продемонстрировали влияние на соотношение лимфоцитов CD4+:CD8+ в СМЖ и уменьшение числа поражений мозга после всего одной дозы (Stuve et al. Arch Neurol, 2006; 63:1383-1387; Stuve et al. Алл Neurol. 2006; 59:743-747. Miller et al. N Engl J Med. 2003; 348(1):15-23); а также потому, что доза 450 мг ведолизумаба была достаточной для насыщения мишени через 5 недель и обеспечивала концентрации в сыворотке, превышающие расчетные остаточные уровни в стабильном состоянии, ассоциированные с режимом дозирования фазы 3 раз в 4 недели по 300 мг.

Приблизительно 15 мл СМЖ получали от каждого субъекта для иммунофенотипирования. Образцы СМЖ включали для проведения анализов, если они удовлетворяли следующим критериям: ≤ 10 красных кровяных клеток (RBC)/мкл на образец (для минимизирования загрязнения периферической кровью); отрицательный результат культивирования СМЖ; достаточное число Т-лимфоцитов в каждом образце для проточной цитометрии и отсутствие детектируемых антител к ведолизумабу в сыворотке.

Медианное значение для недели 5 (34,80 мкг/мл) и концентрации ведолизумаба в сыворотке для индивидуальных субъектов (диапазон значений 24,9-47,9 мкг/мл) были более высокими, чем предполагаемые остаточные концентрации в состоянии равновесия (~ 24 мкг/мл) для режима дозирования фазы 3. В неделю 5 наблюдалась высокая степень ($>90\%$) насыщения рецептора $\alpha 4\beta 7$ по результатам измерений MAdCAM-1-Fc, что указывает на насыщение ведолизумабом его мишени в момент времени, соответствующий проведению оценки конечной точки.

Ведолизумаб не детектировался ни в одном образце СМЖ (предел детектирования = 0,125 мкг/мл).

Влияние на число и соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов.

Ведолизумаб не снижал значительно соотношение CD4+:CD8+ (табл. 25). Ни у кого из субъектов не наблюдалась после введения дозы величина соотношения CD4+:CD8+ <1 ($p < 0,0001$ (1-сторонний t-критерий)). Ведолизумаб не снижал значительно число CD4+ или CD8+ Т-лимфоцитов в СМЖ. Кроме того, не наблюдалось значительных изменений % CD4+ и % CD8+ Т-лимфоцитов в СМЖ (табл. 26). Также не наблюдалось значительных изменений количеств белых кровяных клеток (WBC), CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов памяти периферической крови (табл. 27).

Таблица 25

Эффект лечения на соотношение CD4+:CD8+ в СМЖ (оцениваемая популяция, n=13)

	Базовая линия	Неделя 5	Разница соотношений CD4+:CD8+†
Среднее соотношение CD4+:CD8+ (СКО), интервал	3,59 (0,273) 1,53-5,67	3,60 (0,265)* 1,42-5,15	0,01 (0,197)
90% 2-сторонний доверительный интервал для соотношения	3,00-4,19	3,132, 4,077	
90% 2-сторонний доверительный интервал для разницы			-0,337, 0,363

CI=доверительный интервал.

* $p < 0,0001$ (односторонний t-критерий для одного образца для $H_0: \mu < 1$ vs. $H_1: \mu \geq 1$).

† Разница определяется как величина соотношения для недели 5 минус величина соотношения для базовой линии.

Таблица 26

Эффект лечения на число CD4+ и CD8+ лимфоцитов в СМЖ (оцениваемая популяция, n=13)

	Базовая линия	Неделя 5
CD4+ в % от лимфоцитов, среднее (ст.откл.)	75,160 (7,3831)	74,215 (6,3732)
CD8+ в % от лимфоцитов, среднее (ст.откл.)	22,272 (5,4320)	22,007 (6,1624)

Таблица 27

Число Т-лимфоцитов памяти периферической крови (RO+) (оцениваемая популяция, n=13)

	Базовая линия	Неделя 5
	Среднее (ст.откл.)	Среднее (ст.откл.)
CD4+CD45RO+	27,85 (4,98)	27,06 (5,02)
CD8+CD45RO+ (%)	11,24 (3,40)	10,78 (2,98)

Резюме.

Ведолизумаб не влияет на число клеток CD4+ и CD8+ в СМЖ или соотношение CD4+:CD8+ у здоровых добровольцев после разовой дозы 450 мг. Ни у одного из субъектов не наблюдалось уменьшения соотношения CD4+:CD8+ в СМЖ после введения дозы до значений менее 1. Ведолизумаб не детектировался в СМЖ. Кроме того, не наблюдалось изменений общего числа белых кровяных клеток (WBC) или подмножеств CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов памяти в периферической крови. Насыщение мишени ($\alpha 4\beta 7$) в крови наблюдалось у всех субъектов в момент времени, соответствующий конечной точке оценки. Уровни содержания и соотношение CD4+ и CD8+ лимфоцитов в СМЖ были близки к значениям, ранее описанным в литературе.

Такие результаты согласуются с отсутствием влияния ведолизумаба как на физиологический иммуннологический надзор ЦНС, так и на патологическое воспаление ЦНС у обезьян (см. пример 4).

Пример 7. Долгосрочная клиническая практика применения ведолизумаба для лечения воспалительной болезни кишечника (ВБК).

Были завершены открытые продолженные испытания безопасности фазы 2 для оценки долгосрочной фармакокинетики (PK), фармакодинамики (PD), безопасности и эффективности ведолизумаба. Пациенты имели возраст от 18 до 75 лет и или раньше участвовали в ранее проводившихся испытаниях PK/PD/безопасности пациентов с неспецифическим язвенным колитом, или имели симптомы воспалительной болезни кишечника (ВБК) в течение по меньшей мере 2 месяцев, подтвержденные эндоскопично и/или гистопатологично и/или радиологично на протяжении периода 36 месяцев после проведения скри-

нинга.

Все пациенты получали внутривенный режим дозирования или 2 или 6 мг/кг ведолизумаба (5 мг/мл антитела, 20 мМ цитрата/лимонной кислоты, 125 мМ хлорида натрия, 0,05% полисорбата 80, рН 6,0 (долгосрочное хранение при -70°C и до 3 месяцев (то) при -20°C)) в дни 1, 15 и 43, с последующим введением доз раз в 8 недель на протяжении до в общей сложности 78 недель. Пациенты или не получали ранее лечения неспецифического язвенного колита или были пациентами с болезнью Крона или пациентами с неспецифическим язвенным колитом, которые участвовали в проводившихся ранее клинических испытаниях.

Для оценки результатов данного исследования использовали показатели эффективности/качества жизни (QoL); частичную шкалу Мейо (PMS), индекс активности болезни Крона (CDAI) и опросник для воспалительной болезни кишечника (ВБК Q).

Фармакокинетические (PK) результаты.

Средние концентрации ведолизумаба перед инфузией были дозопропорциональными и оставались стабильными и детектируемыми на протяжении исследований.

Фармакодинамические (PD) результаты.

Рецепторы (%ACT-1 + [CD4+CD45RO HIGH] и %MADCAM+ [CD4+CD45RO HIGH] были почти полностью ингибированы на протяжении периода исследований при всех уровнях доз.

Частичная шкала Мейо (PMS).

Средний показатель PMS для базовой линии был выше у не получавших ранее лечения пациентов с неспецифическим язвенным колитом (5,4), чем у продолжающих лечение пациентов с неспецифическим язвенным колитом (2,3). К дню 43 средний показатель PMS демонстрировал значительное снижение как для продолжающих лечение, так и для не получавших ранее лечения пациентов с неспецифическим язвенным колитом. К дню 155 средние показатели двух групп сблизились. Средние показатели PMS продолжали снижаться до дня 267 и впоследствии выходили на плато.

Индекс активности болезни Крона (CDAI).

Среднее значение индекса активности болезни Крона (CDAI) у пациентов с болезнью Крона (CD) снижалось с 294,6 на базовой линии до 237,7 в день 43 и продолжало снижаться до дня 155 (156,1).

ВБК Q (Опросник для больных ВЗК).

Продолжающие лечение пациенты с неспецифическим язвенным колитом имели наибольшие средние показатели ВБК Q на базовой линии. К дню 43 средние показатели ВБК Q увеличивались во всех трех группах больных. Средние показатели ВБК Q продолжали возрастать со временем во всех 3 группах больных, достигая максимума в день 155 для пациентов с болезнью Крона и в день 491 для не получавших ранее лечения пациентов с неспецифическим язвенным колитом и продолжающих лечение пациентов с неспецифическим язвенным колитом.

C-реактивный белок (CRP).

Как продолжающие лечение пациенты с неспецифическим язвенным колитом, так и пациенты с болезнью Крона продемонстрировали снижение средних уровней CRP до дня 155 с последующим выходом на плато. Не получавшие ранее лечения пациенты с неспецифическим язвенным колитом имели более низкий средний уровень CRP на базовой линии, чем продолжающие лечение пациенты с неспецифическим язвенным колитом (2,28 v. 7,09). Средние уровни CRP у не получавших ранее лечения пациентов с неспецифическим язвенным колитом оставались относительно постоянными для всех проанализированных моментов времени.

Другие результаты, касающиеся безопасности.

Не было сообщений о других системных оппортунистических инфекциях (включая PML) на протяжении исследований. Для одного пациента был получен положительный результат теста на JC-вирус в один из моментов времени, при отрицательных результатах на JCV во все три других момента времени. У трех из 72 пациентов (4%) были получены положительные результаты на НАНА (два из них были транзитно положительными). Исследование не выявило свидетельств почечной токсичности, лимфоцитоза или лимфопении или любых других ассоциированных с препаратом изменений лабораторных параметров.

Выводы.

Ведолизумаб при введении в дозах 2,0 или 6,0 мг/кг раз в 8 недель на протяжении до 78 недель обеспечивал достижение насыщения рецептора-мишени, был ассоциирован с продолжительным снижением средней активности болезни и улучшением показателей ВБК Q, был обычно безопасным и хорошо переносился и продемонстрировал приемлемую иммуногенность.

Пример 8. Индукция ответа и ремиссии у пациентов с болезнью Крона от умеренной до тяжелой степени активности.

Были проведены рандомизированные двойные слепые, с контролем по плацебо многоцентровые испытания для оценки эффекта индукции ведолизумаба в дозе 300 мг (восстановленной из лиофилизированной композиции 60 мг/мл антитела в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбата 80, 10% сахарозы, при рН 6,3), у пациентов с неудачей терапии антагонистом ФНО- α в неделю 6 (после 2 доз - недели 0 и 2) и в неделю 10 (после 3 доз). В испытаниях участвовали 416 пациентов, 75% из которых

имели неудачи лечения антагонистами ФНО- α , а 25% не получали ранее ФНО- α . Группы лечения были сбалансированы демографически и по сопутствующим препаратам для лечения ВБК. Характеристики болезни базовой линии также были сбалансированы по группам лечения, за исключением активности болезни на базовой линии.

Первичной конечной точкой, предусмотренной для данных испытаний, была ремиссия на неделе 6 (%) в популяции с неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α . Ключевыми вторичными конечными точками, оценка которых проводилась (последовательная процедура проверки), были ремиссия на неделе 6 (%) от общей популяции, ремиссия на неделе 10 (%) в популяции с неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α и общей популяции (с использованием процедуры Хохберга), устойчивая ремиссия на неделе 6 и 10 (%) в популяции с неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α и общей популяции (с использованием процедуры Хохберга) и повышенный ответ в неделю 6 (%) в популяции с неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α .

Таблица 28

Индекс активности болезни Крона (CDAI) базовой линии

	Плацебо	Ведолизумаб	p-значение
ITT ФНО: Среднее (Ст.откл.)	306,1 (55,43)	316,1 (52,63)	0,0945
Полная ITT: Среднее (Ст.откл.)	301,3 (54,97)	313,9 (53,17)	0,0153

ITT (intent-to-treat) - популяция всех включенных в исследование пациентов, принявших хотя бы одну дозу препарата.

Таблица 29

Результаты исследования индукции: первичные и ключевые вторичные конечные точки

Конечные точки	ITT ФНО (N=315)				Общая ITT (N=416)			
	PLA N=157	VDZ V=158	Разн. (RR)	p-зна- чение	PLA N=207	VDZ N=209	Разн. (RR)	p-зна- чение
Первичная ремиссия Wk6	12,1 %	15,2 %	3,0 % (1,2)	0,4332				
1я вторичная ремиссия Wk6					12,1 %	19,1 %	6,9 % (1,6)	0,0478
2я вторичная ремиссия Wk10	12,1 %	26,6 %	14,4 % (2,2)	0,0012	13 %	28,7 %	15,5 % (2,2)	<0,0001
Устойчивая ремиссия (обе точки Wk 6&10)	8,3 %	12,0 %	3,7 % (1,4)	0,2755	8,2 %	15,3 %	7% (1,9)	0,0249
Повышенный ответ (CDAI100)	22,3 %	39,2 %	16,9% (1,8)	0,0011				

PLA=плацебо,
VDZ=ведолизумаб,
Wk6, Wk10=неделя 6, неделя 10.

Таблица 30

Результаты для пациентов, не получавших ранее антагониста анти-ФНО- α (n=101, 24% от общего числа)

	Плацебо %	Ведолизумаб %	Разница %	95% CI
Ремиссия неделя 6	12	31,4	19,1	(3,3, 35,0)
Ремиссия неделя 10	16	35,3	19,2	(2,4, 35,8)

Таблица 31

Результаты исследований: клиническая ремиссия в неделю 6 и 10, ключевая подгруппа - предшествующие неудачи терапии, общая ITT

Подгруппа	Переменная	Плацебо	VDZ	Разн.	95% CI
Любая предшествующая неудача анти-ФНО (75% ITT)	N	156	155		
	Рем. Wk6 (%)	12,8	14,8	2	(-5,7, 9,7)
	Рем. Wk10 (%)	12,8	26,5	13,6	(4,9, 22,3)
Предшествующая неудача иммуномодулятора, но не неудача анти-ФНО (21% ITT)	N	45	44		
	Рем. Wk6 (%)	11,1	31,8	20,7	(-0,5, 39,7)
	Рем. Wk10 (%)	15,6	31,8	16,3	(-1,1, 33,6)
Предшествующая неудача только кортикостероида (3% ITT)	N	5	9		
	Рем. Wk6 (%)	0	33,3	33,3	(-23,9, 75,7)
	Рем. Wk10 (%)	0	44,4	44,4	(-13,4, 85,3)

Испытания показали, что пациенты с неудачей антагониста ФНО- α требовали 3 дозы для индукции ремиссии. Показатели ремиссии у пациентов с неудачей антагониста ФНО- α возрастали между неделями 6 и неделями 10, но только для группы ведолизумаба (не плацебо). Показатели ремиссии для пациентов, не получавших ранее антагониста ФНО- α , не увеличивались в значительной степени между неделями 6 и 10. Из популяции с неудачей антагониста ФНО- α с высокой степенью тяжести болезни 43% никогда не реагировали на антагонист ФНО- α и 45% утрачивали ответ.

Пример 9. Индукция и поддержание ответа и ремиссии у пациентов с неспецифическим язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности.

Единые испытания, включающие два рандомизированных двойных слепых многоцентровых исследования, предназначенные для оценки индукции и поддержания ответа и ремиссии у пациентов с неспецифическим язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности. Демографические показатели и характеристики болезни базовой линии были сопоставимыми для всех групп лечения.

Испытания индукции с использованием внутривенного введения сравнивали плацебо с ведолизумабом для дозы 300 мг, восстановленной из лиофилизированной композиции 60 мг/мл антитела в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбата 80, 10% сахарозы, при pH 6,3, с конечной точкой в неделю 6 после 2 доз ведолизумаба.

Испытания поддержания с использованием той же композиции и пути введения, что и при испытаниях индукции, сравнивали плацебо с ведолизумабом при введении доз раз в четыре недели и плацебо с ведолизумабом при введении доз раз в восемь недель. Все пациенты имели возраст в диапазоне 18-80 лет, диагноз неспецифического язвенного колита от умеренной до тяжелой степени активности продемонстрировали в течение предшествующего 5-летнего периода, неадекватный ответ на потерю ответа на или непереносимость по меньшей мере одной обычной терапии (например, кортикостероидов); и могут получать терапевтическую дозу обычных терапий ВБК. Конечной точкой этих исследований был момент времени 52 недели, когда проводился анализ индукции в популяции, вырабатывающей ответ. Обе фазы испытаний достигли своих первичных конечных точек, а именно клинический ответ при индукции и клиническая ремиссия при поддержании.

Образцы крови брали для измерения концентрации ведолизумаба на протяжении исследований. Средняя концентрация ведолизумаба в сыворотке в конце индукционной фазы составляла от 20 до 30 мкг/мл. Средние остаточные концентрации ведолизумаба в сыворотке в состоянии равновесия после введения дозы 300 мг 30 мин внутривенной (IV) инфузией составляли от 9 до 13 мкг/мл для схемы введения q8wks (раз в 8 недель) и от 35 до 40 мкг/мл для схемы введения q4wks (раз в 4 недели). В конце инфузии медианные концентрации ведолизумаба в плазме составляли от 98 до 101 мкг/мл для схемы q8wks (8 недель) и примерно от 129 до 137 мкг/мл для q4wks (4 недели).

Краткие сведения о реакции на исследования индукции и поддержания приведены в табл. 32-35. Клинический ответ, ремиссия и заживление слизистой к неделе 6 были достигнуты у значительно большей части пациентов, получавших лечение ведолизумабом, по сравнению с плацебо (табл. 32). В фазе индукции 39% ITT-популяции (intent-to-treat - все включенные в исследование пациенты, принявшие хотя бы одну дозу того или иного препарата) имели предшествовавшую неудачу анти-ФНО α терапии.

Показатели клинического ответа и ремиссии были более высокими у пациентов, получавших ведолизумаб, по сравнению с плацебо, как для пациентов с предшествовавшей неудачей анти-ФНО терапии, так и для пациентов без предшествовавшей экспозиции анти-ФНО. В предварительных анализах до недели 6 показатели частоты нежелательных эффектов (АЕ), серьезных АЕ и нежелательных эффектов, приводящих к прекращению участия в исследованиях, были более высокими в группе плацебо, чем в группе ведолизумаба. У значительно большей части пациентов, получавших ведолизумаб, по сравнению с пациентами, получавшими плацебо, были достигнуты клиническая ремиссия, заживление слизистой и ремиссия без использования кортикостероидов к неделе 52, и длительный ответ и ремиссия (табл. 33). У 32% популяции исследований поддержания наблюдалась предшествующая неудача анти-ФНОα терапии. Показатели клинической ремиссии и длительного клинического ответа для ведолизумаба были выше, чем для плацебо, как у пациентов с неудачей ФНО-терапии, так и у пациентов, не получавших ФНО. В популяции исследований безопасности (N=895) для недель 0-52 показатели нежелательных эффектов (АЕ), серьезных АЕ и серьезных инфекций были близкими для групп ведолизумаба и плацебо. Не наблюдалось увеличения частоты оппортунистических или кишечных инфекций в группе ведолизумаба.

Таблица 32

Результаты исследований индукции - первичные и ключевые вторичные конечные точки

Конечные точки эффективности	Плацебо	Ведолизумаб	Разница/RR	P-значение
Клинический ответ (%)	25,5%	47,1%	21,7%/1,8	<0,0001
Клиническая ремиссия (%)	5,4%	16,9%	11,5%/3,1	0,0010
Заживление слизистой (%)	24,8%	40,9	16,1%/1,6	0,0013

Таблица 33

Результаты исследований поддержания - первичные и ключевые вторичные конечные точки

Конечная точка эффективности	Плацебо (Pb) N=126	VDZ Q8 N=122	VDZ Q4 N=125	Разница/RR Q8 vs. Pb Q4 vs. Pb	P-значение
Клиническая ремиссия (%)	15,9	41,8	44,8	26,1/2,7 29,1/2,8	<0,0001 <0,0001
Длительный ответ (%)	23,8	56,6	52,0	32,8/2,4 28,5/2,2	<0,0001 <0,0001
Заживление слизистой (%)	19,8	51,6	56,0	32,0/2,6 36,3/2,8	<0,0001 <0,0001
Длительная ремиссия (%)	8,7	20,5	24,0	11,8/2,4 15,3/2,8	0,0090 0,0011
Ремиссия без кортикостероидов (%)	13,9 n=72	31,4 n=70	45,2 N=73	17,6/2,3 31,4/3,3	0,0133 <0,0001

Таблица 34

Исследования индукции: клинический ответ и ремиссия в неделю 6 у пациентов с предшествующей неудачей терапии анти-ФНО-α антагонистом и без экспозиции анти-ФНО, ITT популяция (все включенные в исследование пациенты, принявшие хотя бы одну дозу того или иного препарата)

Пациенты с предшествующей неудачей терапии анти-ФНО-α антагонистом (39%)				
Конечная точка	Плацебо N=63	Ведолизумаб N=82	Разница	95% доверительный интервал (CI)
Клинический ответ (%)	20,6	39,0	18,4	3,9, 32,9
Клиническая ремиссия (%)	3,2	9,8	6,6	-9,8, 22,8

Пациенты без экспозиции анти-ФНО- α антагонистом (55%)				
	Плацебо N=76	Ведолизумаб N=130	Разница	95% CI
Клинический ответ (%)	26,3	53,1	26,8	13,7, 39,9
Клиническая ремиссия (%)	6,6	23,1	16,5	2,4, 30,2

Таблица 35

Клиническая ремиссия и длительный клинический ответ на неделю 52: пациенты с предшествующей неудачей терапии анти-ФНО- α антагонистом или без экспозиции анти-ФНО- α антагонистом, ИТТ популяция

Пациенты с предшествующей неудачей терапии анти-ФНО- α антагонистом (32%)					
Конечная точка	Плацебо N=38	VDZ Q8Wks N=43	VDZ Q4Wks N=40	Разница Q8wks vs. плацебо Q4wks vs. плацебо	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	5,3	37,2	35,0	31,9 29,7	10,3, 51,4 7,4, 49,4
Длительный клинический ответ (%)	15,8	46,5	42,5	30,7 26,7	11,8, 49,6 7,5, 45,9
Пациенты без экспозиции анти-ФНО- α антагонистом (60%)					
	Плацебо N=79	VDZ Q8wks N=72	VDZ Q4wks N=73	Разница Q8wks vs. плацебо Q4wks vs. плацебо	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	19,0	45,8	47,9	26,8 29,0	12,4, 41,2 14,6, 43,3
Длительный клинический ответ (%)	26,6	65,3	56,2	38,7 29,6	24,0, 53,4 14,6, 44,6

Пример 10. Индукция и поддержание ответа и ремиссии у пациентов с болезнью Крона от умеренной до тяжелой степени активности.

Единые исследования, включающие два рандомизированных двойных слепых многоцентровых испытания, предназначенные для оценки индукции и поддержания ответа и ремиссии у пациентов с болезнью Крона с от умеренной до тяжелой степени активности. Демографические показатели и характеристики болезни базовой линии были сопоставимыми для всех групп лечения.

Испытания индукции с использованием внутривенного введения сравнивали плацебо с ведолизумабом для 300 мг дозы, восстановленной из лиофилизированной композиции 60 мг/мл антитела в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, 0,06% полисорбата 80, 10% сахарозы, при pH 6,3, с конечной точкой в неделю 6 после 2 доз ведолизумаба.

Испытания поддержания с использованием той же композиции и пути введения, что и при испытаниях индукции, сравнивали плацебо с ведолизумабом при введении доз раз в четыре недели и плацебо с ведолизумабом при введении доз раз в восемь недель. Конечной точкой этих испытаний была неделя 52, когда проводился анализ индукции в популяции, вырабатывающей ответ.

Неожиданно данные испытания показали, что группы Q4 и Q8 недель дали очень схожие результаты. Сведения об ответах, наблюдавшихся в исследованиях индукции и поддержания, приведены в табл. 36-39. Значительно большая часть пациентов, получавших лечение ведолизумабом, достигала клинической ремиссии и повышенного ответа по сравнению с плацебо (табл. 36). Показатели клинической ремиссии и повышенного ответа были более высокими у пациентов, получавших ведолизумаб, по сравнению с плацебо, как для популяции с предшествующей неудачей анти-ФНО терапии, так и для пациентов

без предшествующей экспозиции анти-ФНО. Частота нежелательных эффектов (АЕ), серьезных АЕ и серьезных инфекций была схожей для групп ведолизумаба и плацебо. Не наблюдалось увеличения частоты случаев оппортунистических или кишечных инфекций в группе ведолизумаба.

Таблица 36

Результаты исследования индукции - первичные и вторичные конечные точки

Конечные точки	Плацебо N=148	Ведолизумаб N=220	Скорректированная разница/RR	P- значение
Клиническая ремиссия (%)	6,8%	14,5%	7,8%/2,1	0,0206
Повышенный ответ (%)	25,7%	31,4%	5,7%/1,2	0,2322
Среднее изменение CRP (мкг/мл)	-3,6 N=147	-2,9 N=220		0,9288

Таблица 37

Результаты исследований поддержания - первичные и ключевые вторичные конечные точки

Конечная точка эффективности	Плацебо N=153	VDZ Q8 N=154	VDZ Q4 N=154	Корр. разница/RR Q8 vs. Pb Q4 vs. Pb	P- значение
Клиническая ремиссия (%)	21,6	39,0	36,4	17,4/1,8 14,7/1,7	00007 0,0042
Повышенный ответ (%)	30,1	43,5	45,5	13,4/1,4 15,3/1,5	0,0132 0,0053
Ремиссия без использования кортикостероидов (%)	15,9 N=82	31,7 N=82	28,8 N=80	15,9/2,0 12,9/1,8	0,0154 0,0450
Длительная ремиссия (%)	14,4	21,4	16,2	7,2/1,5 2,0/1,1	0,1036 0,6413

Таблица 38

Клиническая ремиссия и повышенный ответ в неделю 6 у пациентов с предшествующей неудачей терапии антагонистом анти-ФНО-α и без экспозиции анти-ФНО, ITT популяция

Пациенты с предшествующей неудачей терапии антагонистом анти-ФНО-α (48%)				
Конечная точка	Плацебо N=70	Ведолизумаб N=105	Разница	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	4,3	10,5	6,2	(-9,1, 21,3)
Повышенный ответ (%)	22,9	23,8	1,0	(-11,8, 13,7)
Пациенты без экспозиции антагонистом анти-ФНО-α (50%)				
	Плацебо N=76	Ведолизумаб N=130109	Разница	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	9,2	17,4	8,2	(-1,4, 17,9)
Повышенный ответ (%)	30,3	42,2	11,9	(-1,9, 25,8)

Таблица 39

Клиническая ремиссия и повышенный ответ в неделю 52: пациенты с предшествующей неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α или без экспозиции антагонистом анти-ФНО- α , ИТТ популяция

Пациенты с предшествующей неудачей терапии антагонистом анти-ФНО- α (51%)					
Конечная точка	Плацебо N=78	VDZ Q8Wks N=82	VDZ Q4Wks N=77	Разница Q8wks vs. плацебо Q4 wks vs. плацебо	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	12,8	28,0	27,3	15,2 14,5	(3,0, 27,5) (2,0, 26,9)
Повышенный ответ (%)	20,5	29,3	37,7	8,8 17,1	(-4,6, 22,1) (3,1, 31,2)
Пациенты без экспозиции антагонистом анти-ФНО- α (45%)					
	Плацебо N=71	VDZ Q8wks N=66	VDZ Q4wks N=71	Разница Q8wks vs. плацебо Q4wks vs. плацебо	95% CI
Клиническая ремиссия (%)	26,8	51,1	46,5	24,8 19,7	(8,9, 40,6) (4,2, 35,2)
Повышенный ответ (%)	38,0	60,6	53,5	22,6 15,5	(6,3, 38,9) (-0,7, 31,7)

Таблица 40

Информация о последовательностях

SEQ ID NO:	Последовательность приведена на	Описание
1	Фиг. 1	ДНК, кодирующая тяжелую цепь гуманизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ иммуноглобулина
2	Фиг. 1	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ иммуноглобулина
3	Фиг. 2	ДНК, кодирующая легкую цепь гуманизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ иммуноглобулина
4	Фиг. 2	Аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизированного анти- $\alpha 4\beta 7$ иммуноглобулина
5	Фиг. 3	Легкая цепь зрелого гуманизированного LDP-02
6	Фиг. 4	Константная область родовой человеческой каппа-легкой цепи
7	Фиг. 4	Константная область родовой мышинной каппа-легкой цепи

8	Упомянуется на странице 30 SYWMH	CDR1 тяжелой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
9	Упомянуется на странице 30 EIDPSESNTNYNQKFKG	CDR2 тяжелой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
10	Упомянуется на странице 30 GGYDGWDYAIDY	CDR3 тяжелой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
11	Упомянуется на странице 30 RSSQSLAKSYGNTYLS	CDR1 легкой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
12	Упомянуется на странице 30 GISNRFS	CDR2 легкой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
13	Упомянуется на странице 30 LQGTNQPYT	CDR3 легкой цепи мышиногo АСТ-1 антитела
14	Фиг. 7	Вариабельная область каппа-легкой цепи человеческого GM607 CL антитела
15	Фиг. 7	Вариабельная область тяжелой цепи человеческого 21/28 CL антитела

Хотя настоящее изобретение было конкретно проиллюстрировано и описано со ссылками на предпочтительные варианты его исполнения, квалифицированным специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные изменения по форме и в деталях могут быть выполнены в настоящем изобретении без выхода за пределы объема изобретения, ограниченные приложенной формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела для внутривенного введения человеку с болезнью Крона в виде первой дозы 300 мг, второй дозы 300 мг через две недели после первой дозы и третьей дозы 300 мг через шесть недель после первой дозы для достижения клинического ответа на болезнь Крона у человека с болезнью Крона, где указанный человек проявляет отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или интолерантность к антагонисту TNF- α и где указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную аминокислотами 20-140 SEQ ID NO: 2, и последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную аминокислотами 20-131 SEQ ID NO: 4.

2. Применение по п.1, в котором тяжелая цепь антитела содержит аминокислоты 20-470 SEQ ID NO: 2 и легкая цепь антитела содержит аминокислоты 20-238 SEQ ID NO: 4.

3. Применение по п.1, в котором болезнь Крона имеет степень активности от умеренной до тяжелой.

4. Применение ведолизумаба для внутривенного введения человеку с болезнью Крона в виде первой дозы 300 мг, второй дозы 300 мг через две недели после первой дозы и третьей дозы 300 мг через шесть недель после первой дозы для достижения клинического ответа на болезнь Крона у человека с болезнью Крона, где человек проявляет отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или интолерантность к антагонисту TNF- α .

5. Применение по п.4, в котором болезнь Крона имеет степень активности от умеренной до тяжелой.

6. Применение антитела для внутривенного введения человеку в виде первой дозы 300 мг, второй дозы 300 мг антитела через две недели после первой дозы, третьей дозы 300 мг антитела через шесть недель после первой дозы и затем 300 мг антитела каждые восемь недель после этого для индуцирования клинической ремиссии у человека с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности, где указанное антитело включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную аминокислотами 20-140 SEQ ID NO: 2, и последовательность вариабельной области легкой цепи, представленную аминокислотами 20-131 SEQ ID NO: 4, и указанный человек проявляет отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или интолерантность к антагонисту TNF- α .

7. Применение по п.6, в котором тяжелая цепь антитела содержит аминокислоты 20-470 SEQ ID NO: 2 и легкая цепь антитела содержит аминокислоты 20-238 SEQ ID NO: 4.

8. Применение ведолизумаба для внутривенного введения человеку в виде первой дозы 300 мг, второй дозы 300 мг ведолизумаба через две недели после первой дозы, третьей дозы 300 мг ведолизумаба через шесть недель после первой дозы и затем 300 мг ведолизумаба каждые восемь недель после этого для индуцирования клинической ремиссии у человека с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности, где человек проявляет отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или интолерантность к антагонисту TNF- α .

9. Применение антитела для внутривенного введения человеку в дозе 300 мг каждые восемь недель для достижения заживления слизистой и поддержания клинической ремиссии у человека с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности, где указанное антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи, представленную аминокислотами 20-140 SEQ ID NO: 2, и последовательность варибельной области легкой цепи, представленную аминокислотами 20-131 SEQ ID NO: 4, и заживление слизистой определяется как 1 балл или менее по эндоскопической подшкале.

10. Применение по п.9, в котором тяжелая цепь антитела содержит аминокислоты 20-470 SEQ ID NO: 2 и легкая цепь антитела содержит аминокислоты 20-238 SEQ ID NO: 4.

11. Применение по п.9, в котором человек проявляет отсутствие адекватного ответа, потерю ответа или интолерантность к антагонисту TNF- α .

12. Применение ведолизумаба для внутривенного введения человеку в дозе 300 мг каждые восемь недель для достижения заживления слизистой и поддержания клинической ремиссии у человека с язвенным колитом от умеренной до тяжелой степени активности, где заживление слизистой определяется как 1 балл или менее по эндоскопической подшкале.

Новая ДНК LDP02 тяжелая цепь - содержит сайты клонирования (строчные буквы), последовательность Козака (прописные буквы) и лидерную последовательность (строчные)

```
gaattctcgagatgatCTCACCAatgggatggagctgtatcatcctctcttggtagcaacagctacaggtgccactcccag
gtgCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTTAAGAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
GGTGTCTGCAAGGGTTCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCATTGGG
TGAGGCAGGGCCCTGGCCAACGCTTAGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTC
TGAGAGTAATACTAATACTACAATCAAAAATTCAAGGGACCGCTCATTGACT
GTAGACATTTCCGCTAGCACAGCCTACATGGAGCTCTCCAGCCTGAGACTG
AGGACACTGCGGTCTACTATTGTGCAAGAGGGGGTTACGACGGATGGGACTA
TGCTATTGACTACTGGGGTCAAGGCACCCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCA
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCGGTGA
CGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCGCGGGTGCACACCTTCCCAGG
TGCTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG
CAACCCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCAC
ACATGCCACCGTGCACAGCCTGAAGTCTCGGGGGCACCGTCACTCTTCC
TCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAAAT
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG
AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCGTCTGCACCA
GGACTGGCTGAATGGC
```

Фиг. 1А

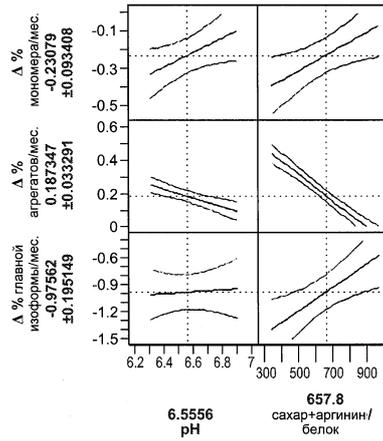
```
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGA
AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCT
GCCCCATCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGACAAATGGGC
AGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTC
CTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAtaatctagaca
```

Новый белок LDP02 тяжелая цепь (промежуток между VHL, VH и человеческий IgG1-FcRmut)

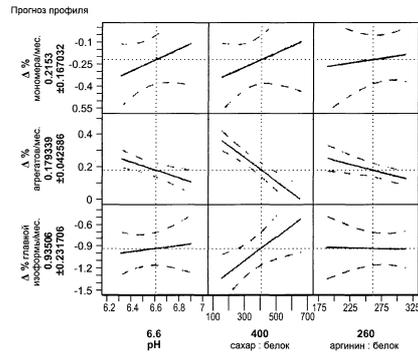
```
MGWSCIILFLVATATGVHS
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKGGSYTFTSYWMHWVRQAPGORLEWIGEIDP
SESNITNYNQKFKGRVTLTVDISASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGDWDY
AIDYWGGQTLVTVSS
ASTKGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKSNKVDKKEPKSCDKHTHTCP
PCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK
```

Фиг. 1В

034583



Фиг. 6А



Фиг. 6В

Варибельный участок кап-
легкой цепи антитела CM607C1

SEQ ID NO: 14

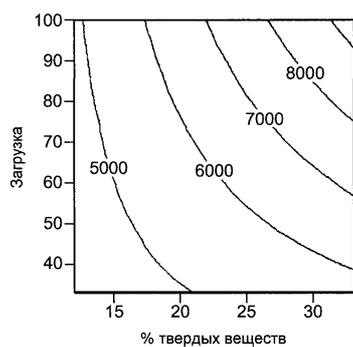
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe 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

Варибельный участок тяжелой
цепи антитела 21/28'CL

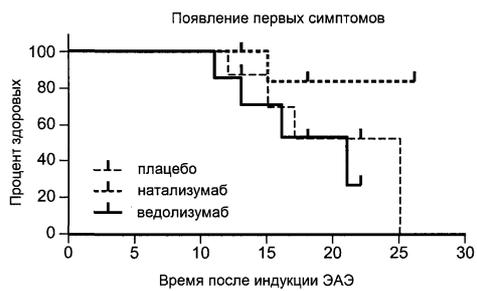
SEQ ID NO: 15

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

Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

