

POSITION PAPER

**UNA NUOVA CLASSE DI FARMACI
ANTI-INTEGRINE TESSUTO SPECIFICI
NELLA TERAPIA DELLE MALATTIE
INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI:
EVIDENZE FARMACOLOGICHE
PRECLINICHE E CLINICHE**

Corrado Blandizzi[§], Pier Luigi Canonico[§]

[§] Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

[§]Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale

Con la collaborazione di:

Luca Antonioli, Rocchina Colucci, Matteo Fornai

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Università di Pisa

Indice

1. Malattie infiammatorie croniche intestinali
 - 1.1. Epidemiologia e caratteristiche cliniche
 - 1.2. Basi patogenetiche e fisiopatologiche
 - 1.3. Terapie farmacologiche
2. Il sistema integrina/adesina
3. Interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nella migrazione linfocitaria intestinale in condizioni fisiologiche
 - 3.1. Studi su modelli animali
 - 3.2. Studi nell'uomo
4. Interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nella migrazione linfocitaria in presenza di infiammazione intestinale
 - 4.1. Studi su modelli animali
 - 4.2. Studi nell'uomo
5. Ruolo del recettore CCR9 per la chemochina CCL25 nella migrazione intestinale dei linfociti
6. Razionale per lo sviluppo dei farmaci anti-integrina
7. Vedolizumab: struttura molecolare
8. Vedolizumab: studi di farmacologia preclinica
 - 8.1. Studi su modelli sperimentali *in vitro*
 - 8.1.1. Specificità e reversibilità di legame con l'integrina $\alpha_4\beta_7$
 - 8.1.2. Selettività di inibizione dell'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e le molecole di adesione
 - 8.1.3. Effetti sull'integrità e sulla funzione dei linfociti
 - 8.1.4. Specificità di specie
 - 8.2. Studi su modelli sperimentali *in vivo*
9. Vedolizumab: studi di farmacologia clinica
 - 9.1. Profilo farmacocinetico
 - 9.2. Profilo farmacodinamico
 - 9.2.1. Interazione con l'integrina $\alpha_4\beta_7$
 - 9.2.2. Effetti sulla sorveglianza immunitaria del sistema nervoso centrale
 - 9.2.3. Effetti sulla risposta ai vaccini
 - 9.3. Profilo di efficacia

- 9.3.1. Studi di fase I
- 9.3.2. Studi di fase II
- 9.3.3. Studi di fase III
 - 9.3.3.1. Studio GEMINI I
 - 9.3.3.2. Studio GEMINI II
 - 9.3.3.3. Studio GEMINI III
- 9.4. Profilo di tollerabilità
 - 9.4.1. Leucoencefalopatia multifocale progressiva
- 9.5. Profilo di immunogenicità
- 10. Commento
- 11. Vedolizumab: status regolatorio
- 12. Conclusioni
- 13. Bibliografia

1. Malattie infiammatorie croniche intestinali

1.1. Epidemiologia e caratteristiche cliniche

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono patologie croniche recidivanti caratterizzate da infiammazione e danno tissutale a carico del tratto digerente. Queste patologie comprendono due principali sottotipi: colite ulcerosa e malattia di Crohn (Neurath, 2014a).

L'incidenza delle MICI è in costante aumento in tutto il mondo, con una influenza negativa molto rilevante sulla qualità della vita dei pazienti ed elevati oneri sociali (Molodecky et al., 2012). Da una recente analisi sistematica della letteratura, per la colite ulcerosa è emersa un'incidenza annuale di 24,3 per 100.000 persone-anno in Europa, 6,3 per 100.000 persone-anno in Asia e Medio Oriente, e 19,2 per 100.000 persone-anno nel Nord America (Molodecky et al., 2012). Per quanto riguarda la malattia di Crohn, è stata riportata un'incidenza annuale di 12,7 per 100.000 persone-anno in Europa, 5 persone-anno in Asia e Medio Oriente, e 20,2 per 100.000 persone-anno nel Nord America (Molodecky et al., 2012). I valori di prevalenza più elevati per le MICI sono stati riscontrati in Europa (colite ulcerosa, 505 per 100.000 persone; malattia di Crohn, 322 per 100.000 persone) e Nord America (colite ulcerosa, 249 per 100.000 persone; malattia di Crohn, 319 per 100.000 persone) (Molodecky et al., 2012).

Da un punto di vista clinico le MICI si manifestano in maniera differente. La malattia di Crohn è caratterizzata da un'infiammazione transmurale, che coinvolge a tutto spessore la parete intestinale e può interessare qualsiasi porzione del tratto gastrointestinale, dal cavo orale all'orifizio anale. I pazienti con malattia di Crohn presentano generalmente diarrea non ematica, crampi addominali, dolore al quadrante addominale inferiore destro, urgenza evacuativa, incontinenza, perdita di peso e sintomi sistemici (McLean et al., 2012). La malattia di Crohn si può complicare con l'insorgenza di stenosi della parete intestinale, la

formazione di fistole con organi adiacenti (ad es. vescica urinaria), con altre anse intestinali contigue o aperte sul piano cutaneo nella regione perineale, e la formazione di ascessi in cavità peritoneale (McLean et al., 2012; Neurath, 2014). Per contro, la colite ulcerosa si presenta con un'inflammatione confinata alla mucosa (anche se, nei casi più gravi, sia stato descritto anche un coinvolgimento infiammatorio dello strato sottomucoso), che interessa inizialmente la porzione distale del tratto digerente (retto-colite distale) e può estendersi progressivamente in direzione retrograda fino a interessare tutto il colon (pancolite). I pazienti affetti da colite ulcerosa manifestano sanguinamento rettale, diarrea ematica, urgenza evacuativa, incontinenza, tenesmo e sintomi sistemici (McLean et al., 2012).

Manifestazioni extra-digestive, quali osteoporosi, spondilite anchilosante, osteoporosi, eritema nodoso, uveite, sclerite, episclerite, colangite, eventi tromboembolici e nefrolitiasi possono manifestarsi nel 40% dei pazienti affetti da MICI (Levine e Burakoff, 2011).

La sintomatologia digestiva ed extradigestiva che si accompagna alle MICI ha un impatto negativo molto rilevante sulla qualità della vita dei pazienti affetti da MICI (Ghosh e Mitchell, 2007). Inoltre è stato osservato che, nel lungo periodo, il 75% dei pazienti con malattia di Crohn e il 25-33% dei pazienti affetti da colite ulcerosa è a rischio di subire interventi chirurgici per la risoluzione di lesioni fibro-stenotiche della parete intestinale che alterano la normale canalizzazione (Hanauer, 2006) o per la rimozione di neoplasie colorettrali, alle quali i soggetti affetti da MICI sono suscettibili (Neurath, 2014).

1.2. Basi patogenetiche e fisiopatologiche

Fattori ambientali, suscettibilità genetica, disbiosi intestinale e un'alterazione della funzione immunitaria contribuiscono in maniera rilevante alla patogenesi delle MICI (Neurath, 2014). In particolare, negli ultimi anni è stato descritto un ruolo significativo dei fattori genetici e ambientali nell'insorgenza di alterazioni a carico della barriera epiteliale

intestinale, che sono prodromiche ad una traslocazione di antigeni batterici del microbiota luminale nella parete intestinale (Neurath, 2014). Tale evento determina un'attivazione incontrollata e aberrante del sistema immuno-infiammatorio enterico con la conseguente insorgenza di un processo flogistico persistente, progressivo e recidivante (Neurath, 2014). In particolare, è stato osservato che popolazioni di cellule immunitarie prelevate da pazienti affetti da MICI, comprendenti cellule presentanti l'antigene (cellule dendritiche, cellule epiteliali), cellule effettrici (macrofagi, granulociti, cellule *natural killer*, linfociti T effettori), linfociti T regolatori e linfociti B della mucosa (Lobatón et al., 2014), rispondono alla presenza di antigeni batterici con una produzione massiva di citochine pro-infiammatorie in grado di promuovere e sostenere una condizione di flogosi cronica a carico dei tessuti enterici (Neurath, 2014).

Studi condotti in modelli animali di infiammazione intestinale e su campioni di tessuto intestinale ottenuti da pazienti affetti da MICI hanno permesso un'accurata caratterizzazione delle popolazioni immuno-cellulari e dei mediatori infiammatori coinvolti nell'insorgenza, nel mantenimento e nella progressione dell'infiammazione intestinale (Corridoni et al., 2014). Complessivamente, le evidenze attualmente disponibili indicano che alterazioni a carico dell'immunità sia innata che adattativa contribuiscono ad indurre e mantenere la risposta infiammatoria intestinale abnorme tipica delle MICI (Geremia et al., 2014).

In condizioni fisiologiche, le cellule che contribuiscono all'attività del sistema dell'immunità innata, quali le cellule dendritiche, i macrofagi e le cellule linfoidei innate, così come le cellule dell'epitelio intestinale e i miofibroblasti, sono in grado di rilevare la presenza del microbiota intestinale sulla superficie della mucosa e di mettere in atto risposte stereotipate finalizzate al mantenimento dell'omeostasi dei tessuti enterici (Geremia et al., 2014). Nei pazienti affetti da MICI la mucosa intestinale si caratterizza per la presenza di una elevata densità di cellule dendritiche e di macrofagi. L'attivazione di queste popolazioni

cellulari si verifica in risposta a fattori liberati dal microbiota che, penetrando all'interno della parete intestinale, in conseguenza di una concomitante alterazione della permeabilità della mucosa, interagiscono con i recettori *toll-like* espressi su queste cellule, innescando la liberazione di concentrazioni massive di citochine pro-infiammatorie [interleuchina (IL)-1 β , IL-6, IL-18 e *tumor necrosis factor* (TNF)] (Ng et al., 2011).

Studi svolti su modelli preclinici di infiammazione intestinale e indagini su campioni di mucosa intestinale prelevati da pazienti con MICI hanno evidenziato la presenza di livelli tissutali elevati di TNF sostenuti dall'attività persistente dei macrofagi, degli adipociti, dei fibroblasti e dei linfociti T (Atreya et al., 2011; Neurath, 2014). Questa citochina media diverse funzioni pro-infiammatorie attraverso l'interazione con recettori specifici (TNFR1 e TNFR2), la cui stimolazione determina l'attivazione intracellulare del fattore di trascrizione nucleare- κ B (NF- κ B) (Atreya et al., 2011; Neurath, 2014). Analogamente, nei tessuti intestinali infiammati è stata osservata la presenza di livelli elevati di IL-6, una citochina pro-infiammatoria che, una volta formato un complesso molecolare con il recettore circolante IL-6R, è in grado di amplificare l'attività di popolazioni cellulari implicate nel determinismo delle risposte immuno-infiammatorie (Atreya et al., 2000; Kai et al., 2005). In presenza di processi infiammatori intestinali è stato osservato anche un incremento della sintesi e della liberazione, da parte delle cellule dendritiche e dei macrofagi, di altre citochine pro-infiammatorie, appartenenti alla famiglia dell'IL-12 (ad es. IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35) e dell'interferone (IFN) (ad es. IFN α e IFN β), implicate in maniera rilevante nella fisiopatologia delle MICI (Ng et al., 2011; Neurath, 2014).

Recentemente è stato identificato e caratterizzato un gruppo di cellule immunitarie coinvolte nel controllo dell'immunità innata a livello della mucosa: le cellule linfoidi innate. Queste cellule sono un'importante fonte di IFN- γ e di citochine pro-infiammatorie, quali IL-17A e IL-17F, coinvolte nei meccanismi immuno-infiammatori alla base della colite nei

modelli pre-clinici (Buonocore et al., 2010). Studi condotti su campioni di mucosa intestinale prelevati da pazienti affetti da malattia di Crohn, ma non da colite ulcerosa, hanno evidenziato un'amplificazione delle cellule linfoidi innate che liberavano massivamente IL-17 e IFN- γ (Geremia et al., 2011). Inoltre, un sottotipo di cellule linfoidi innate, caratterizzate dall'espressione del fattore *natural killer cell p46-related protein* sulla loro superficie, sono state identificate come una fonte importante di *CC-chemokine ligand 3*, in grado di amplificare il processo infiammatorio intestinale attraverso l'attivazione di monociti nel tessuto intestinale (Schulthess et al., 2012).

I linfociti T *helper* CD4⁺ sono cellule cardine della risposta immunitaria adattativa (Geremia et al., 2014). Queste cellule originano da cellule progenitrici Th₀, che a livello del midollo osseo possono attivarsi e differenziarsi in cellule Th₁, Th₂ o Th₁₇, processo essenziale per l'eliminazione di agenti patogeni specifici (Geremia et al., 2014). In particolare, i linfociti Th₁ svolgono un ruolo fondamentale nell'eliminazione di patogeni intracellulari, mentre i linfociti Th₂ svolgono funzioni di protezione contro i parassiti e mediano le reazioni allergiche (Geremia et al., 2014). Le cellule Th₁₇ partecipano alla rimozione dei batteri extracellulari e dei funghi (Geremia et al., 2014). Tuttavia, una risposta eccessiva ed incontrollata da parte delle cellule T, caratterizzata da un'espansione clonale abnorme di sottopopolazioni di cellule T attivate, determina l'insorgenza e la perpetuazione di un processo infiammatorio attraverso la liberazione massiva di citochine e chemochine, in grado di attivare in maniera abnorme cellule appartenenti sia alla componente adattativa che di quella innata del sistema immunitario (Geremia et al., 2014).

Sulla base del profilo delle citochine liberate in seguito all'attivazione dei linfociti T nella mucosa dei pazienti con MICI, diversi studi hanno associato la malattia di Crohn e la colite ulcerosa a diversi sottotipi di risposte immunitarie pro-infiammatorie (Geremia et al., 2014). In particolare, la mucosa di pazienti affetti dalla malattia di Crohn si caratterizza per la

presenza di linfociti CD4⁺ con fenotipo Th₁, associato alla liberazione massiva di IFN- γ e IL-12. Per contro, la mucosa di pazienti con colite ulcerosa è caratterizzata da un infiltrato di linfociti CD4⁺ con fenotipo Th₂, caratterizzati dalla produzione di *transforming growth factor* (TGF)- β , IL-4, IL-5 e IL-13. Tuttavia, nei pazienti con MICI è stata osservata anche la presenza di un'altra popolazione di cellule T infiltranti la mucosa, dotate di fenotipo Th₁₇, caratterizzato dalla produzione di elevati livelli di citochine quali IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-22 (Troncone et al., 2013). La differenziazione di cellule Th₁₇ è indotta dall'azione combinata di IL-6 e TGF- β ; la loro espansione è promossa dalla presenza dell'IL-23 e soppressa da fattori di trascrizione attivati per l'espansione clonale delle cellule Th₁ e Th₂ (Troncone et al., 2013). Attualmente sono stati identificati 2 principali sottotipi di cellule Th₁₇: le cellule Th₁₇ che producono IL-17 e le cellule Th₁/Th₁₇ che producono IFN- γ e IL-17. La biologia delle cellule Th₁₇ è ancora molto controversa, con studi che hanno dimostrato il loro ruolo patologico nelle MICI e altri che hanno descritto una loro funzione protettiva in queste patologie (Troncone et al., 2013). Tuttavia, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che l'IL-17A svolga un ruolo patologico nelle MICI e che la sua inibizione abbia un effetto benefico per i pazienti affetti da queste patologie (Troncone et al., 2013). Alcune sottopopolazioni di linfociti T, una volta attivate attraverso la liberazione di citochine, migrano nei tessuti intestinali dove inducono e mantengono l'attività infiammatoria di varie popolazioni cellulari, quali i macrofagi residenti, i monociti e i granulociti neutrofili (Geremia et al., 2014).

Numerosi studi sperimentali attribuiscono un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi intestinale ai linfociti T regolatori (Treg), mediante la secrezione di citochine anti-infiammatorie quali IL-10 e TGF- β (Himmel et al., 2012). Alterazioni a carico delle Treg si associano all'insorgenza delle MICI. Sperimentalmente è stato osservato che topi privi di cellule Treg sviluppano una colite grave (Himmel et al., 2012). Analogamente, pazienti con

MICI che presentano cellule Treg caratterizzate da una ridotta attività mostrano una condizione di infiammazione intestinale grave caratterizzata da una infiltrazione linfocitaria massiva a livello della mucosa (Himmel et al., 2012).

1.3. Terapie farmacologiche

Le terapie farmacologiche disponibili per il trattamento delle MICI si basano sull'impiego di corticosteroidi, derivati dell'acido 5-aminosalicilico (5-ASA), farmaci immunosoppressori e farmaci biotecnologici attivi contro il TNF (anti-TNF) (Lobaton et al., 2014). Tuttavia, in molti casi, queste terapie risultano poco soddisfacenti in termini di efficacia terapeutica e/o incidenza di eventi avversi (Katz, 2007). Per questo motivo, sono attualmente in corso programmi finalizzati alla ricerca di nuove strategie terapeutiche caratterizzate da profili rischio/beneficio più favorevoli.

I corticosteroidi sono generalmente efficaci nell'indurre la remissione clinica delle MICI, ma non consentono di ottenere risultati soddisfacenti nel mantenimento della remissione a lungo termine (Lobaton et al., 2014). Il trattamento con 5-ASA è efficace e ben tollerato nei pazienti affetti da colite ulcerosa di grado lieve o moderato, ma risulta inefficace nelle forme gravi di colite ulcerosa o malattia di Crohn (Lim et al., 2010; Williams et al., 2011). I farmaci immunosoppressori, quali le tiopurine (azatioprina e mercaptopurina) o il metotrexato, sono in grado sia di indurre che di mantenere la remissione delle MICI. In particolare, le tiopurine sono indicate per il trattamento di mantenimento della malattia di Crohn in pazienti che abbiano sviluppato resistenza ai corticosteroidi e per prevenire recidive post-operatorie (Dignass et al., 2010). Nella colite ulcerosa, le tiopurine sono indicate anche per le terapie di mantenimento, nei pazienti resistenti ai corticosteroidi, non rispondenti al 5-ASA, o in stato di remissione indotta dal trattamento con ciclosporina (Dignass et al., 2012). Tuttavia, l'impiego di tiopurine nelle MICI si associa ad una incidenza elevata di effetti avversi, tra i quali il

rischio di neoplasie (linfomi) (Kandiel et al., 2005). Il metotrexato è risultato efficace nei pazienti affetti dal malattia di Crohn e da colite ulcerosa che non rispondono alla terapia con tiopurine (Wahed et al., 2009). La ciclosporina è un altro farmaco immunosoppressore in grado di indurre remissione nei pazienti con colite ulcerosa. Tuttavia, il suo impiego terapeutico è complicato dalla necessità di un adeguato monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche e dal rischio di sviluppo di effetti avversi gravi (Sternthal et al., 2008).

I progressi delle conoscenze sulle basi immunologiche delle MICI e nel campo della biologia molecolare del DNA hanno permesso di sviluppare nuove strategie terapeutiche basate sulla capacità di molecole biotecnologiche farmacologicamente attive di interferire con l'attività delle citochine che svolgono un ruolo chiave nella fisiopatologia del processo infiammatorio intestinale (Baumgart e Sandborn, 2007). Queste comprendono gli anticorpi monoclonali anti-TNF, farmaci in grado di modulare l'attività di varie citochine (IL-6R, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-23, IFN- β , IFN- γ e TGF- β) e bloccanti dei fattori molecolari di adesione e migrazione delle cellule infiammatorie (Neurath, 2014).

Gli anticorpi monoclonali anti-TNF impiegati nella pratica clinica per il trattamento delle MICI sono infliximab, adalimumab e golimumab. Infliximab è stato il primo anticorpo monoclonale chimerico anti-TNF approvato per il trattamento delle MICI. La sua efficacia è stata confermata per mezzo di studi clinici randomizzati che hanno evidenziato la sua capacità di indurre e mantenere la remissione della malattia di Crohn e della colite ulcerosa (Hanauer et al., 2002; Rutgeers et al., 2005). Adalimumab è un anticorpo monoclonale completamente umano del quale è stata evidenziata l'efficacia nell'induzione e nel mantenimento della remissione nella colite ulcerosa (Sandborn et al., 2013a) e malattia di Crohn (Colombel et al., 2007). Recentemente, due studi multicentrici randomizzati in doppio cieco di fase 2/3 hanno riportato l'efficacia di golimumab nell'indurre e mantenere la remissione clinica in pazienti con colite ulcerosa (Sandborn et al., 2014). I farmaci anti-TNF sono generalmente impiegati

come farmaci di seconda linea in seguito al fallimento terapeutico con corticosteroidi e immunosoppressori. Essi sono tuttavia utilizzati anche come trattamento di prima scelta nei pazienti con forme gravi e complesse della malattia (ad es. malattia di Crohn diffusa e fistolizzante in pazienti giovani) (Lobatón et al., 2014). Il limite principale della terapia con farmaci anti-TNF è rappresentato dall'assenza di risposta terapeutica in una percentuale importante di pazienti, probabilmente a causa di un meccanismo fisiopatologico TNF-indipendente alla base dell'insorgenza e progressione della malattia (Lobatón et al., 2014). Inoltre, circa il 40% dei pazienti, che rispondono inizialmente alla terapia, perdono tale risposta, probabilmente a causa di una *clearance* accelerata del farmaco prevalentemente a seguito della formazione di anticorpi contro il farmaco stesso (Baert et al., 2003; Ben Horin et al., 2011). La terapia con farmaci anti-TNF può inoltre essere associata ad eventi avversi, quali le reazioni all'infusione del farmaco e un aumento del rischio di infezioni (Singh et al., 2011; Bongartz et al., 2006; Lichtenstein et al., 2006; Lichtenstein et al., 2012).

Le evidenze attualmente disponibili sostengono la necessità di individuare nuove strategie terapeutiche per le MICI, basate sulla caratterizzazione di bersagli molecolari rilevanti per lo sviluppo di farmaci in grado di indurre e mantenere la remissione di queste patologie. Coerentemente con questo concetto, sono stati sviluppati numerosi farmaci in grado di interferire con l'azione di varie citochine coinvolte nella fisiopatologia delle MICI (Tabella 1) (Neurath, 2014).

Farmaco	Bersaglio molecolare	Patologia	Vantaggi	Svantaggi	Fase di sviluppo
<i>IFN-β ricombinante</i>	Recettore IFN-β	Colite ulcerosa	Citochina immunoregolatoria in grado di modulare cellule immunitarie regolatrici	Scarsa efficacia negli studi clinici	Fase II
<i>Fontolizumab</i>	IFN-γ	Malattia di Crohn	Efficacia sostenuta da studi preclinici su modelli animali di infiammazione intestinale e studi <i>ex vivo</i> su cellule immunitarie da pazienti con MICI	Scarsa efficacia negli studi clinici	Fase II
<i>Oligonucleotidi antisense per SMAD7</i>	TGF-β	Malattia di Crohn	Ripristino della sensibilità delle cellule immunitarie al TGF-β	Tossicità a lungo termine	Fase I
<i>Tocilizumab</i>	Recettore IL-6	Malattia di Crohn	Efficacia sostenuta da studi preclinici su modelli animali di infiammazione intestinale e studi <i>ex vivo</i> su cellule immunitarie da pazienti con MICI	Efficacia in sottogruppi di pazienti; effetti incerti sulla riparazione della mucosa	Fase II
<i>IL-10 ricombinante</i>	Recettore IL-10	Malattia di Crohn	Efficacia sostenuta da studi preclinici su modelli animali di infiammazione intestinale	Efficacia scarsa o assente negli studi clinici	Fase II
<i>IL-11 ricombinante</i>	IL-11	Malattia di Crohn	Citochina immunostimolante	Efficacia limitata o assente negli studi clinici	Fase II
<i>Ustekinumab e briakinumab</i>	IL-12 e IL-23	Malattia di Crohn	Efficacia sostenuta da studi preclinici su modelli animali di infiammazione intestinale e studi <i>ex vivo</i> su cellule immunitarie da pazienti con MICI	Efficacia in sottogruppi di pazienti	Fase II
<i>Anrukizumab e tralokinumab</i>	IL-13	Colite ulcerosa	Efficacia sostenuta da studi preclinici su modelli animali di infiammazione intestinale e studi <i>ex vivo</i> su cellule epiteliali umane	Dati di efficacia attualmente non disponibili	Fase II
<i>Secukinumab</i>	IL-17A	Malattia di Crohn	Studi preclinici condotti su modelli animali di infiammazione intestinale ne hanno evidenziato l'efficacia	Aggravamento della patologia ed effetti avversi sull'omeostasi tissutale	Fase II
<i>Tofacitinib</i>	JAK3	Colite ulcerosa	Inibizione simultanea di diverse citochine pro-infiammatorie	Tossicità a lungo termine; nessuna efficacia in uno studio pilota in pazienti con malattia di Crohn	Fase II

Tabella 1. Farmaci biologici in sviluppo clinico per il trattamento delle MICI.

IFN-β: interferone-β; IFN-γ: interferone-γ; JAK3:janus chinasi 3;

TGF-β: transforming growth factor-β

Tuttavia, nell'ambito della fase di sviluppo clinico, la maggior parte di queste nuove molecole non ha mostrato profili di efficacia terapeutica convincente nel controllo delle MICI a lungo termine. Per queste ragioni la ricerca è stata orientata verso l'identificazione di bersagli molecolari alternativi per lo sviluppo di nuove entità farmacologiche.

In seguito alla caratterizzazione dei meccanismi immuno-infiammatori alla base dell'insorgenza delle MICI, è emerso che il processo di migrazione dei leucociti dal torrente circolatorio al tratto gastrointestinale rappresenta uno dei momenti cruciali nella fisiopatologia di queste malattie. Sulla base di queste conoscenze, in alternativa al blocco delle citochine pro-infiammatorie, sono stati sviluppati farmaci, quali natalizumab e vedolizumab, in grado di bloccare la migrazione dei linfociti T dal circolo sanguigno al comparto della parete enterica, impedendo di conseguenza il reclutamento di cellule immunitarie attivate a livello di tessuti intestinali infiammati.

2. Il sistema integrina/adesina

Una caratteristica comune a tutte le patologie infiammatorie croniche, comprese le MICI, è rappresentata dal reclutamento e migrazione dei leucociti, in particolare dei linfociti T, nel sito della flogosi (Fiorino et al., 2010). Il processo di migrazione dei leucociti dal torrente circolatorio al sito di infiammazione è caratterizzato da una sequenza coordinata di fasi comprendenti la cattura, la laminazione, l'attivazione, l'adesione e la migrazione delle cellule immunitarie attraverso la parete vascolare (Fiorino et al., 2010). Chemochine, selectine ed integrine, e altri fattori molecolari appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline, partecipano alla regolazione delle diverse fasi di questo processo (Fiorino et al., 2010).

Le selectine, espresse sui leucociti (selectina-L), sulle cellule endoteliali (selectina-E) e sulle piastrine attivate (selectina-P), sono fattori molecolari fondamentali per l'inizio del processo di adesione (von Andrian et al., 2000). Nelle condizioni di flogosi, la liberazione

massiva di citochine pro-infiammatorie determina un aumento dell'espressione di questi fattori (Fiorino et al., 2010). Le selectine interagiscono con la *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) e con oligosaccaridi sialilati o fucosilati, denominati *sialyl-Lewis x* (sLex) e *sialyl-Lewis a* (sLea), espressi sulle cellule infiammatorie (von Andrian et al., 2000). Tuttavia, tale interazione risulta debole e transitoria, permettendo ai leucociti di rallentare la loro velocità e di rotolare sulla parete vascolare, ma non di arrestarsi e migrare attraverso l'endotelio (von Andrian et al., 2000).

Per interrompere il rotolamento e iniziare il processo di migrazione attraverso la parete dei vasi, i leucociti utilizzano molecole di adesione secondarie appartenenti alla famiglia delle integrine. Le integrine sono glicoproteine eterodimeriche trans-membrana costituite da due subunità, una α e una β (Mitroulis et al., 2014). La subunità α determina la specificità del fattore molecolare con il quale l'integrina deve fisiologicamente interagire, mentre la subunità β si lega al citoscheletro, modulando segnali intracellulari (Thomas e Baumgart, 2012). Sulla superficie dei leucociti sono state identificate 13 tipi di integrine. Tuttavia, solo 5 di queste, appartenenti alle sottofamiglie β_1 , β_2 e β_7 ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$), sono coinvolte nei processi di adesione dei leucociti all'endotelio (Thomas e Baumgart, 2012). Le integrine della sottofamiglia β_2 sembrano espresse esclusivamente sui leucociti. In particolare, la subunità β_2 (CD18) si lega con una delle 4 subunità α , distinte in α_L (CD11a), α_M (CD11b), α_x (CD11c) e α_D (CD11d) (Thomas e Baumgart, 2012). L'integrina α_M/β_2 , denominata anche MAC-1, è espressa sui leucociti della linea mieloide (monociti, granulociti, polimorfonucleati, cellule *natural killer*) e su specifici cloni di linfociti T e B. Il complesso α_L/β_2 costituisce l'integrina denominata LFA-1. Queste integrine sono responsabili di un'adesione stabile dei leucociti all'endotelio, in seguito all'acquisizione di un elevato grado di affinità determinato da un cambiamento di natura conformazionale. L'integrina α_L/β_2 interagisce con le molecole di adesione intercellulare-1 (ICAM-1) e -2, mentre l'integrina α_M/β_2 interagisce con le molecole

ICAM-1 espresse sulle cellule endoteliali (Thomas e Baumgart, 2012). L'integrina $\alpha_D\beta_2$ è espressa sulla maggior parte dei leucociti umani, compresi i neutrofili, monociti e, in misura minore, i linfociti, dove partecipa ai processi di adesione endoteliale di queste cellule interagendo con la molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM)-1 (Grayson et al., 1998). L'integrina $\alpha_4\beta_1$ si lega a VCAM-1 e all'autotaxina, partecipando al reclutamento dei linfociti T principalmente in alcuni distretti organici, quali lo spazio sinoviale, il midollo osseo, la cute e il sistema nervoso centrale (Mitroulis et al., 2014). L'integrina $\alpha_4\beta_7$ è coinvolta nei processi di arruolamento dei linfociti T nei tessuti linfoidei intestinali attraverso il legame selettivo con la molecola di adesione MAdCAM-1 (Mitroulis et al., 2014).

A differenza delle selectine, fattori molecolari attivi in maniera costitutiva, le integrine, per potere indurre il processo di adesione leucocitaria, necessitano di un'attivazione mediata dalle chemochine. Queste ultime comprendono una grande famiglia di citochine in grado di veicolare la migrazione dei linfociti e altri leucociti nel focolaio infiammatorio attraverso i tessuti linfoidei periferici, inducendo un aumento dell'affinità delle integrine per i loro rispettivi ligandi endogeni (von Andrian et al., 2000). In particolare, è stato osservato che le chemochine coinvolte nelle reazioni infiammatorie sono prodotte dai leucociti in risposta a stimoli esogeni, mentre le chemochine che regolano il traffico cellulare attraverso i tessuti sono prodotte costitutivamente da diversi tipi cellulari presenti negli stessi tessuti (von Andrian et al., 2000). Nell'uomo sono state identificate circa 50 chemochine, tutte omologhe da un punto di vista strutturale. Queste molecole, sulla base del numero e della posizione dei residui di cisteina N-terminali responsabili della formazione di ponti disolfuro, possono essere raggruppate in quattro sottofamiglie: 1) le chemochine CC, nelle quali i primi due ponti disolfuro sono adiacenti; 2) le chemochine CXC, nelle quali gli stessi residui sono separati da un aminoacido; 3) le chemochine C che possiedono un solo residuo di cisteina; 4) le chemochine CX3C, che presentano due residui di cisteina separati da tre amminoacidi

(Thomas e Baumgart, 2012). Una volta liberate nel circolo sistemico, le chemochine interagiscono con specifici recettori accoppiati a proteine G espressi sulle cellule immunitarie, innescando la fase di attivazione di queste ultime (von Andrian et al., 2000). Sono stati identificati 10 diversi tipi di recettori per le chemochine CC (denominati da CCR1 a CCR10) e 6 diversi tipi di recettori per le chemochine CXC (denominati da CXCR1 a CXCR6) (von Andrian et al., 2000).

Le chemochine responsabili dell'attivazione dell'adesione leucocitaria mediata dalle integrine sono state estesamente caratterizzate (Laudanna et al., 2002). La chemochina CXCL8 (IL-8) innesca l'attività pro-adesiva di MAC-1 espressa sui neutrofilii. Le chemochine CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3) e CCL11 favoriscono l'adesione degli eosinofili mediata da VLA-4 (CD29/CD49d) e da MAC-1. Nei monociti, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL8 (IL-8) e CXCL12 (SDF-1a) inducono l'attivazione delle subunità delle integrine β_1 e β_2 . Nei linfociti CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CXCL10 (IP10), CXCL9 (Mig), CCL5 (RANTES), CXCL12 (SDF-1 α), CCL19 (MIP-3 β), CCL21 (SLC), CCL20 (MIP-3 α), CCL17 (TARC) e CCL22 (MDC) sono coinvolte nell'attivazione delle integrine dotate delle subunità β_1 , β_2 e β_7 (Laudanna et al., 2002).

3. Interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nella migrazione linfocitaria intestinale in condizioni fisiologiche

3.1. Studi su modelli animali

Le diverse sottoclassi di integrine e i propri recettori ricoprono un ruolo fondamentale nel processo di migrazione selettiva tessuto-specifica dei linfociti attivati nei diversi distretti dell'organismo (Agace, 2006). Le prime evidenze sperimentali, relative alla diversa capacità dei linfociti attivati di migrare in maniera selettiva in organi diversi, risalgono agli anni 70 del secolo scorso (Cahill et al., 1977; Hall et al., 1977; McDermott et al., 1979). Studi successivi

hanno dimostrato che i linfociti in grado di migrare selettivamente verso i tessuti intestinali esprimono livelli elevati di integrina $\alpha_4\beta_7$ (Buthcer et al., 1999), e che la selettività di tale migrazione dipende dal complesso molecolare $\alpha_4\beta_7$ nel suo insieme e non dalle singole subunità. A sostegno di questi concetti, Hamann et al. (1994) hanno osservato che anticorpi diretti contro le singole subunità α_4 o β_7 o capaci di legare un epitopo generato dall'associazione tra le due subunità sono in grado di bloccare la migrazione linfocitaria nell'intestino del topo. Risultati simili sono stati ottenuti da Watanabe et al. (2002), i quali hanno effettuato un'analisi *in vivo* dell'adesione linfocitaria a livello dell'ileo e del colon di topo tramite microscopia del microcircolo della mucosa. I risultati di questo studio hanno infatti evidenziato che l'adesione linfocitaria stimolata dal TNF nei letti capillari dell'intestino tenue e del colon è bloccata dalla somministrazione di anticorpi diretti contro la subunità α_4 o β_7 . Evidenze ottenute da Lefrancois et al. (1999) hanno inoltre contribuito a rafforzare il concetto relativo all'importanza della catena β_7 nel processo di migrazione intestinale dei linfociti, in quanto tale processo risulta bloccato in topi geneticamente modificati che non esprimono questa subunità.

La prima dimostrazione del fatto che l'integrina $\alpha_4\beta_7$ è in grado di legare in maniera selettiva la molecola di adesione MAdCAM-1 è stata ottenuta in seguito allo studio condotto da Berlin et al., (1993). Questi autori hanno osservato che anticorpi specifici diretti contro la subunità α_4 o β_7 del complesso molecolare $\alpha_4\beta_7$ impediscono il legame dei linfociti che esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$ con MAdCAM-1 *in vitro*. Essi hanno inoltre dimostrato la specificità di questa interazione, dal momento che nei loro esperimenti l'integrina $\alpha_4\beta_1$ non è risultata in grado di legarsi a MAdCAM-1. Successivamente, sono stati condotti studi volti a caratterizzare il ruolo dell'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nella migrazione selettiva dei linfociti nel tessuto intestinale *in vivo* in assenza di processi patologici. In particolare, Hamann et al. (1994) e Watanabe et al. (2002) hanno osservato che anticorpi

diretti contro MAdCAM-1 sono in grado di impedire la migrazione dei linfociti verso i tessuti intestinali nel topo, sottolineando in tal modo la rilevanza di questo fattore molecolare in un contesto fisiologico.

3.2. Studi nell'uomo

Durante gli anni '90 del secolo scorso, diversi studi hanno evidenziato che specifici sottogruppi di linfociti umani circolanti esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$ e sono dotati della capacità di traslocare in maniera selettiva nel tessuto intestinale (Butcher et al., 1999; Schweighoffer et al., 1993; Tiisala et al., 1995) attraverso l'interazione specifica con MAdCAM-1, la cui espressione selettiva a livello enterico è stata dimostrata per la prima volta da Briskin et al., 1997. Questi autori hanno infatti dimostrato l'espressione costitutiva di MAdCAM-1 nell'endotelio vascolare dell'intestino tenue e del colon, ma non in altri distretti extra-intestinali, quali polmone, fegato, rene, pancreas, cuore e cervello. I dati generati da questi studi, insieme alle evidenze ottenute nei modelli animali, hanno quindi costituito le basi molecolari per la comprensione dei meccanismi fisiologici che regolano la migrazione linfocitaria selettiva a livello dell'intestino, contribuendo in maniera significativa alla caratterizzazione di nuovi bersagli farmacologici per la terapia delle malattie infiammatorie caratterizzate da una migrazione linfocitaria incontrollata verso i tessuti del tratto gastrointestinale.

4. Interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nella migrazione linfocitaria in presenza di infiammazione intestinale

4.1. Studi su modelli animali

Il ruolo fondamentale svolto dall'integrina $\alpha_4\beta_7$ nella migrazione selettiva dei linfociti a livello intestinale è stato confermato anche in condizioni patologiche. Infatti, diversi studi,

svolti su modelli animali di infiammazione intestinale, hanno evidenziato che interferendo con il processo di adesione cellulare mediato dall'integrina $\alpha_4\beta_7$ è possibile migliorare il decorso del processo infiammatorio. In uno studio condotto da Hesterberg et al. (1996) è stato osservato che la somministrazione di un anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ (ACT-1; precursore del vedolizumab) è in grado di indurre un miglioramento significativo dell'infiammazione intestinale in un modello di colite spontanea nel primate tamarino edipo (*cotton top tamarine*). Questo effetto si associa ad una riduzione dell'infiltrato di linfociti $\alpha_4\beta_7^+$ nelle biopsie di mucosa colica. Risultati simili sono stati ottenuti in un modello di colite indotto nei topi SCID (*severe combined immunodeficiency disease*), caratterizzati da immunodeficienza, inoculati con linfociti appartenenti alla sottopopolazione $CD4^+CD45RB^{\text{high}}$ che esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$ (Picarella et al., 1997). In questo modello sperimentale è stato dimostrato che il trattamento con un anticorpo monoclonale anti-subunità β_7 determina un miglioramento della colite. Nello stesso modello, Stefanich et al. (2011) hanno osservato che il trattamento con un anticorpo monoclonale umanizzato anti-subunità β_7 , rhuMAb Beta7 (etrolizumab), induce una riduzione significativa della migrazione linfocitaria a livello del colon infiammato.

Wang et al. (2010) hanno esaminato in maniera più approfondita il ruolo dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nella fisiopatologia dell'infiammazione intestinale in modelli acuti e cronici di colite nel topo. Questi autori hanno osservato che la somministrazione di un anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ in un modello di colite acuta da sodio destransolfato (DSS) non modificava il decorso dell'infiammazione. Tuttavia, in un modello di infiammazione intestinale cronica, indotta tramite inoculo in topi $\text{Rag}^{-/-}$ di splenociti prelevati da topi *wild type*, il blocco dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ ad opera dell'anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ determinava un miglioramento significativo dei parametri infiammatori e delle lesioni infiammatorie tissutali. Gli stessi autori hanno inoltre osservato che l'inoculo nei topi $\text{Rag}^{-/-}$ di splenociti isolati da topi

knockout per la subunità β_7 dell'integrina non induce lo sviluppo di infiammazione intestinale. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che l'integrina $\alpha_4\beta_7$ svolge un ruolo predominante quale mediatore della migrazione linfocitaria nell'infiammazione intestinale cronica. Nello stesso anno, Gorku et al. (2010) hanno confermato il coinvolgimento dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nella fisiopatologia dell'infiammazione intestinale in topi SAMP1/YitFc, caratterizzati dallo sviluppo di una forma di ileite spontanea che presenta caratteristiche simili a quelle della malattia di Crohn nell'uomo. In questo studio è stato osservato che, negli animali sottoposti a silenziamento del gene che codifica per la subunità β_7 dell'integrina, la gravità dell'infiammazione risulta significativamente ridotta. Risultati interessanti sono stati ottenuti anche da Dubree et al. (2002) i quali hanno sintetizzato peptidi in grado di legarsi selettivamente all'integrina $\alpha_4\beta_7$ e di impedire la sua interazione con MAdCAM-1 *in vitro*. Questi peptidi, somministrati a topi IL-10-*knockout*, che sviluppano colite in maniera spontanea, si sono dimostrati in grado di bloccare l'infiltrazione del colon da parte dei linfociti. Più recentemente, uno studio svolto da Sugiura et al. (2013) ha valutato l'efficacia anti-infiammatoria di una piccola molecola (AJM 300) attiva per via orale, in grado di legare la subunità α_4 dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, in un modello di colite sperimentale indotta dall'inoculo di linfociti prelevati da topi IL-10-*knockout* in topi SCID. I risultati hanno dimostrato che AJM300 è in grado di prevenire lo sviluppo dell'infiammazione intestinale in maniera dose-dipendente e che questo effetto si associa ad una riduzione della migrazione linfocitaria nell'intestino infiammato.

Il coinvolgimento specifico della molecola di adesione MAdCAM-1 nella migrazione linfocitaria in presenza di infiammazione intestinale è sostenuto dai risultati di diversi studi. Evidenze sperimentali in modelli animali di infiammazione enterica hanno infatti dimostrato che l'espressione di questa molecola di adesione aumenta significativamente nell'intestino infiammato (Picarella et al., 1997; Connor et al., 1999; Kato et al., 2000), suggerendo un

aumento del processo di migrazione linfocitaria. Dal punto di vista funzionale, è stato evidenziato che il blocco di MAdCAM-1 si associa a una riduzione significativa dell'infiammazione intestinale in diversi modelli murini. Ad esempio, Picarella et al. (1997) hanno osservato che un anticorpo monoclonale diretto contro MAdCAM-1 è in grado di migliorare il decorso dell'infiammazione nel modello cronico di colite in topi SCID inoculati con la sottopopolazione di linfociti CD4⁺CD45RB^{high}. Kato et al. (2000) hanno dimostrato che il trattamento di topi con colite da DSS con un anticorpo monoclonale anti-MAdCAM-1 promuove una riduzione del danno tissutale. I risultati di questo studio hanno inoltre confermato la specificità dell'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 nel processo di migrazione linfocitaria intestinale. Infatti, il trattamento con l'anticorpo anti-MAdCAM-1 ha indotto una riduzione dell'infiltrato linfocitario e questo effetto è risultato associato a una riduzione dell'espressione della subunità β_7 dell'integrina nell'intestino. Analogamente, Hokari et al. (2001) hanno osservato che il blocco di MAdCAM-1 per mezzo di un anticorpo monoclonale specifico si associa ad un miglioramento del danno tissutale e a una riduzione dell'infiltrato linfocitario intestinale in un modello di colite granulomatosa indotta da peptidoglicano-polisaccaride nel ratto. Successivamente, gli stessi autori hanno dimostrato che l'anticorpo anti-MAdCAM-1 è efficace nel ridurre l'infiammazione e l'infiltrato linfocitario in un modello di ileite spontanea nei topi SAMP1/Yit (Matsuzaki et al., 2005). Infine, in uno studio condotto da Goto et al. (2006) sono stati valutati gli effetti di un trattamento con oligonucleotidi antisenso diretti contro il gene che codifica per MAdCAM-1 in un modello di colite indotta da acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico nel topo. I risultati di questo studio hanno evidenziato che gli oligonucleotidi antisenso inducono una riduzione dell'espressione di MAdCAM-1 e del danno tissutale infiammatorio in concomitanza con una riduzione dell'infiltrazione di linfociti $\alpha_4\beta_7^+$. I risultati degli studi svolti nei modelli animali sono riassunti nella Tabella 2.

Specie/ceppo	Modello	Trattamento farmacologico	Evidenza	Riferimento bibliografico
Primate tamarino edipo	Colite spontanea	Anticorpo monoclonale ACT-1 antiintegrina $\alpha 4\beta 7$	Miglioramento del decorso della colite spontanea con riduzione dell'infiltrato di linfociti $\alpha 4\beta 7+$ nella mucosa colica	Hesterberg et al., 1996
Topo	Colite indotta da TNBS	Oligonucleotidi antisenso contro il gene MAdCAM-1	Riduzione della gravita dell'infiammazione ed dell'infiltrato di linfociti $\alpha 4\beta 7+$	Goto et al., 2006
Topo	Colite indotta da DSS	Anticorpo monoclonale anti-MadCAM-1	Miglioramento del decorso dell'infiammazione e riduzione dell'infiltrato linfocitario e dell'espressione della subunita $\beta 7$ nel tessuto colico	Kato et al., 2000
Topo	Colite indotta da DSS		Nessuna modificazione del decorso dell'infiammazione	
Topo Rag +/-	Inoculo di splenociti prelevati da topi wild type	Anticorpo monoclonale antiintegrina $\alpha 4\beta 7$	Miglioramento dei parametri infiammatori	Wang et al., 2010
	Inoculo di splenociti prelevati da topi $\beta 7$ +/-	-	Mancato sviluppo dell'infiammazione intestinale	
Topo SAMP1/YitFc	Ileite spontanea	Anticorpo monoclonale anti-MadCAM-1	Miglioramento del decorso dell'infiammazione e riduzione dell'infiltrato linfocitario intestinale	Matsuzaki et al., 2005
Topo SAMP1/YitFc	Ileite spontanea	-	Il silenziamento del gene per la subunita $\beta 7$ riduce la gravita dell'infiammazione	Gorfu et al., 2010
Topo SCID	Colite indotta da inoculo di linfociti CD4+CD45RB ^{high}	Anticorpo monoclonale antiintegrina $\beta 7$	Miglioramento del decorso della colite	Picarella et al., 1997
Topo SCID	Colite indotta da inoculo di linfociti CD4+CD45RB ^{high}	Anticorpo monoclonale umanizzato rhuMAb Beta7 (etrolizumab)	Riduzione dell'infiltrato linfocitario nel colon	Stefanich et al., 2011
Topo SCID	Colite indotta da inoculo di linfociti CD4+CD45RB ^{high}	Anticorpo monoclonale anti-MadCAM-1	Miglioramento del decorso dell'infiammazione	Picarella et al., 1997

Topo SCID	Colite indotta da inoculo di linfociti ottenuti da topi IL-10 KO	AJM300, antagonista della subunità $\alpha 4$ dell'integrina attivo per via orale	Prevenzione dello sviluppo della colite e dell'infiltrato linfocitario intestinale	Segiura et al., 2013
Topo IL-10 - /-	Colite spontanea	Peptidi di sintesi in grado di bloccare l'interazione tra integrina $\alpha 4\beta 7$ e MadCAM-1	Inibizione dell'infiltrazione linfocitaria nel colon	Dubree et al., 2002
Ratto	Peptidoglicanopolisaccaride	Anticorpo monoclonale anti-MadCAM-1	Miglioramento del decorso dell'infiammazione	Hokari et al., 2001

Tabella 2. Evidenze pre-cliniche sul ruolo dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ e MAdCAM-1 nell'infiammazione intestinale.

TNBS, acido 2,4,6-trinitrobenzensolfonico. DSS, sodio destransolfato

4.2. Studi nell'uomo

Alcuni studi hanno esaminato l'espressione dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ nei linfociti circolanti e nel tessuto intestinale di pazienti affetti da colite ulcerosa e malattia di Crohn, al fine di determinare il ruolo specifico di questo fattore molecolare nella fisiopatologia delle MICI. Meenan et al. (1998) hanno valutato i livelli di linfociti circolanti che esprimono l'integrina $\alpha 4\beta 7$ in pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn. I loro risultati hanno evidenziato che, rispetto a soggetti sani di controllo, nei pazienti con malattia di Crohn la quota di linfociti $\alpha 4\beta 7^+$ risulta significativamente aumentata, mentre nei pazienti con colite ulcerosa si osserva un aumento che tuttavia non raggiunge la significatività statistica. Souza et al., (1999) hanno inoltre osservato un incremento della densità di cellule che esprimono l'integrina $\alpha 4\beta 7$ nella lamina propria del colon di pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn, rispetto a quanto evidenziato nei tessuti prelevati da soggetti di controllo affetti da sindrome dell'intestino irritabile.

Le evidenze pre-cliniche e cliniche ottenute nel corso degli anni hanno promosso lo sviluppo di anticorpi monoclonali specifici anti-integrina, in grado di bloccare la migrazione dei linfociti attivati verso i tessuti intestinali infiammati, che sono stati valutati come

trattamenti innovativi delle MICI. Il primo di questi anticorpi, attivo come bloccante selettivo della subunità α_4 , è stato natalizumab. Questo anticorpo è stato studiato per la prima volta in 30 pazienti con malattia di Crohn e ha dimostrato la propria superiorità rispetto al placebo nell'indurre la remissione clinica della malattia (Gordon et al., 2001). Studi clinici successivi, più estesi, hanno confermato l'efficacia clinica di natalizumab nel trattamento della malattia di Crohn (Sandborn et al., 2005; Targan et al., 2007). I dati di efficacia relativi al trattamento della colite ulcerosa con natalizumab sono risultati tuttavia meno soddisfacenti (Gordon et al., 2002). Etrolizumab (rhuMAb Beta7), un anticorpo specifico diretto contro la subunità β_7 , si trova attualmente nella fase 2 di sperimentazione clinica in pazienti con colite ulcerosa, con risultati promettenti. Altre linee di ricerca hanno portato alla messa a punto di anticorpi diretti contro l'integrina $\alpha_4\beta_7$. In questo contesto AMG181 ha terminato la fase 1 di sperimentazione in pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn con risultati incoraggianti. Tuttavia, la fase 2 è stata temporaneamente sospesa a causa di problemi legati all'inaccuratezza della documentazione a supporto degli studi sperimentali. Un altro anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, vedolizumab, ha terminato la fase 3 di sperimentazione in pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn ed ha ricevuto l'autorizzazione per l'immissione in commercio sia negli Stati Uniti che in Europa. Una descrizione dettagliata dei profili farmacologici pre-clinici e clinici del vedolizumab è oggetto specifico del presente articolo ed è riportata nei capitoli seguenti.

La prima dimostrazione relativa all'aumento dell'espressione di MAdCAM-1 nell'intestino umano in contesti patologici è stata fornita dallo studio di Briskin et al. (1997). Questi autori hanno osservato che in tessuti intestinali infiammati ottenuti da pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn l'espressione di MAdCAM-1 risulta significativamente aumentata. Questi risultati sono stati confermati da Souza et al. (1999), i quali hanno evidenziato un aumento dell'espressione di MAdCAM-1 nell'endotelio vascolare del colon in

pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn. Successivamente, Arihiro et al. (2002) hanno osservato che l'espressione di MAdCAM-1 è significativamente più elevata nei tessuti intestinali prelevati da pazienti con malattia di Crohn, rispetto a quelli affetti da colite ulcerosa, sollevando l'ipotesi che questa espressione differenziale potrebbe riflettere una maggiore intensità ed estensione della reazione infiammatoria associata alla malattia di Crohn. Nell'uomo, uno studio condotto su pazienti con colite ulcerosa ha dimostrato l'efficacia ed un buon profilo di tollerabilità dell'anticorpo PF-547659 anti-MAdCAM-1 (Vermeire et al., 2011). Attualmente, PF-547659 si trova in fase II di sperimentazione clinica su pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn (Lobaton et al., 2014). I dati relativi allo sviluppo clinico dei nuovi farmaci attivi come inibitori dell'adesione leucocitaria sono riassunti nella Tabella 3.

Farmaco	Bersaglio molecolare	Via di somministrazione	Patologia e relativa fase di sperimentazione	
			Malattia di Crohn	Colite ulcerosa
Natalizumab	α_4	endovenosa	Approvato in USA1	Studio pilota
Vedolizumab	$\alpha_4\beta_7$	endovenosa	Approvato in USA ed UE	Approvato in USA ed UE
Etrolizumab (rhuMAb β_7)	β_7	endovenosa/sottocutanea	-	Fase 2
AMG181	$\alpha_4\beta_7$	endovenosa/sottocutanea	Fase 1 (in corso) Fase 2 (interrotta)*	Fase 1 (in corso) Fase 2 (interrotta)*
PF-00547659	MAdCAM-1	endovenosa/sottocutanea	Fase 1 e 2 (in corso)	Fase 1 Fase 1 e 2 (in corso)
AJM300	α_4	orale	-	Fase 1
CCX282-B	CCR9	orale	Fase 3 (interrotta)**	-

Tabella 3. Nuove molecole attive sul sistema dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ in fase di sperimentazione clinica per il trattamento delle MICI

l'impiego limitato a causa del rischio di sviluppo di PML

*interrotta a causa di problemi legati all'inaccuratezza della documentazione relativa alla fase sperimentale

**programma sospeso dopo uno studio in cui il farmaco non era stato in grado di soddisfare l'obiettivo primario

Adattato da: Lobaton et al., 2014.

5. Ruolo del recettore CCR9 per la chemochina CCL25 nella migrazione intestinale dei linfociti

I recettori per le chemochine svolgono un ruolo importante nella regolazione del tropismo intestinale delle cellule T (Kunkel e Butcher, 2002). Infatti, l'interazione tra le chemochine espresse sulle cellule endoteliali e specifici recettori per le chemochine espressi sui linfociti determina l'attivazione delle molecole di adesione presenti sulla superficie dei linfociti, dando inizio al processo di migrazione tissutale (Agace, 2006). Per quanto riguarda il ruolo specifico delle chemochine nell'attivazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, è stato osservato che il recettore CCR9 risulta selettivamente espresso in una sottopopolazione di linfociti T circolanti nel sangue periferico umano che esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$, nei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ presenti nell'intestino tenue dell'uomo e del topo, e in una minoranza di linfociti T localizzati nel colon umano e di topo, mentre questa integrina è scarsamente espressa nei linfociti T residenti in altri tessuti non linfoidei (Zabel et al., 1999; Kunkel et al., 2000; Papadakis et al., 2001; Svensson et al., 2002).

Il ligando di CCR9, CCL25 risulta costitutivamente e selettivamente espresso nelle cellule epiteliali dell'intestino tenue dell'uomo e del topo (Kunkel et al., 2000; Wurbel et al., 2000; Papadakis et al., 2001). Studi condotti nel topo, utilizzando anticorpi specifici anti-CCL25, insieme ad esperimenti svolti tramite l'impiego di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ *knockout* per CCR9 o CCL25, hanno dimostrato un ruolo importante del complesso CCR9-CCL25 nel processo di migrazione selettiva delle cellule T effettrici nella lamina propria e nell'epitelio dell'intestino tenue, ma non del colon, fegato o polmoni (Svensson et al., 2002; Johansson-Lindbom et al., 2003; Stenstad, et al., 2006; Wurbel et al., 2007). Più recentemente, Villablanca e Mora (2011) hanno osservato che, iniettando nel topo cellule T stimulate in modo da indurre l'espressione del recettore CCR9, queste migravano selettivamente

nell'intestino, a differenza dei linfociti di controllo che non esprimevano questo recettore. È stato pertanto concluso che l'espressione di CCR9 sembra definire un sottoinsieme di cellule T effettrici dotate di tropismo selettivo per l'intestino tenue.

L'efficacia anti-infiammatoria associata al blocco del recettore CCR9 è stata valutata in alcuni studi pre-clinici. In uno studio condotto su topi SAMP1/YitFc con ileite spontanea è stata valutata l'efficacia anti-infiammatoria di un anticorpo specifico anti-recettore CCR9, sia nelle fasi iniziali che in quelle più avanzate della patologia. I risultati hanno evidenziato che il trattamento con l'anticorpo induceva un miglioramento dell'infiammazione nelle sue fasi iniziali, mentre risultava inefficace nella fase più avanzata. Gli autori hanno infatti osservato che la popolazione linfocitaria CCR9⁺ aumentava nelle fasi precoci dell'infiammazione, per poi ridursi drasticamente nelle fasi avanzate, rappresentando quindi una possibile giustificazione per la perdita di efficacia dell'anticorpo durante la fase più tardiva del trattamento (Rivera-Nieves et al., 2006). Successivamente è stata studiata per la prima volta l'efficacia anti-infiammatoria di un antagonista selettivo di CCR9, CCX282-B, una piccola molecola attiva per via orale, in un modello di infiammazione intestinale spontanea nel topo TNF-ΔARE, caratterizzato da elevati livelli di TNF. I risultati hanno evidenziato che CCX282-B risultava in grado di migliorare il danno infiammatorio intestinale (Walters et al., 2010). A livello clinico, gli studi sull'efficacia di CXC282-B non hanno tuttavia prodotto risultati soddisfacenti (Lobaton et al., 2014). L'ultimo studio clinico di fase 3 è stato interrotto in quanto non è stato raggiunto l'obiettivo relativo al parametro primario di efficacia.

6. Razionale per lo sviluppo dei farmaci anti-integrina

Una fase essenziale per il processo di migrazione cellulare dal sangue ai tessuti infiammati è l'adesione dei linfociti circolanti all'endotelio delle venule post-capillari. Nella prima fase, mediata da selectine e integrine, i linfociti sono catturati, interagendo però

scarsamente con le cellule endoteliali (fase di rotolamento) (Von Adrian et al., 2000). Successivamente alla fase di rotolamento, i leucociti, attraverso le chemochine liberate dall'endotelio venulare, vengono attivati (Von Adrian et al., 2000). Le chemochine si legano a specifici recettori accoppiati a proteine G, innescando segnali intracellulari che portano all'attivazione delle integrine e all'adesione dei linfociti sulla superficie endoteliale. Solo quando tutte le fasi sono state completate i linfociti adesi possono migrare all'interno del tessuto infiammato (Von Adrian et al., 2000).

L'integrina $\alpha_4\beta_1$ è quella maggiormente caratterizzata tra quelle appartenenti alla famiglia β_1 (Thomas e Baumgart, 2012). Questa integrina, legandosi alla molecola di adesione cellulare vascolare (VCAM)-1, svolge un ruolo importante nei processi di migrazione dei linfociti, monociti, eosinofili e cellule *natural killer* dal sangue all'interno di diversi distretti organici, compreso il sistema nervoso centrale (Thomas e Baumgart, 2012). A livello del tratto intestinale è stato osservato che i linfociti $CD4^+$, che migrano nella lamina propria, esprimono in maniera nettamente predominante l'integrina $\alpha_4\beta_7$ e il recettore CCR9 per le chemochine (Thomas e Baumgart, 2012). Questi fattori molecolari di regolazione del traffico cellulare, così come i loro rispettivi ligandi, sono essenziali per una migrazione efficiente delle cellule T nell'intestino tenue. L'integrina $\alpha_4\beta_7$ può interagire con VCAM-1 e MAdCAM-1. In particolare, l'interazione di $\alpha_4\beta_7$ con MAdCAM-1 regola la migrazione dei linfociti in maniera selettiva verso i tessuti del tratto gastrointestinale (Thomas e Baumgart, 2012). MAdCAM-1, il ligando principale dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, è espresso nelle venule della lamina propria intestinale (Fiorino et al., 2010). CCL25/TECK, il ligando del recettore CCR9, è marcatamente espresso sulle cellule epiteliali del piccolo intestino e nelle venule della lamina propria (Wurbel et al., 2011). Sulla base di queste evidenze, è stato dimostrato che è possibile modulare selettivamente la migrazione dei linfociti nel tessuto intestinale infiammato attraverso il blocco dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ con ripercussioni minime sulla capacità dei leucociti di

migrare dal sangue verso altri organi (Thomas e Baumgart, 2012). L'integrina $\alpha_4\beta_7$ è importante anche per la migrazione dei linfociti T nei tessuti dell'intestino crasso in presenza di processi infiammatori. Tuttavia, l'intestino crasso non esprime CCR9 e CCL25. In linea con queste evidenze, è stato osservato che la desensibilizzazione di CCR9 o il blocco di CCL25 riduce l'adesione dei linfociti T all'endotelio delle venule dell'intestino tenue, ma non dell'intestino crasso. Per questa ragione è stata ipotizzata la presenza di altri sistemi molecolari chemoattrattori in grado di interagire con l'integrina $\alpha_4\beta_7$ e di guidare la migrazione linfocitaria a livello della mucosa colica (Fiorino et al., 2010).

Lo sviluppo di farmaci in grado di bloccare la migrazione linfocitaria, quale nuova strategia terapeutica per contrastare i processi infiammatori, ha visto nel natalizumab il capostipite di una nuova classe di farmaci biotecnologici. In particolare, natalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro l'integrina $\alpha_4\beta_1$ (denominata anche VLA-4), è stato approvato nel 2004 dalla FDA e nel 2006 dall'EMA per il trattamento della sclerosi multipla recidivante remittente (SMRR) ad elevata attività in pazienti adulti che non abbiano risposto all'IFN- β o che siano affetti da SMRR grave e ad evoluzione rapida (Rudick et al., 2006; Polman et al., 2006). Successivamente, il suo impiego terapeutico è stato esteso all'ambito gastroenterologico, solo negli USA, per il trattamento della malattia di Crohn, sulla base di evidenze cliniche a supporto della capacità di natalizumab di mantenere lo stato di remissione di questa patologia (Feagan et al., 2007). Tuttavia, nel corso degli anni i dati dell'osservazione *post-marketing* hanno evidenziato l'insorgenza di casi di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) tra i pazienti trattati con natalizumab. La PML è una malattia degenerativa grave, spesso fatale, del sistema nervoso centrale, causata da un'infezione opportunistica associata alla riattivazione del virus John Cunningham (JC) (Yousry et al., 2006). Da successive revisioni della evidenze scientifiche è emerso che l'aumentata incidenza di PML nei pazienti in trattamento con natalizumab fosse da ascrivere al blocco dell'integrina

$\alpha_4\beta_1$. In particolare, è stato proposto che natalizumab, sopprimendo la migrazione dei leucociti verso i tessuti del sistema nervoso centrale, riduca il numero di linfociti T CD4⁺ (implicati nell'immunosorveglianza di questo distretto organico) nel fluido cerebrospinale, facilitando in tal modo l'attacco da parte del virus JC (Ransohoff, 2005).

In seguito all'insorgenza di casi di PML legati all'impiego terapeutico di natalizumab, l'attenzione della comunità scientifica si è rivolta all'identificazione di nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci utili ed efficaci per il trattamento delle MICI, in grado di contrastare in maniera specifica la migrazione dei linfociti verso i tessuti intestinali, senza ripercussioni sull'attività dei linfociti a livello del sistema nervoso centrale e, di conseguenza, senza il rischio di induzione di PML. Sulla base di queste premesse, è stato sviluppato vedolizumab, un anticorpo monoclonale anti-integrina $\alpha_4\beta_7$, in grado di esercitare un blocco selettivo del processo di migrazione dei linfociti attivati dal compartimento circolatorio verso i tessuti intestinali infiammati. Nei capitoli seguenti sono descritte in maniera dettagliata le proprietà farmacologiche precliniche e cliniche di questo nuovo farmaco biotecnologico.

7. Vedolizumab: struttura molecolare

Vedoluzimab è un anticorpo monoclonale IgG1 umanizzato che riconosce e blocca il complesso eterodimero $\alpha_4\beta_7$ dell'integrina umana (denominazione chimica: IgG1- κ , *antihuman integrin lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule 1*, peso molecolare 147 kDa) (McLean et al., 2012). Le versioni precedenti di questo anticorpo sono note come MLN0002, MLN02 e LDP-02. Esse rappresentano il risultato di processi volti ad ottenere un progressivo miglioramento delle proprietà farmacologiche dell'anticorpo rispetto alla molecola originaria, costituita dall'anticorpo murino anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ ACT-1. Tali cambiamenti sono stati introdotti principalmente al fine di ottimizzare il processo di umanizzazione della molecola anticorpale murina originaria, in modo da mantenere un'elevata affinità di legame con il

bersaglio molecolare (integrina $\alpha_4\beta_7$) e, nel contempo, ridurre la sua immunogenicità, ovvero la sua capacità di evocare reazioni da parte del sistema immunitario dopo la somministrazione ai pazienti (Wyant et al., 2013).

Nel DNA che codifica per il vedolizumab, costituito da 2 catene proteiche leggere e 2 catene proteiche pesanti, legate tra loro da due ponti disolfuro che conferiscono alla molecola la tipica forma a Y delle immunoglobuline IgG1, sia la porzione che codifica per il frammento cristallizzabile (Fc) che la sequenza che codifica per il frammento responsabile del legame con il bersaglio molecolare (Fab) sono state sostituite con le sequenze umane corrispondenti, mantenendo tuttavia nella catena leggera e in quella pesante del Fab le sequenze di DNA murino che codificano per la frazione variabile che riconosce come antigene l'integrina umana $\alpha_4\beta_7$ (Tidswell et al., 1997).

L'umanizzazione dell'anticorpo murino originale ACT-1 è stata ottenuta tramite trasformazione di linee cellulari batteriche e di lieviti, e di transfezione di linee cellulari di insetti o di mammiferi per mezzo di vettori virali ricombinanti contenenti le sequenze di DNA che codificano per la catena leggera e la catena pesante umana, a loro volta ricombinate con le sequenze che codificano per i siti di complementarietà murini (3 nella catena leggera e 3 nella catena pesante) propri dell'anticorpo anti- $\alpha_4\beta_7$ ACT-1, ovvero le sequenze che codificano per le regioni molecolari dell'anticorpo umanizzato necessarie per il riconoscimento del complesso $\alpha_4\beta_7$ dell'integrina. Vedolizumab e ACT-1 condividono pertanto le stesse regioni molecolari necessarie per il riconoscimento di un epitopo generato dalla formazione del complesso molecolare tra le subunità α_4 e β_7 dell'integrina, ma non sono in grado di interagire con le singole subunità. Tale epitopo è localizzato in una regione molecolare del complesso $\alpha_4\beta_7$ necessaria per l'interazione di questa integrina con il proprio ligando endogeno, la molecola di adesione MAdCAM-1. Di conseguenza, il legame di ACT-1 o di vedolizumab con l'epitopo del complesso molecolare $\alpha_4\beta_7$ impedisce all'integrina l'interazione con

MAdCAM-1 e il successivo processo di migrazione dei linfociti che esprimono $\alpha_4\beta_7$ verso i tessuti intestinali (Fedorak et al., 2000).

Ciascuna molecola di vedolizumab contiene complessivamente 12 ponti disolfuro localizzati all'interno delle catene aminoacidiche e tra le diverse catene. Su ciascuna catena pesante, in corrispondenza del residuo di asparagina 301, è presente un sito di glicosilazione. Rispetto alla versione precedente LDP-02, nella sequenza della catena leggera di vedolizumab due aminoacidi della sequenza murina sono stati sostituiti con due aminoacidi della sequenza umana al fine di ridurre la quota murina della molecola. Anche gli aminoacidi alanina in posizione 114 e aspartato in posizione 115 sono stati sostituiti, rispettivamente, con treonina e valina, per modificare le proprietà di idrofobicità del vedolizumab. Inoltre, al fine di ridurre l'affinità del frammento Fc del vedolizumab per il recettore Fc γ , al quale sono associati i processi di citotossicità anticorpo-mediata e complemento-mediata (Wyant et al., 2013), nella sequenza aminoacidica dell'anticorpo responsabile dell'interazione con il recettore Fc γ (ELLGGP) gli aminoacidi leucina in posizione 239 e glicina in posizione 241 sono stati sostituiti con residui di alanina (Hamann et al. 1994).

8. Vedolizumab: studi di farmacologia preclinica

8.1. Studi su modelli sperimentali in vitro

Vedolizumab riconosce come bersaglio molecolare in maniera selettiva il complesso dell'integrina $\alpha_4\beta_7$. Grazie alla sua interazione con tale bersaglio, vedolizumab blocca la migrazione dei linfociti circolanti verso i tessuti intestinali, modulando selettivamente l'attività infiammatoria dipendente dai linfociti a livello intestinale, senza interferire in maniera significativa con l'attività del sistema immunitario in altri distretti dell'organismo. Sotto questo profilo, rispetto ad altri anticorpi anti-integrina che lo hanno preceduto (per es. natalizumab), vedolizumab è caratterizzato da un profilo farmacologico peculiare che si

connota sostanzialmente per quattro proprietà: 1) il legame di vedolizumab con l'integrina $\alpha_4\beta_7$ è altamente specifico rispetto alla sua possibile interazione con altre integrine; 2) vedolizumab è in grado di antagonizzare in maniera selettiva l'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e la molecola di adesione MAdCAM-1; 3) vedolizumab lega una frazione, pari al 25% del totale, di linfociti T $CD4^+$ -memory con affinità molto elevata (livello subnanomolare); 4) vedolizumab blocca selettivamente la migrazione di sottopopolazioni di linfociti T attivati verso i tessuti intestinali.

8.1.1. Specificità e reversibilità di legame con l'integrina $\alpha_4\beta_7$

La capacità di vedolizumab di legare l'integrina $\alpha_4\beta_7$ in maniera specifica rispetto ad altre integrine è stata saggiata per mezzo di linee cellulari che esprimono selettivamente l'integrina $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$ o $\alpha_E\beta_7$. Impiegando anticorpi specifici per le subunità α_4 , α_E , β_1 o β_7 , sono state caratterizzate tre linee cellulari, delle quali due umane (RPMI8866 e RAMOS) derivanti da linfoma e una ($\alpha_E\beta_7$ -L1.2) ottenuta da linfoma murino, con differenti profili di espressione delle diverse subunità delle integrine (Soler et al., 2009). Per mezzo di questi modelli cellulari è stato servato che vedolizumab è in grado di legarsi alle cellule RPMI8866, che esprimono solo le subunità α_4/β_7 , ma non alla linea cellulare umana RAMOS e alla linea murina transfettata $\alpha_E\beta_7$ -L1.2, che esprimono, rispettivamente le subunità α_4/β_1 e α_E/β_7 (Soler et al., 2009). Questi risultati indicano che vedolizumab si lega selettivamente al complesso α_4/β_7 , ma non ai singoli monomeri che lo compongono né ad altri complessi eterodimeri delle integrine (Fedorak et al., 2000).

Il profilo di espressione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nelle cellule di sangue intero umano è stato studiato al fine di identificare le popolazioni di leucociti circolanti la cui funzionalità può essere alterata dal legame di vedolizumab con l'integrina $\alpha_4\beta_7$. Per mezzo di tecniche di

citometria a flusso è stato osservato che vedolizumab si lega a bassi livelli ad una esigua sottopopolazione di monociti (circa il 15%), ma non ai polimorfonucleati neutrofili. I livelli più elevati di *binding* del vedolizumab sono stati evidenziati nelle cellule T CD4⁺-*memory* che infatti esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$ (Schweighofer et al., 1993). Inoltre, per mezzo di analisi immunoistochimiche è stata esaminata la specificità di legame di vedolizumab in 38 campioni di tessuti umani. In questi esperimenti sono stati identificati siti di *binding* specifici per vedolizub in infiltrati di cellule immunitarie a livello dei tessuti del tratto gastrointestinale, quali stomaco, intestino tenue e colon. Siti specifici di *binding* sono stati inoltre evidenziati nella milza, nella vescica, nelle cellule presenti nel lume dei vasi sanguigni e, con minore densità, nei tessuti linfoidi (Soler et al., 2009).

Studi di farmacodinamica *in vitro* hanno evidenziato che gli effetti del vedolizumab mediati dalla sua interazione con il complesso dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ sono reversibili in seguito alla rimozione dell'anticorpo dai mezzi di incubazione delle linee cellulari utilizzate negli esperimenti (Wyant et al., 2013). In particolare, per mezzo di tecniche di fluorescenza è stato osservato che nei linfociti T CD4⁺ ottenuti da sangue intero umano vedolizumab si lega all'integrina $\alpha_4\beta_7$ e che il complesso vedoluzimab-integrina così formato viene internalizzato entro 24 ore dal trattamento. Tale effetto è tuttavia reversibile, poiché, dopo la rimozione di vedolizumab dal mezzo di incubazione, le cellule sono in grado di esporre nuovamente sulla propria membrana cellulare il complesso integrinico $\alpha_4\beta_7$, ed esso risulta pienamente funzionante ovvero nuovamente in grado di legare la molecola di adesione MAdCAM-1. Questi risultati suggeriscono che le cellule del sistema immunitario hanno la potenzialità di tornare al proprio stato di attivazione precedente al trattamento con vedolizumab e quindi di ripristinare la propria funzionalità (Wyant et al., 2013).

8.1.2. Selettività di inibizione dell'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e le molecole di adesione

Sono stati condotti esperimenti sulle linee cellulari RPMI8866 e RAMOS per verificare la capacità di vedolizumab di interferire con l'interazione tra integrina $\alpha_4\beta_7$ e le molecole di adesione, quali MAdCAM-1, VCAM-1 e fibronectina. I dati ottenuti hanno dimostrato che: 1) l'integrina $\alpha_4\beta_7$ si lega a MAdCAM-1, VCAM-1 e fibronectina, mentre l'integrina $\alpha_4\beta_1$ si lega a VCAM-1 e fibronectina, ma non a MAdCAM-1; 2) a concentrazioni sub-nanomolari vedolizumab inibisce l'interazione tra $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 o fibronectina, ma non quella tra $\alpha_4\beta_7$ e VCAM-1, $\alpha_4\beta_1$ e VCAM-1 o $\alpha_4\beta_1$ e fibronectina. La selettività d'azione di vedolizumab si mantiene fino a concentrazioni di 400 $\mu\text{g/ml}$, che sono valori superiori alle concentrazioni medie di picco misurate nell'uomo (Soler et al., 2009). Questi risultati suggeriscono una scarsa o assente capacità di interferenza da parte di vedolizumab con il reclutamento dei linfociti nel sistema nervoso centrale, un processo che dipende primariamente dall'integrina $\alpha_4\beta_1$, il blocco della quale può causare marcata immunodepressione centrale con aumento del rischio di insorgenza di PML.

8.1.3. Effetti sull'integrità e sulla funzione dei linfociti

Studi *in vitro* hanno dimostrato che il legame di vedolizumab con l'integrina $\alpha_4\beta_7$ non causa risposte mediate dal frammento Fc. Infatti, in esperimenti nei quali vedolizumab è stato saggiato a concentrazioni fino a 10 $\mu\text{g/ml}$ (approssimativamente 20 volte superiori a quelle necessarie per saturare il legame di vedolizumab alle cellule di sangue intero e alla linea cellulare RPMI8866) non è stata osservata l'induzione di processi di citotossicità né complemento-mediata né anticorpo-mediata (Wyant et al., 2013). Nello stesso studio è stata valutata la possibilità che vedolizumab, inducendo l'internalizzazione dell'integrina α_4/β_7 , fosse in grado di attivare i linfociti T che esprimono tale integrina, con susseguente liberazione di citochine e conseguenze rilevanti a livello clinico. Gli esperimenti hanno

tuttavia evidenziato che l'espressione dei marcatori di attività linfocitaria precoce, quale CD69, e tardiva, quale CD25, non viene modificata dal legame di vedolizumab con l'integrina $\alpha_4\beta_7$, e che tale legame si associa alla liberazione di citochine quali interferone- γ , interleuchina IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-17 (Wyant et al., 2013).

Alcune serie di esperimenti sono state condotte per valutare gli effetti del vedolizumab su cellule immunitarie regolatrici. In particolare, le cellule regolatrici di tipo T (Treg) svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi immunitaria a livello della mucosa intestinale e si ritiene che tali cellule siano in grado di contrastare l'attività infiammatoria intestinale in pazienti affetti da colite ulcerosa o malattia di Crohn. Per mezzo di determinazioni basate sulla citometria a flusso è stato valutato che le cellule Treg rappresentano circa il 13% delle cellule β_7 CD4⁺ circolanti. I risultati degli esperimenti successivi hanno quindi permesso di evidenziare che vedolizumab non è in grado di interferire con la funzionalità delle cellule T reg (Wyant et al., 2013).

8.1.4. Specificità di specie

L'affinità di legame di vedolizumab e del suo omologo murino ACT-1 con i linfociti umani prelevati da sangue intero è risultata, rispettivamente, pari a 0.3-0.4 nM e 0.39-0.52 nM. Il confronto dei valori di IC₅₀, ottenuti valutando l'affinità di legame di vedolizumab ai linfociti B o T CD4⁺ in diverse specie di mammifero, ha permesso di evidenziare livelli di *binding* molto simili: 0.26-0.42 nM nel coniglio; 0.39-0.47 nM nella scimmia *cynomolgus*; 0.40-0.47 nM nell'uomo. La cross-reattività di legame del vedolizumab con i leucociti delle diverse specie animali è stata valutata tramite esperimenti di saturazione o competizione e quantificata tramite citometria a flusso impiegando sangue intero ottenuto da specie diverse quali topo, ratto, cavia, coniglio, scimmia *cynomolgus*, scimmia *rhesus* e uomo. Questi esperimenti hanno permesso di osservare che sia vedolizumab che ACT-1 si legano con

affinità simile, dell'ordine del sub-nanomolare, all'integrina $\alpha_4\beta_7$ nel coniglio, nella scimmia *cynomolgus*, nella scimmia *rhesus* e nell'uomo, ma non nel topo, nel ratto e nella cavia (Haanstra et al., 2013). Sulla base di tali evidenze sperimentali, il coniglio e la scimmia sono stati selezionati come le specie animali più appropriate per l'esecuzione di esperimenti sulle proprietà farmacologiche del vedolizumab. Per esempio, esperimenti di *binding* nella scimmia hanno permesso di osservare che in questa specie il legame di vedolizumab è circoscritto ai leucociti dei tessuti linfoidei, alle cellule presenti nel lume dei vasi sanguigni e a infiltrati cellulari con basso indice infiammatorio in tessuti di tipo non-linfoide (EMA, 2013).

8.2. Studi su modelli sperimentali in vivo

Una serie di esperimenti è stata condotta nella scimmia *cynomolgus* con l'obiettivo di determinare se l'antagonismo svolto da vedolizumab nei confronti dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ fosse in grado di indurre effetti a livello sia intestinale che extra-intestinale. Gli esemplari di scimmia inclusi nello studio sono stati sottoposti a trattamento con vedolizumab alle dosi di 10, 30 e 100 mg/kg per mezzo di infusione endovenosa ogni 2 settimane per periodi di 3, 13 e 26 settimane (Fedyk et al., 2012). In questo modello, dopo la somministrazione, vedolizumab si lega selettivamente a cellule linfoidee che sono localizzate nei tessuti del tratto gastrointestinale ed esprimono integrina $\alpha_4\beta_7$. La più alta densità di legame è stata evidenziata nel colon e nell'intestino tenue. Inoltre, il profilo di *binding* del vedolizumab ai linfociti T CD4⁺-*memory* è risultato molto simile a quello osservato nelle cellule umane in termini di affinità e saturabilità. Infatti, l'analisi citometrica a flusso ha evidenziato una riduzione significativa dei linfociti T CD4⁺ nei tessuti del tratto gastrointestinale dopo somministrazione di vedolizumab e un parallelo aumento di queste cellule a livello ematico, senza variazioni significative delle altre popolazioni di cellule leucocitarie. In alcuni animali è stato tuttavia osservato che la risposta linfocitaria al vedolizumab diminuiva nel tempo, soprattutto quando il farmaco

raggiungeva le sue più basse concentrazioni ematiche dopo ciascuna somministrazione, e che tale riduzione poteva essere attribuita alla produzione di anticorpi anti-vedolizumab. In questi casi, l'intensità dell'effetto sui linfociti risultava inversamente correlabile alla dose di vedolizumab somministrata, suggerendo quindi che l'attività farmacologica del vedolizumab veniva neutralizzata dalla produzione di anticorpi anti-farmaco (Fedyk et al., 2012). Nello stesso studio, la determinazione di possibili effetti del vedolizumab sull'immunità innata, tramite valutazione dell'attività delle cellule NK, e sull'immunità adattativa, tramite analisi dell'attività delle cellule dendritiche e dei linfociti T, ha evidenziato che vedolizumab non interferisce con le funzioni svolte da tali componenti cellulari del sistema immunitario (Fedyk et al., 2012).

Le evidenze ottenute nella scimmia *cynomolgus* sono in accordo con i dati raccolti utilizzando l'anticorpo ACT-1 murino, il precursore di vedolizumab, in un altro modello sperimentale di primate rappresentato dalla scimmia tamarino edipo. Questo primate sviluppa in maniera spontanea una colite che dal punto di vista clinico e istologico è molto simile alla colite ulcerosa nell'uomo (Madara et al., 1985). In questo modello, l'anticorpo ACT-1 è stato somministrato alla dose di 2 mg/kg per via endovenosa il primo giorno di trattamento e poi per via intramuscolare in successive somministrazioni quotidiane per un totale di 8 giorni. Gli effetti del trattamento con ACT-1 sono insorti rapidamente: già dopo 24-48 ore dall'inizio del trattamento gli animali presentavano una risoluzione della sintomatologia diarroica; al termine del trattamento è stata osservata una riduzione dell'attività infiammatoria, della densità dei leucociti nella mucosa colica e delle alterazioni degenerative a carico dei tessuti intestinali. A questi effetti non si accompagnavano alterazioni del profilo di espressione della molecola di adesione MAdCAM-1 (Hesterberg et al., 1996).

Uno studio ha valutato se l'antagonismo selettivo del vedolizumab verso il complesso $\alpha_4\beta_7$ fosse in grado di compromettere la reattività immunitaria a livello del sistema nervoso centrale (Haanstra et al., 2013). Per perseguire tale obiettivo, gli autori hanno impiegato un modello sperimentale di encefalomielite autoimmune, ottenuta tramite immunizzazione di esemplari di scimmia *rhesus* con un composto denominato MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Tale modello è infatti noto per il coinvolgimento delle cellule T nell'eziologia della risposta infiammatoria che connota la malattia (Kerlero de Rosbo et al., 2000) ed è ampiamente utilizzato per valutare possibili alterazioni del sistema immunitario in seguito a trattamenti farmacologici (Haanstra et al., 2013). Gli animali impiegati in questo studio sono stati trattati per via endovenosa con una dose di 30 mg/kg di vedolizumab o di natalizumab, ai quali ha fatto seguito nello stesso giorno la procedura di induzione dell'encefalomielite (la terapia con i farmaci anti-integrina è poi proseguita una volta alla settimana per 3 settimane consecutive). In questo studio, i profili di espressione delle integrine $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ nella scimmia sono risultati simili a quelli presenti nell'uomo. Natalizumab ha prevenuto i processi infiammatori e le lesioni da demielinizzazione nel sistema nervoso centrale, ha ridotto in maniera significativa i livelli di leucociti nel liquido cefalorachidiano ed ha causato un aumento del numero di leucociti nel sangue periferico. Questi effetti non sono stati osservati nel gruppo di animali trattati con placebo o con vedolizumab. Considerate nell'insieme, queste evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'azione bloccante del vedolizumab nei confronti del complesso $\alpha_4\beta_7$ non interferisce con la reattività immunitaria a livello del sistema nervoso centrale (Haanstra et al., 2013).

9. Vedolizumab: studi di farmacologia clinica

9.1. Profilo farmacocinetico

I profili farmacocinetici di vedolizumab sono risultati simili nei pazienti affetti da colite ulcerosa o malattia di Crohn. Nella *clearance* ematica del vedolizumab sono coinvolti meccanismi sia lineari che non-lineari, e la componente non-lineare si riduce all'aumentare delle concentrazioni ematiche del farmaco (Poole, 2014).

Nei primi studi clinici di fase II, vedolizumab è stato somministrato per via endovenosa alle dosi di 0,5 e 2 mg/kg. Nello studio di Feagan et al. (2005), condotto su pazienti con colite ulcerosa, sono stati stimati valori medi di picco sierico del farmaco pari a 12,5 µg/mL e 52 µg/mL, e valori di emivita di eliminazione pari a 9 e 12 giorni, rispettivamente alle dosi di 0,5 e 2 mg/kg. Nello studio di Feagan et al. (2008), svolto su pazienti con colite ulcerosa, concentrazioni sieriche di picco pari a 10 e 42 µg/mL sono state stimate a distanza di circa 1-2 ore dalla somministrazione endovenosa di vedolizumab alla dose di 0,5 e 2 mg/kg.

Uno studio di fase II successivo, svolto su 46 pazienti con colite ulcerosa, nel quale vedolizumab è stato somministrato alle dosi di 2, 6 o 10 mg/kg nei giorni 1, 15, 29 e 85, ha evidenziato un profilo cinetico dose-dipendente del farmaco. In particolare, le concentrazioni sieriche di vedolizumab sono aumentate all'aumentare della dose, per poi ridursi in maniera mono-esponenziale fino a livelli di 1-10 µg/mL, e continuare a decrescere successivamente in maniera non-lineare dopo la somministrazione dell'ultima dose, in corrispondenza del giorno 85. Anche la concentrazione sierica di picco (C_{max}) e l'area sottesa dalla curva concentrazione sierica-tempo (AUC) sono aumentate in relazione alla dose somministrata: la concentrazione di picco è risultata compresa tra 54 e 279 µg/mL al giorno 1, e tra 60,4 e 291,9 al giorno 85; l' $AUC_{giorno0-14}$ e l' $AUC_{giorno85-99}$ sono risultate comprese, rispettivamente tra 375 e 1765 giorni·µg/mL, e tra 473 e 2608 giorni·µg/mL. In questo studio l'emivita di eliminazione di vedolizumab è risultata approssimativamente compresa tra 15 e 22 giorni (Parikh et al., 2012).

Nei pazienti che sono stati trattati con vedolizumab alla dose di 300 mg tramite infusione endovenosa rapida (30 minuti) alla settimana zero e 2, con successive somministrazioni ad intervalli di 8 settimane a partire dalla sesta settimana, nell'ambito degli studi di fase III GEMINI I e GEMINI II, le concentrazioni ematiche di valle (minimali) misurate nei pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn sono risultate rispettivamente 26,3 e 27,4 µg/mL alla sesta settimana, e 11,2 e 13 µg/mL alla quarantaseiesima settimana (Poole, 2014). Dopo somministrazione di una dose di 300 mg, le concentrazioni ematiche di vedolizumab si riducono con una emivita ($t_{1/2}$) di circa 25 giorni. L'analisi cinetica di popolazione ha evidenziato una *clearance* lineare di circa 0,157 L/die e un volume di distribuzione di circa 5 L. L'età e il peso corporeo non sembrano influire in maniera clinicamente rilevante sul profilo cinetico di vedolizumab. Durante le fasi di mantenimento degli studi GEMINI I e GEMINI II, i livelli sierici medi di vedolizumab riscontrati nei pazienti trattati con la dose di 300 mg ogni 8 o 4 settimane sono risultati uguali o superiori a 10 mg/µL (Rosario et al., 2013; 2014a).

L'analisi condotta per mezzo di modelli cinetici di popolazione su un insieme di 2554 volontari sani e pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn, che erano stati arruolati in cinque studi clinici su vedolizumab (uno di fase I su volontari sani, uno di fase II e tre studi di fase III nell'ambito del programma GEMINI), ha mostrato che il profilo farmacocinetico del vedolizumab è descritto da un modello a due compartimenti con eliminazione parallela di tipo lineare e non-lineare. Questa analisi ha inoltre permesso di stimare un'emivita sierica di 25 giorni per la fase lineare dell'eliminazione, con valori di *clearance* lineare pari a 0,155 L/die e 0,159 L/die, rispettivamente, nei pazienti con malattia di Crohn e colite ulcerosa. I volumi di distribuzione nel compartimento centrale e periferico sono rispettivamente 3,19 L e 1,66 L. I valori basali di albumina sembrano influenzare in maniera clinicamente rilevante (+25%) la *clearance* lineare del vedolizumab, mentre tale parametro non sembra risentire significativamente di altri fattori (età, peso corporeo, attività di malattia, terapie pregresse con

farmaci anti-TNF, diagnosi di malattia di Crohn o di colite ulcerosa). Questi dati suggeriscono pertanto che l'età, il sesso, il peso corporeo e i livelli ematici di albumina non richiedono aggiustamenti della dose di vedolizumab (Rosario et al., 2014b; Dirks et al., 2014).

Alcuni autori hanno eseguito analisi esplorative con l'obiettivo di correlare la risposta clinica e la remissione clinica al trattamento con vedolizumab con le sue concentrazioni individuali stimate per mezzo dell'analisi cinetica di popolazione (C_{media}). Tale analisi è stata svolta sui dati ottenuti dai pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn arruolati, rispettivamente, negli studi di fase III GEMINI I e GEMINI II. I risultati hanno suggerito che valori più elevati di C_{media} durante la terapia di induzione della remissione si associano ad un aumento della probabilità di risposta e di remissione clinica alla sesta settimana. Tuttavia, la relazione tra l'esposizione al vedolizumab e la risposta terapeutica raggiunge un livello di *plateau* in corrispondenza di valori elevati di C_{media} . Inoltre, tale relazione non sembra dipendere da parametri covariati, anche se la sua stima sembra essere influenzata da fattori di confondimento, quali la terapia pregressa con farmaci anti-TNF, i livelli circolanti di albumina e i livelli fecali di calprotectina (French et al., 2014a,b; Rosario et al., 2014c,d).

9.2. Profilo farmacodinamico

9.2.1. Interazione con l'integrina $\alpha_4\beta_7$

Gli studi clinici di fase II hanno evidenziato che la somministrazione di vedolizumab a dosi comprese tra 0,2 e 10 mg/kg si associa ad una saturazione pressoché completa delle molecole di integrina $\alpha_4\beta_7$ espresse sulle membrane dei linfociti circolanti preposti alla sorveglianza immunitaria del tratto gastrointestinale (Feagan et al., 2005; Feagan et al., 2008; Parikh et al., 2012). In uno studio di fase II condotto su pazienti con colite ulcerosa una saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ di circa il 100% è stata osservata subito dopo la somministrazione di vedolizumab alle dosi di 2, 6 e 10 mg/kg. In particolare, è stata

evidenziata una saturazione massimale superiore al 95% a tutte le dosi saggiate in presenza di concentrazioni ematiche misurabili di vedolizumab (Parikh et al., 2012).

In uno studio di fase II, condotto su 185 pazienti con malattia di Crohn attiva trattati con vedolizumab alle dosi di 0,5 e 2 mg/kg o placebo ai giorni 1 e 29, è stata osservata una saturazione pressoché completa dei siti di integrina $\alpha_4\beta_7$ sulle cellule T-memory $CD4^+/CD45RO^+$ presenti nel sangue circolante periferico dopo somministrazione di entrambe le dosi di vedolizumab (Feagan et al., 2008). Questo studio ha permesso di evidenziare che, dopo la somministrazione di vedolizumab, alla fase di saturazione massimale dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ sui linfociti circolanti fa seguito un graduale processo di desaturazione delle cellule T-memory, e che in corrispondenza del giorno 29, subito prima della seconda somministrazione di vedolizumab, la percentuale media di cellule T-memory con siti $\alpha_4\beta_7$ liberi da farmaco è risultata pari a 17% e 4% con la dose, rispettivamente, di 2 mg/kg e 0,5 mg/kg. Una desaturazione completa delle molecole di $\alpha_4\beta_7$ è stata osservata a distanza di 85 giorni dopo la prima somministrazione di vedolizumab 0,5 mg/kg, e di 180 giorni dopo la prima somministrazione di vedolizumab 2 mg/kg (Feagan et al., 2008). In linea con i risultati ottenuti negli studi di fase II, gli studi di fase III GEMINI I e GEMINI II hanno evidenziato una saturazione dei siti $\alpha_4\beta_7$ superiore al 95% nelle cellule T $CD4^+CD45RO^+$ dei pazienti che, nella fase di mantenimento, sono stati trattati con vedolizumab alla dose di 300 mg ogni 4 o 8 settimane (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013).

9.2.2. Effetti sulla sorveglianza immunitaria del sistema nervoso centrale

Uno studio condotto su un gruppo di volontari sani (n=13) ha evidenziato che la somministrazione di vedolizumab, alla dose singola di 450 mg, non induce variazioni significative della proporzione di linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ presenti nel fluido cerebrospinale, a distanza di 5 settimane rispetto ai livelli basali, determinati prima della somministrazione

del farmaco. In particolare, i valori medi dei rapporti $CD4^+/CD8^+$ sono risultati pari a 3,59 e 3,61 (differenza media: 0,01; intervallo di confidenza 90% [IC90%] da -0,337 a 0,363). Inoltre le conte delle cellule $CD4^+$ e $CD8^+$ effettuate dopo la somministrazione di vedolizumab sono risultate simili ai valori basali, e non è stata evidenziata la presenza di vedolizumab nel fluido cerebrospinale. Queste osservazioni suggeriscono ulteriormente che vedolizumab non interferisce con le funzioni cellulari di sorveglianza immunitaria del sistema nervoso centrale (Milch et al., 2013). Al contrario, studi precedenti hanno mostrato che natalizumab altera in maniera significativa sia le conte dei linfociti che i rapporti delle cellule $CD4^+/CD8^+$ nel fluido cerebrospinale (Del Pilar Martin et al., 2008).

9.2.3. Effetti sulla risposta ai vaccini

Gli effetti di vedolizumab sulle risposte immunitarie alla somministrazione dei vaccini sono stati valutati in uno studio di fase I su 127 volontari sani (Wyant et al., 2015). A distanza di 4 giorni dalla somministrazione per via endovenosa di vedolizumab alla dose singola di 750 mg (n=64) o di placebo (n=63), i volontari sani sono stati sottoposti a due diverse procedure di vaccinazione: 1) somministrazione intramuscolare del vaccino per l'epatite B ai giorni 4, 32 e 60; 2) somministrazione orale del vaccino per il colera ai giorni 4 e 18. Per quanto riguarda la vaccinazione anti-epatite B, le percentuali di risposta positiva e le medie dei titoli anticorpali sierici anti-HBsAg sono risultati simili nel confronto tra gruppo trattato con vedolizumab e gruppo placebo (rispettivamente, 88,5% vs 90,3% per le risposte positive al vaccino, e 129,6 IU/L vs 114,4 IU/L per il titolo anticorpale anti-HBsAg). A conferma di questi dati, il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% (IC95%), stimato per la differenza assoluta della percentuale di siero-conversione (-1,8%; IC95% da -12,7% a 9,1%), è risultato compreso all'interno dei margini pre-specificati per la non-inferiorità (-15%). Al contrario di quanto osservato con la vaccinazione anti-epatite B, la percentuale di risposte

positive al vaccino orale anti-colera è risultata ridotta nei soggetti trattati con vedolizumab (82,5% vs 96,8%) e, a distanza di 74 giorni, i valori medi dei livelli di IgG anti-tossina colerica sono risultati più bassi nel gruppo vedolizumab rispetto al gruppo placebo (3007,8 vs 9210,1 ELISA Unità/mL). In linea con questi risultati, i criteri di non inferiorità delle percentuali di siero-conversione in risposta al vaccino anti-colera non sono stati soddisfatti (differenza assoluta -14,2%; IC95% da -24,6% a -3,9%). Il confronto tra i risultati ottenuti con il vaccino anti-epatite B, somministrato per via parenterale, e il vaccino anti-colera, somministrato per via orale, suggerisce che: 1) l'interferenza del vedolizumab nei confronti della risposta alla vaccinazione si espleta in maniera selettiva nei confronti del tratto gastrointestinale; 2) vedolizumab ha la potenzialità di interferire con i vaccini somministrati per via orale; 3) l'impiego di vaccini vivi durante la terapia con vedolizumab dovrebbe essere consentito solo nei casi in cui i benefici attesi siano superiori ai rischi; 4) tutti i pazienti candidati al trattamento con vedolizumab dovrebbero avere completato i propri programmi di vaccinazione prima di iniziare la terapia con questo farmaco (Smith e Mohammad, 2014; Wyant et al., 2015).

9.3. Profilo di efficacia

9.3.1. Studi di fase I

Uno studio clinico di fase I, controllato con placebo e in doppio cieco, è stato condotto da Feagan et al. (2000) su 29 pazienti con colite ulcerosa attiva moderata. I pazienti ammessi a partecipare avevano evidenza endoscopica di malattia con un interessamento di almeno 25 cm dall'orifizio anale, punteggio di Baron modificato pari a 2, e punteggio Mayo Clinic uguale o superiore a 5, con almeno 3 movimenti intestinali al giorno. Il valore mediano del punteggio Mayo Clinic per tutti i pazienti è risultato pari a 10. Alla maggior parte dei pazienti è stato consentito di proseguire l'assunzione orale di mesalazina (86%) a dosi stabili; analogamente,

al 34% dei pazienti è stato consentito di proseguire la terapia con prednisolone per tutta la durata dello studio. I partecipanti sono stati trattati con singole somministrazioni di vedolizumab a dosi crescenti: 0,15 mg/kg per via sottocutanea; 0,15 mg/kg per via endovenosa (e.v.); 0,5 mg/kg e.v.; 3 mg/kg e.v. In questo studio la dose di 0,5 mg/kg è stata identificata come quella minima sufficiente a saturare in maniera completa i siti recettoriali del vedolizumab (integrina $\alpha_4\beta_7$) e ad indurre una risposta endoscopica al giorno 30 (miglioramento di 2 punti secondo la scala modificata di Baron). In due pazienti trattati con vedolizumab 0,5 mg/kg è stata ottenuta una remissione completa sia endoscopica (punteggio zero secondo la scala di Baron modificata) che clinica (punteggio zero secondo la Scala Mayo Clinic) (Feagan et al., 2000).

9.3.2. Studi di fase II

Il primo studio di fase II su vedolizumab è stato svolto in pazienti con colite ulcerosa che in precedenza non erano stati sottoposti a terapia con farmaci biotecnologici. Questo studio, randomizzato, in doppio cieco e controllato con placebo, è stato condotto su 181 pazienti con colite ulcerosa lieve-moderata (Feagan et al., 2005). I pazienti sono stati assegnati in maniera randomizzata a tre gruppi di trattamento: vedolizumab 0,5 mg/kg; vedolizumab 2 mg/kg; placebo. I trattamenti sono stati somministrati per mezzo di infusioni endovenose ai giorni 1 e 29, e i pazienti sono poi stati seguiti fino a 6 settimane. Essi sono stati inoltre sottoposti ad esame sigmoidoscopico sia prima di iniziare il trattamento (basale) che alle settimane 4 e 6 dall'inizio del trattamento. Ai pazienti è stata consentita l'eventuale assunzione concomitante di mesalazina per via orale. In questo studio, il parametro primario di efficacia era la remissione clinica al termine della sesta settimana (punteggio valutato con la scala *Ulcerative Colitis Clinical Score* uguale a zero o 1, punteggio di Baron modificato uguale a zero o 1, e nessuna evidenza di sanguinamento rettale). Con riferimento a tale parametro, i tassi di

remissione clinica ottenuti dopo trattamento con vedolizumab 0,5 e 2 mg/kg sono risultati significativamente superiori a quelli ottenuti con placebo (rispettivamente: 33%, 32% e 14%; $P=0,03$). La maggior parte dei pazienti trattati con vedolizumab 0,5 o 2 mg/kg ha ottenuto miglioramenti clinici (riduzione del punteggio *Ulcerative Colitis Clinical Score* uguale o superiore a 3) superiori a quelli osservati nel gruppo placebo (rispettivamente 66% e 55% vs 33%; $P=0,002$). Inoltre, le percentuali di pazienti che avevano ottenuto la remissione endoscopica alla sesta settimana sono risultate 12%, 28% e 8%, rispettivamente per i gruppi trattati con vedolizumab 0,5 mg/kg, vedolizumab 2 mg/kg e placebo ($P=0,007$) (Feagan et al., 2005).

Un successivo studio di fase II, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, è stato condotto su 185 pazienti con malattia di Crohn attiva che in precedenza non erano mai stati trattati con terapie a base di farmaci biotecnologici (Feagan et al., 2008). In questo studio i pazienti sono stati assegnati a tre gruppi di trattamento: vedolizumab 0,5 mg/kg ($n=62$); vedolizumab 2 mg/kg ($n=65$); placebo ($n=58$). I trattamenti sono stati somministrati per mezzo di infusioni endovenose ai giorni 1 e 29. Al giorno 57 dall'inizio della terapia non sono state evidenziate differenze significative tra vedolizumab e placebo in relazione all'*endpoint* primario dello studio (riduzione del punteggio CDAI uguale o superiore a 70): vedolizumab 0,5 mg 49%; vedolizumab 2 mg/kg 53%; placebo 41%). Tuttavia, il 30% e il 37% dei pazienti trattati rispettivamente con vedolizumab 0,5 e 2 mg/kg hanno raggiunto la condizione di remissione clinica in confronto al 21% dei pazienti trattati con placebo; per questo parametro l'effetto di vedolizumab 2 mg/kg è risultato significativamente superiore rispetto al placebo ($P=0,049$). Inoltre, i pazienti trattati con vedolizumab 2 mg/kg hanno mostrato una risposta superiore al placebo in termini di attività clinica misurata come CDAI-100 (47% vs 31%; $P=0,05$) e di riduzione del punteggio CDAI alla settimana 57 rispetto alla valutazione basale (-135 vs -88; $P=0,010$). I tempi mediani di risposta clinica nei pazienti trattati con

vedolizumab 0,5 e 2 mg/kg o con placebo sono risultati, rispettivamente 32, 17 e 42 giorni ($P \leq 0,05$ per vedolizumab 2 mg/kg rispetto a placebo) (Feagan et al., 2008).

Malgrado l'efficacia dimostrata da vedolizumab nei due studi di fase II sopra menzionati, tali studi hanno evidenziato anche lo sviluppo di anticorpi anti-anticorpi umani (*human anti-human antibodies*, HAHA) in una percentuale rilevante dei pazienti che erano stati trattati con vedolizumab (fino al 38%). Inoltre, tra i pazienti che avevano sviluppato HAHA con un titolo anticorpale superiore a 1:125 è stata osservata una minore efficacia, in termini di risposta clinica, che è stata correlata con una più bassa saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ sui linfociti prelevati da sangue del circolo periferico (Feagan et al., 2005; 2008). Per ovviare a questo inconveniente è stata sviluppata una nuova formulazione di vedolizumab (utilizzando la linea cellulare *chinese hamster ovary* in luogo del sistema cellulare precedente, rappresentato da *NS0 mouse myeloma*) che è stata valutata in uno studio di fase II (Parikh et al., 2012). In questo studio, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, condotto su 46 pazienti con colite ulcerosa, vedolizumab è stato somministrato con una frequenza e a dosi superiori rispetto agli schemi impiegati negli studi di fase II precedenti. In particolare, i pazienti inclusi sono stati trattati con infusioni endovenose di vedolizumab (2, 6 o 10 mg/kg) o placebo in corrispondenza dei giorni 1, 15, 29 e 85, e sono stati successivamente seguiti fino al giorno 253 dall'inizio della terapia. Sebbene questo studio non sia stato specificamente disegnato per valutare l'efficacia clinica del vedolizumab, analizzando i pazienti trattati con questo farmaco come un unico gruppo, i risultati hanno permesso di osservare che, nell'intervallo compreso tra i giorni 85 e 253, le risposte cliniche favorevoli al vedolizumab sono state uguali o superiori al 50%, in confronto al 22-33% delle risposte ottenute nel gruppo placebo. Nell'intervallo compreso tra i giorni 85 e 113 le percentuali di risposta ottenute nei pazienti trattati con vedolizumab sono risultate pari a 70-73%. Al giorno 43 le variazioni medie dei punteggi relativi alla valutazione clinica con la scala *Partial Mayo Clinic Score* nei pazienti

trattati con vedolizumab sono risultate -1,9, in confronto a -0,4 ottenuto con il placebo (miglioramento relativo rispettivamente pari a 51% e 13%). Non sono stati evidenziati andamenti dose-dipendenti delle risposte terapeutiche al vedolizumab. Inoltre, restringendo l'analisi a 23 pazienti con attività di malattia più elevata alla visita di arruolamento nello studio, le risposte favorevoli al vedolizumab sono state 68-89% nel periodo compreso tra il giorno 29 e 253, in confronto a valori di 25-50% ottenuti per il gruppo placebo. A sostegno di questi risultati favorevoli sull'efficacia, i risultati hanno anche indicato che le concentrazioni di vedolizumab nel sangue aumentavano proporzionalmente in funzione delle dosi somministrate, e che il vedolizumab aveva saturato in maniera massimale i propri bersagli molecolari (integrina $\alpha_4\beta_7$) espressi sulla superficie dei linfociti circolanti nel sangue periferico a tutte le concentrazioni ematiche misurabili (Parikh et al., 2012).

Una ulteriore valutazione della stessa formulazione di vedolizumab esaminata nello studio sopra menzionato è stata condotta per mezzo di uno studio di fase II in aperto svolto su 38 pazienti con colite ulcerosa, che avevano già completato un trattamento con vedolizumab o placebo nell'ambito di studi clinici precedenti, e 34 pazienti che non erano mai stati trattati in precedenza con vedolizumab (15 con colite ulcerosa e 19 con malattia di Crohn) (Parikh et al., 2013). In questo studio, che di fatto rappresenta una prosecuzione in aperto dello studio di Parikh et al. (2012), vedolizumab è stato somministrato per mezzo di infusioni endovenose alle dosi di 2, 6 e 10 mg/kg ai giorni 1, 15 e 43; i pazienti sono stati poi sottoposti ad ulteriori somministrazioni di vedolizumab ad intervalli di 8 settimane. I trattamenti sono stati protratti fino a 630 giorni nei pazienti che erano già stati arruolati in altri studi clinici, e fino a 547 giorni nei pazienti in precedenza non trattati. Questo nuovo schema di trattamento, basato su dosi più elevate di vedolizumab, somministrate con frequenza più alta rispetto allo schema utilizzato negli studi di Feagan et al. (2005; 2008), ha permesso di ottenere tassi di remissione e di risposta clinica della malattia pari a 39% e 58,3%, rispettivamente, considerando

globalmente l'intero gruppo dei pazienti arruolati. Al giorno 491 i tassi di risposta e remissione clinica sono risultati, rispettivamente, 49% e 88% nei pazienti con colite ulcerosa, e 70% e 40% nei pazienti con malattia di Crohn. Tra i pazienti con colite ulcerosa, i valori medi del punteggio stimato con il *Mayo Clinic Score* al giorno 155 si sono ridotti da 5,4 al basale a 1,7 nei soggetti mai trattati in precedenza con vedolizumab, e da 2,3 al basale a 1,4 nei soggetti precedentemente arruolati in altri studi clinici su vedolizumab; in entrambi i sottogruppi di pazienti i punteggi medi ottenuti con il *Mayo Clinic Score* si sono mantenuti al disotto del basale fino al giorno 491. Tra i pazienti con malattia di Crohn risposte cliniche CDAI-100 sono state ottenute nel 60% dei casi. Inoltre il punteggio medio CDAI dal valore basale di 295 si è ridotto a 238 al giorno 43, ha continuato a ridursi fino al giorno 155, ed è rimasto al di sotto del valore basale fino al giorno 491. Miglioramenti della qualità di vita, determinati per mezzo del questionario IBDQ, sono stati evidenziati in tutti i gruppi di trattamento con vedolizumab. In particolare, i punteggi IBDQ sono risultati normali (>170) nel 55% dei pazienti con colite ulcerosa provenienti da studi clinici precedenti, nel 20% dei pazienti con colite ulcerosa mai trattati in precedenza con vedolizumab, e nel 5% dei pazienti con malattia di Crohn. In questi tre sottogruppi di pazienti, i punteggi IBDQ valutati al giorno 491 sono risultati normali, rispettivamente, nel 78%, 100% e 60% dei casi. Inoltre solo il 4% dei pazienti trattati con vedolizumab ha sviluppato HAHA. Sulla base di tali risultati, gli autori dello studio hanno attribuito la riduzione dell'attività immunogena di questa nuova formulazione di vedolizumab alla concomitanza di tre fattori: miglioramento del processo di produzione del farmaco; impiego di dosi più elevate; riduzione della frequenza di somministrazione (Parikh et al., 2013).

9.3.3. Studi di fase III

I profili di efficacia favorevoli di vedolizumab evidenziati negli studi clinici di fase II hanno incoraggiato lo svolgimento di studi clinici di fase III. Attualmente, vedolizumab è stato valutato in quattro studi di fase III, denominati GEMINI I, GEMINI II, GEMINI III e GEMINI LTS. Gli studi GEMINI I e GEMINI II sono stati disegnati in modo da comprendere una fase per valutare la capacità di vedolizumab di indurre la remissione della malattia attiva e una fase per valutare la capacità di vedolizumab di mantenere lo stato di remissione della malattia. Entrambi gli studi sono stati condotti su pazienti che in precedenza avevano mostrato una risposta terapeutica insufficiente, o avevano perso la risposta terapeutica o avevano sviluppato intolleranza ad almeno un trattamento standard, ivi compresi i farmaci biotecnologici anti-TNF. I pazienti con fallimento terapeutico ai farmaci anti-TNF sono stati comunque inclusi in misura non superiore al 50% delle popolazioni dei pazienti arruolati nello studio GEMINI I e GEMINI II. Inoltre non sono stati ammessi pazienti trattati in precedenza con natalizumab, efalizumab, rituximab o vedolizumab (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013). I risultati ottenuti negli studi GEMINI I, GEMINI II e GEMINI III sono riassunti nella tabella 4 (trattamenti di induzione della remissione) e nella tabella 5 (trattamenti di mantenimento della remissione).

Colite ulcerosa (GEMINI I)				
		Vedolizumab	Placebo	P
Risultato primario	Risposta clinica	47,1	25,5	<0,001
Risultati secondari	Remissione clinica	16,9	5,4	0,001
	Guarigione della mucosa	40,9	24,8	0,001
Malattia di Crohn (GEMINI II)				
		Vedolizumab	Placebo	P
Risultati primari	Remissione clinica	14,5	6,8	0,02
	Risposta CDAI-100	31,4	25,7	NS
Risultato secondario	Proteina C-reattiva alla settimana 6 (mg/ml)	19,9	21,1	NS
Malattia di Crohn (GEMINI III)				
		Vedolizumab	Placebo	P
Risultati primari	Remissione clinica	15,2	12,1	NS
Risultati secondari	Risposta CDAI-100 alla settimana 6	39,2	22,3	0,001
	Remissione clinica alla settimana 10	26,6	12,1	0,001

Tabella 4. Risultati relativi alla fase di induzione negli studi GEMINI I, GEMINI II, GEMINI III.
NS: non significativo.

Colite ulcerosa (GEMINI I)						
		Vedolizumab ogni 8 settimane	Vedolizumab ogni 4 settimane	Placebo	P (vedolizumab ogni 8 settimane vs placebo)	P (vedolizumab ogni 4 settimane vs placebo)
Risultato primario	Remissione clinica	41,8	44,8	15,9	<0,001	<0,001
Risultati secondari	Risposta persistente	56,6	52	23,8	<0,001	<0,001
	Remissione persistente	20,5	24	8,7	0,008	0,001
	Guarigione della mucosa	51,6	56	19,8	<0,001	<0,001
	Remissione libera da terapia con steroidi	31,4	45,2	13,9	0,01	<0,001
Malattia di Crohn (GEMINI II)						
		Vedolizumab ogni 8 settimane	Vedolizumab ogni 4 settimane	Placebo	P (vedolizumab ogni 8 settimane vs placebo)	P (vedolizumab ogni 4 settimane vs placebo)
Risultato primario	Remissione clinica	39	36,4	21,6	<0,001	0,004
Risultati secondari	Risposta CDAI-100	43,5	45,5	30,1	0,01	0,005
	Remissione libera da terapia con steroidi	31,7	28,8	15,9	0,02	0,04
	Remissione persistente	21,4	16,2	14,4	NS	NS

Tabella 5. Risultati ottenuti nella fase di mantenimento degli studi GEMINI I e GEMINI II.
NS: non significativo.

9.3.3.1. *Studio GEMINI I*

GEMINI I è uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, svolto con l'intento di valutare l'efficacia di vedolizumab nell'indurre la remissione della malattia e il mantenimento di tale remissione in pazienti con colite ulcerosa moderata o grave (Feagan et al., 2013).

Nella fase dello studio finalizzata a determinare la capacità del vedolizumab di indurre la remissione della malattia, 374 pazienti (coorte 1) sono stati sottoposti a trattamento per via

endovenosa con vedolizumab alla dose di 300 mg (n=225) o con placebo (n=149), alle settimane 0 e 2, mentre 521 pazienti (coorte 2) sono stati trattati in aperto con vedolizumab sempre alle settimane 0 e 2. In entrambe le coorti gli effetti dei trattamenti sono stati valutati a distanza di 6 settimane dall'inizio della terapia. Ai pazienti arruolati in questa fase di induzione è stata consentita la prosecuzione di terapie orali a base di mesalazina, prednisone (a dosi uguali o inferiori a 30 mg/die, o corticosteroide equivalente; tuttavia nei pazienti con risposta terapeutica favorevole alla sesta settimana, la dose di corticosteroide è stata progressivamente ridotta in maniera scalare secondo uno schema pre-specificato) o immunosoppressori a dosaggio stabile (tuttavia, nei pazienti arruolati negli USA l'eventuale assunzione di immunosoppressori è stata interrotta durante la fase di *screening* nella coorte 2 o dopo la fase di induzione alla sesta settimana nella coorte 1) (Feagan et al., 2013).

La misura di esito primario, valutata alla sesta settimana dall'inizio del trattamento di induzione, è stata la risposta clinica, definita come una riduzione di almeno 3 punti della scala *Mayo Clinic Score* (intervallo da 0 a 12, con i valori più elevati indicativi di una maggiore gravità della malattia) e una riduzione di almeno il 30% rispetto alla valutazione basale, con una riduzione concomitante di almeno 1 punto (o con un punteggio compreso tra zero e 1) nella valutazione del sanguinamento rettale. Le misure di esito secondario comprendevano due parametri: 1) remissione clinica alla sesta settimana (*Mayo Clinic Score* inferiore o uguale a 2 punti e nessun punteggio per singolo parametro superiore a 1); 2) guarigione della mucosa colo-rettale (punteggio endoscopico uguale a 1 o zero) (Feagan et al., 2013).

Al termine della fase di induzione (sesta settimana), i risultati hanno evidenziato percentuali di risposta clinica pari a 47,1% e 25,5% nei pazienti trattati, rispettivamente, con vedolizumab o placebo (coorte 1; differenza rispetto a placebo: 21,7%; IC95% 11,6-31,7%, $P<0,001$). Nella coorte 1 vedolizumab è risultato significativamente superiore rispetto al placebo anche in termini di remissione clinica (16,9% versus 5,4%; $P=0,001$) e di guarigione

della mucosa colo-rettale (40,9% versus 24,8%; $P=0,001$). Nella coorte 2, la risposta clinica, la remissione e la guarigione della mucosa intestinale al trattamento in aperto con vedolizumab sono risultate, rispettivamente, 44,3%, 19,2% e 36,7% (Feagan et al., 2013).

E' interessante notare che nello studio GEMINI I le percentuali di risposta clinica, remissione clinica e guarigione della mucosa con vedolizumab non sono state influenzate dal tipo di terapia che i pazienti avevano ricevuto prima dell'arruolamento. Infatti, i valori ottenuti nella fase di induzione sono risultati simili nei sottogruppi di pazienti che prima dell'arruolamento non avevano risposto favorevolmente a trattamenti con farmaci anti-TNF, corticosteroidi o immunosoppressori tradizionali. In particolare, nella sotto-popolazione dei pazienti con precedente fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF, una risposta clinica alla sesta settimana è stata ottenuta in misura del 20,6% nel gruppo placebo e del 39% nel gruppo vedolizumab (differenza rispetto a placebo: 18,4%; IC95%: 3,9-32,9; $P=0,01$). Risultati sostanzialmente simili sono stati ottenuti nei pazienti che in precedenza non avevano sviluppato fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF (placebo, 29,1%; vedolizumab, 51,7%; differenza rispetto a placebo: 22,7%, IC95%: 10,1-35,3) (Feagan et al., 2013).

Nella fase dello studio GEMINI I volta a determinare la capacità del vedolizumab di mantenere lo stato di remissione della colite ulcerosa, i pazienti, che nella fase di induzione avevano risposto favorevolmente al trattamento con vedolizumab, sono stati assegnati in maniera randomizzata a proseguire la terapia con vedolizumab, somministrato alla dose di 300 mg ogni 8 settimane ($n=122$) o ogni 4 settimane ($n=125$), o con placebo ($n=126$) fino a 52 settimane. I pazienti che nella fase di induzione erano stati assegnati al gruppo placebo hanno proseguito il trattamento con placebo anche nella fase di mantenimento. I pazienti che durante la fase di induzione non avevano risposto alla terapia con vedolizumab, nella fase di

mantenimento sono stati assegnati al gruppo trattato con vedolizumab 300 mg ogni 4 settimane fino alla settimana 52 (Feagan et al., 2013).

La misura di esito primario, valutata al termine della terapia di mantenimento (52 settimane), è stata la remissione clinica definita come una riduzione della scala *Mayo Clinic Score* superiore o uguale a 2 punti e nessun punteggio superiore a 1 nella valutazione dei singoli parametri clinici. Le misure di esito secondario comprendevano quattro parametri: 1) risposta clinica persistente (evidenza di risposta clinica sia alla settimana 6 che 52); 2) remissione clinica persistente (evidenza di remissione clinica sia alla settimana 6 che 52); 3) guarigione della mucosa colo-rettale alla settimana 52; 4) remissione libera da terapia con corticosteroidi alla settimana 52 (pazienti già in terapia con corticosteroidi alla valutazione basale) (Feagan et al., 2013).

Al termine della settimana 52, la remissione clinica è stata mantenuta nel 41,8% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane, e nel 44,8% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 4 settimane, in confronto al 15,9% dei pazienti nel gruppo placebo (differenza rispetto a placebo: 26,1% per il trattamento con vedolizumab ogni 8 settimane, IC95% 14,9-37,2%; 29,1% per il trattamento con vedolizumab ogni 4 settimane, IC95% 17,9-40,4%; $P < 0,001$ per entrambi i confronti). La superiorità di vedolizumab rispetto al placebo è stata evidenziata anche per quanto riguarda le misure di esito secondario. In particolare, la guarigione della mucosa colo-rettale è stata ottenuta nel 19,8% dei pazienti nel gruppo placebo, nel 51,6% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane ($P < 0,001$), e nel 56% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 4 settimane ($P < 0,001$); la remissione clinica libera da terapia con corticosteroidi è stata ottenuta nel 13,9% dei pazienti nel gruppo placebo, nel 31,4% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane ($P = 0,01$) e nel 45,2% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 4 settimane ($P < 0,001$) (Feagan et al., 2013).

I valori di remissione clinica ottenuti al termine della fase di mantenimento sono risultati simili nei sottogruppi di pazienti che prima dell'arruolamento non avevano risposto favorevolmente a trattamenti con farmaci anti-TNF, corticosteroidi o immunosoppressori tradizionali. In particolare, nella sotto-popolazione dei pazienti con precedente fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF, alla settimana 52 una remissione clinica significativa è stata ottenuta in misura del 5,3% nel gruppo placebo in confronto a 37,2% nel gruppo di pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane (differenza rispetto a placebo: 31,9%; IC95%: 15,8-48,0; $P < 0,001$) oppure a 35% nel gruppo trattato con vedolizumab ogni 4 settimane (differenza rispetto a placebo: 29,7%, IC95%: 13,3-46,1; $P < 0,001$). Nella sotto-popolazione dei pazienti senza precedente fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF, una remissione clinica significativa è stata ottenuta in misura del 20,5% nel gruppo placebo in confronto a 44,3% nel gruppo di pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane (differenza rispetto a placebo: 23,8%; IC95%: 10,0-37,7%) oppure a 49,4% nel gruppo trattato con vedolizumab ogni 4 settimane (differenza rispetto a placebo: 29,0%, IC95%: 15,4-42,5) (Feagan et al., 2012).

Nello studio GEMINI I, l'analisi del sottogruppo di pazienti che nella fase di induzione (coorte 1) non aveva mostrato risposta clinica al vedolizumab alla sesta settimana, ed era poi stato assegnato a proseguire il trattamento con vedolizumab ogni 4 settimane nella fase di mantenimento, ha evidenziato percentuali più elevate di risposta clinica rispetto al placebo (settimana 10: 31,7% vs 14,6%; settimana 14: 39,1% vs 20,7%) e di remissione clinica (settimana 10: 11,8% vs 4,9%; settimana 14: 14,6% versus 9,8%). In corrispondenza della settimana 52 i pazienti trattati con vedolizumab hanno raggiunto, rispetto al placebo, risultati più favorevoli in termini di: tassi di risposta clinica (28,9% vs 8,5%); remissione clinica (16,1% vs 4,9%); guarigione della mucosa (23,6% vs 8,5%) (Feagan et al., 2014a).

Una sotto-analisi dei risultati dello studio GEMINI I ha evidenziato che, nella fase di mantenimento, i pazienti sottoposti a trattamento con vedolizumab rispetto al gruppo placebo raggiungevano tassi di remissione più elevati in assenza di terapia concomitante con corticosteroidi e mostravano una riduzione dell'assunzione di corticosteroidi. In particolare, alla settimana 52 i tassi di remissione ottenuti con vedolizumab, somministrato ogni 8 o 4 settimane in assenza di terapia con corticosteroidi, sono risultati rispettivamente 31,4% e 45,2% in confronto a 13,9% per il placebo (rispettivamente, $P < 0,001$ e $P = 0,012$). Inoltre entrambi gli schemi di trattamento con vedolizumab hanno permesso di ottenere percentuali più elevate di pazienti con remissione clinica alla settimana 52 e liberi da terapia con corticosteroidi per almeno 180 giorni (rispettivamente, 28,6% e 42,5% in confronto a 11,1% con placebo; $P = 0,0082$ e $P < 0,0001$) (Sands et al., 2013a).

Nello studio GEMINI I il trattamento con vedolizumab ha migliorato la qualità di vita dei pazienti sia nella fase di induzione che nella fase di mantenimento. Nella coorte 1 in doppio cieco della fase di induzione i punteggi dell'*Inflammatory Bowel Disease Questionnaire* (IBDQ) alla sesta settimana sono risultati significativamente più elevati nei pazienti assegnati al trattamento con vedolizumab ($P < 0,001$) (Feagan et al., 2013). I punteggi IBDQ sono risultati significativamente più alti alla settimana 52 anche per i pazienti che nella fase di mantenimento sono stati trattati con vedolizumab ogni 8 o 4 settimane. In linea con questi risultati, la valutazione della qualità di vita per mezzo del questionario *short-form 36* (SF-36) *physical component summary* (PCS) e *mental component summary* (MCS), così come della *scala analogico-visuale* (VAS) EQ-5D ha evidenziato miglioramenti più consistenti nei pazienti trattati con vedolizumab rispetto a placebo, sia alla settimana 6 che alla settimana 52 (Feagan et al., 2014b).

Altre valutazioni relative alla qualità di vita hanno fornito informazioni interessanti: 1) i pazienti con punteggi basali di attività di malattia (*Mayo Clinic Score*) inferiori a 9 e che in

precedenza non erano mai stati trattati con farmaci anti-TNF alle settimane 6 e 52 hanno mostrato miglioramenti significativi dei punteggi IBDQ totale, SF-36 PCS ed MCS con vedolizumab in confronto al placebo; 2) i pazienti con punteggi basali di attività di malattia uguali o superiori a 9 hanno ottenuto miglioramenti significativi dei punteggi IBDQ totale ed SF-36 MCS alla sesta settimana dopo trattamento con vedolizumab; 3) nel sottogruppo dei pazienti che in precedenza non avevano risposto favorevolmente al trattamento con farmaci anti-TNF alla sesta settimana è stato ottenuto un miglioramento dei punteggi IBDQ totale ed SF-36 PCS in seguito a trattamento con vedolizumab rispetto al placebo (Feagan et al., 2013; 2014b).

I pazienti che hanno completato lo studio GEMINI I sono stati inclusi nello studio GEMINI LTS (tuttora in fase di svolgimento per la valutazione della sicurezza di vedolizumab a lungo termine) per essere trattati in aperto con vedolizumab ogni 4 settimane (300 mg e.v.) fino a un periodo di 7 anni. L'efficacia del trattamento è stata valutata in termini di remissione clinica e di risposta clinica. Un'analisi preliminare dei risultati dello studio GEMINI LTS condotta a distanza di due anni dall'inizio del trattamento (n=275) ha evidenziato che nei pazienti con colite ulcerosa provenienti dallo studio GEMINI I l'efficacia di vedolizumab si mantiene nel tempo, con una bassa percentuale di soggetti che manifestano una perdita della risposta terapeutica nelle fasi più avanzate della terapia (remissione clinica: settimana 52, 65,8%; settimana 80, 77,1%; settimana 104, 72,7%) (Feagan et al., 2014c).

9.3.3.2. Studio GEMINI II

GEMINI II è uno studio clinico di fase III, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, condotto con l'obiettivo di valutare l'efficacia di vedolizumab, somministrato alla dose di 300 mg, come terapia di induzione e di mantenimento nei pazienti con malattia di Crohn moderata-grave (Sandborn et al., 2013).

Nella fase di induzione, 368 pazienti sono stati assegnati in maniera randomizzata al trattamento per via endovenosa con vedolizumab 300 mg (n=220) o placebo (n=148) alle settimane zero o 2 (coorte 1), e 747 pazienti sono stati trattati in aperto con vedolizumab 300 mg alle settimane zero e 2 (coorte 2). Ai pazienti arruolati in questa fase è stata consentita la prosecuzione di terapie orali a base di mesalazina, prednisone (a dosi uguali o inferiori a 30 mg/die), budesonide (a dosi uguali o inferiori a 9 mg/die), farmaci antibatterici o immunosoppressori (tuttavia, ai pazienti arruolati negli USA l'eventuale assunzione di immunosoppressori è stata interrotta durante la fase di *screening* nella coorte 2 o dopo la fase di induzione alla sesta settimana nella coorte 1). In entrambe le coorti gli effetti dei trattamenti sono stati valutati a distanza di 6 settimane dall'inizio della terapia (Sandborn et al., 2013).

Nella fase di induzione sono state valutate due misure di esito primario per determinare la risposta ai trattamenti: 1) remissione clinica, definita come un punteggio uguale o minore di 150 punti della scala di valutazione CDAI (*Crohn disease activity index*); 2) risposta CDAI-100 definita come una riduzione del punteggio CDAI uguale o superiore a 100 rispetto alla valutazione basale. È stata inoltre determinata una misura di esito secondario, rappresentata dalla variazione della proteina C reattiva (PCR) rispetto al valore basale (Sandborn et al., 2013).

Al termine della fase di induzione (sesta settimana), nella coorte 1 la condizione di remissione clinica è stata ottenuta in una percentuale di pazienti trattati con vedolizumab (14,5%) significativamente superiore rispetto al gruppo placebo (6,8%; $P=0,02$). La risposta CDAI-100 è stata ottenuta nel 31,4% dei pazienti trattati con vedolizumab e nel 25,7% dei pazienti trattati con placebo; tuttavia questa differenza non è risultata statisticamente significativa ($P=0,23$). Anche la variazione della PCR rispetto al basale non è risultata statisticamente significativa ($P=0,93$). Nella coorte 2 i tassi di remissione clinica e di CDAI-

100 nei pazienti trattati in aperto con vedolizumab sono risultati, rispettivamente, 17,7% e 34,4%. Per quanto riguarda la sotto-popolazione che in precedenza aveva mostrato un fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF, le misure di esito primario non hanno evidenziato differenze significative tra placebo e vedolizumab. Infatti, in questo sottogruppo la remissione clinica alla sesta settimana è stata ottenuta nel 4,3% dei pazienti nel gruppo placebo e nel 10,5% dei pazienti trattati con vedolizumab (differenza rispetto al placebo: 6,2%; IC95%: da -1,4 a 13,7; P=0,11), e la risposta CDAI-100 è stata raggiunta nel 22,9% del gruppo placebo e nel 23,8% dei pazienti trattati con vedolizumab (differenza rispetto al placebo: 1%; IC95%: da -11,8 a 13,7; P=0,88). Risultati simili sono stati ottenuti nella sotto-popolazione dei pazienti che in precedenza non erano mai stati sottoposti a terapia con farmaci anti-TNF. Infatti, in questo sottogruppo la remissione clinica è risultata pari a 9% nel gruppo placebo e 18,3% nel gruppo trattato con vedolizumab (differenza rispetto al placebo: 9,3%; IC95%: da -0,2 a 18,8%), e la risposta CDAI-100 è stata ottenuta nel 28,2% dei pazienti nel gruppo placebo e nel 38,3% dei pazienti trattati con vedolizumab (differenza rispetto al placebo: 10,1%; IC95%: da -3,3 a 23,4) (Sandborn et al., 2013).

Nella fase di mantenimento dello studio GEMINI II, 461 pazienti, che nella fase di induzione avevano ottenuto una risposta clinica con vedolizumab (riduzione del punteggio CDAI uguale o superiore a 70 rispetto alla valutazione basale), sono stati assegnati in maniera randomizzata a proseguire la terapia con lo stesso farmaco, somministrato alla dose di 300 mg 8 settimane (n=154) o ogni 4 settimane (n=154), o con placebo (n=153) fino a 52 settimane. I pazienti che durante la fase di induzione non avevano risposto alla terapia con vedolizumab, nella fase di mantenimento sono stati assegnati al gruppo trattato con vedolizumab 300 mg ogni 4 settimane fino alla settimana 52. I pazienti che nella fase di induzione erano stati assegnati al gruppo placebo hanno proseguito il trattamento con placebo anche nella fase di mantenimento (Sandborn et al., 2013).

Nella fase di mantenimento la misura di esito primario per valutare la risposta ai trattamenti è stata la remissione clinica (riduzione del punteggio CDAI uguale o inferiore a 150 alla settimana 52). In questa fase sono state inoltre determinate tre misure di esito secondario: 1) risposta CDAI-100; 2) remissione libera da terapia con corticosteroidi; 3) remissione clinica persistente alla settimana 52 (evidenza di remissione clinica in almeno l'80% delle visite previste dal disegno sperimentale, ivi compresa la visita finale) (Sandborn et al., 2013).

Al termine della fase di mantenimento (settimana 52), la remissione clinica è stata mantenuta nel 39% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane e nel 36,4% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 4 settimane, in confronto al 21,6% dei pazienti del gruppo placebo ($P=0,004$ e $P<0,001$, rispettivamente). Inoltre una maggiore percentuale di pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 o 4 settimane rispetto al gruppo placebo ha ottenuto risposte CDAI-100 (rispettivamente, 43,5% e 45,5% vs 30,1%; $P=0,01$ e $P=0,005$) e una remissione libera da terapia con corticosteroidi (rispettivamente, 31,7% e 28,8% vs 15,9%; $P=0,02$ e $P=0,04$) alla settimana 52. Tuttavia, il trattamento con vedolizumab non è risultato significativamente superiore rispetto al placebo in termini di remissione clinica persistente alla settimana 52. I risultati ottenuti nella sotto-popolazione di pazienti che in precedenza avevano mostrato un fallimento terapeutico al trattamento con farmaci anti-TNF hanno evidenziato una superiorità del vedolizumab rispetto al placebo. Infatti in questo sottogruppo la remissione clinica è stata raggiunta nel 12,8% dei pazienti nel gruppo placebo in confronto al 28% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 8 settimane (differenza rispetto al placebo: 15,2%; IC95%: 3,0-27,5; $P=0,01$) e al 27,3% dei pazienti trattati con vedolizumab ogni 4 settimane (differenza rispetto al placebo: 14,5%; IC95%: 2,0-26,9; $P=0,02$). Nella sotto-popolazione dei pazienti che in precedenza non erano mai stati sottoposti a terapia con farmaci anti-TNF una remissione clinica è stata raggiunta nel 30,7% dei pazienti del gruppo

placebo. I risultati ottenuti con vedolizumab in questo sottogruppo hanno evidenziato una superiorità statistica nei pazienti trattati con il farmaco ogni 8 settimane (51,4%; differenza rispetto al placebo: 20,7%; IC95%: 5,2-36,3), ma non nel gruppo trattato con vedolizumab ogni 4 settimane (45,5%; differenza rispetto al placebo: 14,8%; IC95%: da -0,5 a 30) (Sandborn et al., 2013).

L'analisi del sottogruppo di pazienti che nella fase di induzione (coorte 1) non aveva mostrato risposta clinica al vedolizumab alla sesta settimana, ed era poi stato assegnato a proseguire il trattamento con vedolizumab ogni 4 settimane nella fase di mantenimento, rispetto al placebo ha evidenziato tassi più elevati di remissione clinica e di risposte CDAI-100 (settimana 10: rispettivamente 6,8% vs 4,3% e 16% vs 7,2%; settimana 14: rispettivamente 10,5% vs 10,1% e 21,7% vs 11,6%; settimana 52: rispettivamente, 18,8% vs 7,2% e 25,4% vs 7,2%) (Sandborn et al., 2014).

I pazienti che hanno completato lo studio GEMINI II (settimana 52) sono stati inclusi nello studio GEMINI LTS (tuttora in fase di svolgimento per la valutazione della sicurezza di vedolizumab a lungo termine) per essere trattati in aperto con vedolizumab ogni 4 settimane (300 mg e.v.) fino a un periodo di 7 anni. L'efficacia del trattamento è stata valutata in termini di remissione clinica e di risposta clinica. Un'analisi preliminare dello studio GEMINI LTS, condotta a distanza di due anni dall'inizio del trattamento (n=295), ha evidenziato che nei pazienti con malattia di Crohn provenienti dallo studio GEMINI II l'efficacia di vedolizumab si mantiene pressochè invariata fino alla settimana 104 (remissione clinica: settimana 52, 57%; settimana 80, 64%; settimana 104, 61%). Questo dato, anche se preliminare, appare di un certo interesse dal momento che suggerisce per il vedolizumab la possibilità di mantenere un'efficacia persistente nel tempo, e questo rappresenta un obiettivo importante se si considera l'andamento cronico-ricidivante della malattia (Hanauer et al., 2014).

9.3.3.3. Studio GEMINI III

GEMINI III è uno studio clinico di fase III, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, svolto con l'obiettivo di valutare la sicurezza e l'efficacia di vedolizumab nel determinare l'induzione della risposta clinica e della remissione in pazienti con malattia di Crohn moderata-grave che in precedenza non avevano risposto favorevolmente ad altre terapie farmacologiche standard. In questo studio, 416 pazienti eligibili sono stati assegnati con un rapporto 1:1 al trattamento con vedolizumab 300 mg o placebo alle settimane zero, 2 e 6. Da notare che, al termine dell'arruolamento, tra i pazienti inclusi nello studio i valori basali del punteggio CDAI sono risultati significativamente più elevati nel gruppo in terapia con vedolizumab rispetto al placebo (319,9 vs. 301,3, $P=0,015$) (Sands et al., 2014).

La remissione clinica alla sesta settimana nei pazienti che in precedenza non avevano risposto favorevolmente al trattamento con farmaci anti-TNF ($n=315$) è stata assunta come indicatore primario di efficacia, e il trattamento con vedolizumab non ha permesso di soddisfare questa condizione (vedolizumab 15,2%, placebo 12,1%; $P=0,433$). Tuttavia, in questo sottogruppo, alla decima settimana il tasso di remissione clinica è risultato significativamente più elevato con vedolizumab rispetto al placebo (26,6% versus 12,1%; $P=0,001$). Inoltre, alla sesta settimana i tassi di risposta CDAI-100 sono risultati significativamente più elevati con vedolizumab rispetto al placebo (39,2% versus 22,3%; $P=0,001$) (Sands et al., 2014).

L'analisi dei dati ottenuti dall'intera popolazione di pazienti arruolati nello studio GEMINI III ha evidenziato che vedolizumab è risultato significativamente più efficace rispetto al placebo in relazione a: indicatore secondario di remissione clinica alla sesta (rispettivamente 19,1% vs 12,1%; $P=0,047$) e alla decima settimana (rispettivamente 28,7% vs 13%; $P<0,0001$); remissione sostenuta (rispettivamente 15,3% vs 8,2%; $P=0,0249$);

risposta CDAI-100 alla sesta settimana (rispettivamente 39,2% vs 22,7%; P=0,0002) (Sands et al., 2014).

Una ulteriore analisi dei dati ottenuti negli studi clinici di fase III ha peraltro evidenziato che, rispetto al placebo, il vedolizumab consente di ottenere percentuali più elevate di remissione clinica senza necessità di assumere corticosteroidi sia tra i pazienti con colite ulcerosa che in quelli con malattia di Crohn (Sands et al., 2013b).

9.4. Profilo di tollerabilità

Negli studi di fase III GEMINI I e GEMINI II, complessivamente 1434 pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn sono stati trattati con vedolizumab 300 mg fino a 52 settimane (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013). Gli eventi avversi sono insorti nel 52% dei pazienti trattati con vedolizumab, in confronto a 45% dei pazienti trattati con placebo, e sono risultati gravi, rispettivamente, nel 7% e 4% di questi gruppi. Gli eventi avversi riscontrati più di frequente nei pazienti trattati con vedolizumab in questi due studi clinici (incidenza $\geq 3\%$ e $\geq 1\%$ rispetto al placebo) comprendevano: nasofaringite (13% con vedolizumab vs 7% con placebo); cefalea (12% vs 11%); artralgia (12% vs 10%); nausea (9% vs 8%); febbre (9% vs 7%); infezioni delle vie respiratorie superiori (7% vs 6%); affaticamento (6% vs 3%); tosse (5% vs 3%); bronchite (4% vs 3%); sindrome influenzale (4% vs 2%); dolore lombo-sacrale (4% vs 3%); eruzione cutanea (3% vs 2%); prurito (3% vs 1%); sinusite (3% vs 1%); dolore oro-faringeo (3% vs 1%); dolore alle estremità (3% vs 1%) (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013).

Negli studi di fase III, 1 paziente (0,07%) trattato con vedolizumab ha sviluppato una reazione anafilattica, mentre le reazioni da infusione si sono manifestate nel 4% dei pazienti trattati con vedolizumab e nel 3% dei pazienti esposti al placebo (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013). Gli eventi avversi infettivi (principalmente nasofaringiti, infezioni

delle vie respiratorie superiori, sinusiti e infezioni del tratto urinario) sono stati osservati con una frequenza di 0,85 paziente-anno dopo trattamento con vedolizumab in confronto a 0,7 pazienti-anno con placebo. Gli episodi infettivi gravi sono occorsi con maggiore frequenza nei pazienti con malattia di Crohn rispetto a quelli affetti da colite ulcerosa, e sono stati caratterizzati più comunemente dall'insorgenza di ascessi anali. Gli eventi avversi infettivi gravi, osservati nelle fasi di studio a lungo termine e di estensione in aperto, comprendevano ascessi anali, sepsi, tubercolosi, sepsi da *Salmonella*, giardiasi, meningite da *Listeria* e colite da citomegalovirus (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013). Nonostante il vedolizumab sia stato sviluppato come farmaco in grado di interferire selettivamente con le funzioni immunitarie intestinali, l'incidenza di infezioni da parte di batteri patogeni enterici negli studi clinici del programma GEMINI è risultata particolarmente bassa, con soli sei casi di infezione da *Clostridium difficile*, tre casi di infezione da *Campylobacter pylori* e un caso di infezione da *Salmonella* nei pazienti trattati con vedolizumab e l'assenza di eventi infetti enterici tra i pazienti trattati con il placebo (Raine, 2014).

Quattro pazienti arruolati negli studi clinici del programma GEMINI e trattati con vedolizumab hanno sviluppato epatite acuta. In questi pazienti la terapia con vedolizumab è stata interrotta e l'evento è stato trattato e risolto con la somministrazione di corticosteroidi per via endovenosa. Tuttavia non è stato possibile chiarire se questi eventi avversi epatici fossero causalmente correlati al trattamento con vedolizumab. Nel 2% dei pazienti trattati con vedolizumab sono stati comunque evidenziati aumenti delle transaminasi (maggiore o uguale a tre volte il limite superiore dell'intervallo di normalità). Sarà quindi opportuno rivalutare l'eventuale influenza del vedolizumab sul fegato nell'ambito dell'osservazione in fase *post-marketing* (Poole, 2014; Raine, 2014).

I dati sugli eventi avversi, raccolti negli studi clinici pre-registrativi fino a luglio 2012, sono stati analizzati in maniera cumulativa e descrittiva da Colombel et al. (2013). In questa

analisi i pazienti, affetti da colite ulcerosa o malattia di Crohn, erano stati esposti al vedolizumab per periodi uguali o superiori a 6 mesi (n=1534), 12 mesi (n=1149) o 24 mesi (n=502). Gli eventi avversi correlati al farmaco sono risultati simili nei pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn: cefalea 6%; nasofaringite 4%; nausea 4%; artralgia 4%; infezioni del tratto respiratorio prossimale, 3%; affaticamento, 3%. Le infezioni gravi e gli eventi avversi gravi correlati al farmaco si sono manifestati, rispettivamente, nel 4% e 2% dei pazienti con colite ulcerosa e nel 7% e 5% dei pazienti con malattia di Crohn. Lesioni neoplastiche maligne sono state riscontrate in meno dell'1% dei pazienti esaminati (2 casi di carcinoma del colon e 2 casi di melanoma maligno). Sono stati inoltre registrati sei casi di mortalità: 3 nel gruppo dei pazienti con colite ulcerosa (insufficienza respiratoria, ictus ed embolia polmonare) e 3 nel gruppo dei pazienti con malattia di Crohn (setticemia, emorragia intracranica di natura traumatica e suicidio). Considerati globalmente, questi dati suggeriscono un profilo favorevole per la sicurezza a lungo termine di vedolizumab nel trattamento della colite ulcerosa e della malattia di Crohn (Colombel et al., 2013a).

Una determinazione più accurata ed estesa del profilo di sicurezza a lungo termine del vedolizumab sarà resa possibile dal completamento dello studio di estensione di fase III in aperto GEMINI LTS. Questo studio, tuttora in fase di svolgimento, sta valutando pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn moderata/grave che in precedenza non sono mai stati trattati con vedolizumab o avevano partecipato in uno studio di fase II o III su vedolizumab, ed ha come obiettivo principale quello di raccogliere dati sulla sicurezza di vedolizumab, somministrato alla dose di 300 mg e.v. ogni 4 settimane, dopo un periodo di osservazione di 7 anni (Lobaton et al., 2014). Un'analisi preliminare dei risultati dello studio LTS sulla sicurezza di impiego del vedolizumab, ha evidenziato che, su una popolazione di oltre 2700 pazienti esposti al farmaco per una durata mediana di circa 1 anno (oltre 900 pazienti esposti a vedolizumab per oltre 24 mesi), gli eventi avversi più comuni osservati sono risultati simili a

quelli riportati durante il primo anno di trattamento negli studi GEMINI. In particolare l'analisi preliminare ha permesso di osservare che la percentuale di infezioni gravi è stata molto bassa e non si sono verificati casi di PML (Colombel et al., 2013b).

Sulla base dei dati attualmente disponibili sulla sicurezza di vedolizumab, le informazioni riportate nella scheda tecnica comprendono note di richiamo al rischio di reazioni da infusione, reazioni da ipersensibilità, infezioni, tossicità epatica e leucoencefalopatia multifocale progressiva. Vedolizumab è controindicato nei pazienti con episodi pregressi di reazioni da ipersensibilità gravi. Inoltre il trattamento con vedolizumab non è raccomandato nei pazienti con infezioni gravi attive, e la sospensione della terapia con vedolizumab dovrebbe essere presa in considerazione nei pazienti che sviluppano infezioni gravi durante il trattamento con questo farmaco (Poole, 2014).

9.4.1. Leucoencefalopatia multifocale progressiva

Una delle ragioni per le quali vedolizumab è stato sviluppato come bloccante selettivo dell'integrina $\alpha_4\beta_7$, in grado di inibire specificamente la migrazione dei linfociti T attivati nei tessuti intestinali infiammati, risiede nel fatto che natalizumab, a causa della sua capacità di bloccare sia l'integrina $\alpha_4\beta_1$ che $\alpha_4\beta_7$, inibisce la migrazione dei linfociti T attivati anche nel sistema nervoso centrale (Yednock et al., 1992; Del Pilar Martin et al., 2008). A questo livello, la perdita di sorveglianza immunitaria da un lato giustifica l'efficacia di natalizumab nel trattamento della sclerosi multipla (Rudick et al., 2006) ma, dall'altro, sembra aumentare il rischio di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una reazione degenerativa grave e spesso fatale del tessuto cerebrale dovuta alla riattivazione di un poliomavirus latente (Chen et al., 2009).

La PML è una malattia demielinizzante della sostanza bianca cerebrale causata da un'infezione citolitica degli oligodendrociti ad opera del poliomavirus umano John

Cunningham (JC) (Major, 2010). Sebbene la maggior parte dei casi di PML si sviluppi nei soggetti gravemente immunocompromessi, con particolare riguardo per quelli affetti da virus dell'immunodeficienza umana (HIV), l'insorgenza di questa malattia è stata ripetutamente riscontrata nei pazienti trattati con farmaci biotecnologici, quali gli anti-LFA-1 (efalizumab) o gli anti-CD20 (rituximab) (Major, 2010). Anche le mutazioni della proteina capsidica virale di tipo 1 del virus JC (VP1), coinvolta nell'interazione del virus con i recettori cellulari, possono favorire l'insorgenza della PML (Gorelik et al., 2011). L'infezione da virus JC si acquisisce spesso durante l'infanzia, e la maggior parte degli adulti risulta avere contratto l'infezione, ma non sviluppa la PML. Il virus JC sembra infatti rimanere inattivo nell'organismo, in uno stato di latenza, finché una marcata soppressione del sistema immunitario non gli consente di riattivarsi e di iniziare a moltiplicarsi. Nel corso degli studi clinici su natalizumab (circa 2000 pazienti con sclerosi multipla e 1000 con malattia di Crohn), la PML è stata diagnosticata in 2 pazienti con sclerosi multipla e 1 paziente con malattia di Crohn (Van Assche et al., 2005). A distanza di circa 10 anni, nel 2014, l'analisi di circa 123.000 pazienti, trattati con natalizumab in tutto il mondo nella fase post-marketing, ha evidenziato che 454 hanno sviluppato la PML e che l'incidenza stimata di PML è pari a 3,6 per mille pazienti-anno. Nei pazienti trattati con natalizumab sono stati identificati tre fattori in grado di aumentare il rischio di sviluppare PML: 1) la durata del trattamento, soprattutto se superiore a 2 anni; 2) un precedente trattamento con farmaco immunosoppressore; 3) presenza nel sangue di anticorpi anti-JCV. In particolare, è stato stabilito che nei pazienti con positività per anticorpi anti-virus JC il rischio di insorgenza di PML sia più elevato (Saruta e Papadakis, 2014).

I dati clinici attualmente disponibili indicano che vedolizumab non è stato associato ad alcun caso di PML. Tuttavia, a causa del rischio di insorgenza di PML nei pazienti trattati con natalizumab, anche tutti i pazienti sottoposti a terapia con vedolizumab devono essere

monitorati per controllare lo sviluppo di sintomi neurologici *ex-novo* o il peggioramento di sintomi neurologici insorti in precedenza (Poole, 2014).

La determinazione del virus JC in campioni di sangue prelevati ad intervalli di circa 2 mesi da oltre 2.000 pazienti inclusi negli studi clinici pre-registrativi sul vedolizumab non ha evidenziato alcuna associazione tra il trattamento con vedolizumab e la presenza di viremia JC. In questa popolazione, 9 pazienti sono risultati positivi per la presenza di virus JC nel sangue. Quattro di questi pazienti erano risultati negativi alla valutazione basale e la loro positività alla viremia è regredita spontaneamente nelle fasi successive. I restanti 5 pazienti erano risultati positivi al virus JC già alla valutazione basale. Uno di questi pazienti ha mantenuto la positività alle prime due valutazioni dopo il basale, ma si è negativizzato alla terza; tre pazienti sono risultati negativi dopo la valutazione basale; il quinto paziente non si è presentato alle visite di *follow-up* (Parikh et al., 2011).

9.5. *Profilo di immunogenicità*

I dati attualmente disponibili sulla capacità del vedolizumab di svolgere attività immunogena, ovvero di stimolare l'attivazione del sistema immunitario evocando la produzione di anticorpi anti-anticorpi umani (*human anti-human antibody*, HAHA), devono essere interpretati tenendo in considerazione che gli studi iniziali di fase II sono stati svolti con una versione di vedolizumab che ha mostrato una significativa attività immunogena (Feagan et al., 2005; 2008). Per questa ragione, è stata sviluppata una seconda versione di vedolizumab che ha mostrato minore attività immunogena nei successivi studi clinici di fase II e III, e che ha infine ottenuto l'approvazione da parte delle autorità regolatorie per l'utilizzazione nella pratica clinica (Parikh et al., 2012; 2013).

In uno studio di fase II controllato con placebo, condotto su 181 pazienti con colite ulcerosa, 118 pazienti sono stati trattati con la versione iniziale di vedolizumab alla dose di

0,5 o 2 mg/kg (Feagan et al., 2005). Tra questi, il 44% dei soggetti esposti a vedolizumab ha sviluppato HAHA a distanza di 8 settimane dall'inizio del trattamento. Inoltre, i titoli sierici di HAHA sono risultati superiori a 1:125 nel 24% dei pazienti trattati con vedolizumab (11% nel gruppo trattato con la dose di 2 mg/kg, e 38% nel gruppo trattato con la dose di 0,5 mg/kg). In questi pazienti il grado di saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ da parte di vedolizumab sui linfociti T circolanti $CD4^+CD45RO^+$ si è ridotto rapidamente, ed essi hanno raggiunto percentuali di remissione clinica simili a quelle ottenute nel gruppo placebo (14% vs 12%). Per contro, nei pazienti trattati con vedolizumab che non avevano sviluppato HAHA o li avevano sviluppati a basso titolo, i siti dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ sui linfociti T circolanti sono risultati ben saturati dal vedolizumab e questi pazienti hanno raggiunto tassi di remissione clinica del 42% (Feagan et al., 2005).

In uno studio di fase II svolto su 37 pazienti con colite ulcerosa attiva, che erano stati trattati con la seconda versione di vedolizumab, alle dosi di 2, 6 o 10 mg/kg somministrate nei giorni 1, 15, 29 e 85, la presenza di HAHA neutralizzanti è stata evidenziata in 4 pazienti (11%). È interessante notare che solo in 1 di questi 4 pazienti (trattato con vedolizumab alla dose di 2 mg/kg), è stata osservata una maggiore rapidità sia della *clearance* ematica di vedolizumab che della desaturazione dei siti di legame di vedolizumab sulle molecole di integrina $\alpha_4\beta_7$, in confronto ai pazienti che erano risultati negativi per lo sviluppo di HAHA (Parikh et al., 2012). I pazienti valutati in questo studio di fase II sono confluiti in un successivo studio di fase II in aperto a lungo termine, condotto su 72 pazienti con colite ulcerosa e malattia di Crohn che sono stati sottoposti a trattamento con vedolizumab alle dosi di 2, 6 o 10 mg/kg ai giorni 1, 15 e 43 e, successivamente, ad intervalli di 8 settimane (Parikh et al., 2013). Nello studio di Parikh et al. (2013), la valutazione basale, prima dell'inizio della terapia con vedolizumab in aperto, ha evidenziato la presenza di HAHA in 3 pazienti (4%). Uno di questi pazienti, che si era immunizzato durante la sua partecipazione a un precedente

studio di fase II con la versione iniziale di vedolizumab ed era caratterizzato da un titolo HAHA basale di 1:625, ha manifestato una reazione da infusione in occasione della prima somministrazione di vedolizumab all'inizio dello studio in aperto. Negli altri due pazienti la presenza di HAHA, che era stata osservata alla valutazione basale, non è stata confermata in occasione dei controlli successivi (Parikh et al., 2013).

Negli studi di fase III, GEMINI I e GEMINI II, la presenza di anticorpi anti-vedolizumab è stata riscontrata nel 4% (n=56) dei pazienti con colite ulcerosa o malattia di Crohn trattati con vedolizumab fino a 52 settimane (n=1434) (Rosario et al., 2013; 2014a). In 9 di questi pazienti (0,6%) la positività per gli anticorpi è risultata persistente alle varie visite di controllo. In 8 di questi 9 pazienti sono state monitorate anche le concentrazioni ematiche di vedolizumab, e i risultati di queste valutazioni cinetiche hanno mostrato l'assenza di concentrazioni misurabili di vedolizumab in 6 pazienti e la presenza di concentrazioni molto basse di vedolizumab nei restanti 2 pazienti. La remissione clinica alle settimane 6 o 52 non è stata raggiunta in nessuno dei 9 pazienti con positività anticorpale anti-vedolizumab. In 33 dei 56 pazienti che hanno sviluppato anticorpi anti-vedolizumab è stata evidenziata la presenza di anticorpi neutralizzanti. Inoltre, negli studi GEMINI I e GEMINI II, è stata riscontrata la presenza di anticorpi anti-vedolizumab nel 13% dei pazienti a distanza di 24 settimane dalla somministrazione dell'ultima dose di vedolizumab. In questi studi di fase III 61 pazienti hanno manifestato reazioni da infusione; 3 di loro (5%) sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-vedolizumab e hanno mostrato livelli più bassi delle concentrazioni di valle del vedolizumab rispetto alla globalità dei pazienti arruolati (Rosario et al., 2013; 2014a).

I dati clinici disponibili sui farmaci anti-TNF suggeriscono che la maggior parte dei casi di perdita della risposta terapeutica sembrano dipendere dallo sviluppo di anticorpi anti-farmaco, con conseguente raggiungimento di bassi livelli sierici di valle del rispettivo farmaco (Baert et al., 2003; Levesque et al., 2014). Su tale base è stato proposto che il

monitoraggio delle concentrazioni sieriche di valle del farmaco e dei rispettivi anticorpi anti-farmaco, con conseguente aggiustamento della frequenza di somministrazione del farmaco, possa essere utile per ottimizzare i benefici terapeutici delle terapie con farmaci anti-TNF (Afif et al., 2010). In questo contesto è interessante notare che negli studi GEMINI I e GEMINI II i dati di efficacia del vedolizumab nel mantenimento della remissione non hanno mostrato alcuna correlazione con i livelli sierici di valle del farmaco (Feagan et al., 2013; Sandborn et al., 2013). Inoltre, come appena accennato, in entrambi gli studi lo sviluppo di anticorpi anti-farmaco, con positività persistente e associato a fallimento della risposta terapeutica, è stato evidenziato nello 0,6% dei pazienti trattati con vedolizumab (Rosario et al., 2013; 2014a). Complessivamente, i dati farmacocinetici e la determinazione degli anticorpi anti-farmaco sembrano quindi suggerire che nei pazienti trattati con vedolizumab il rischio di perdita della risposta terapeutica a causa dello sviluppo di anticorpi anti-farmaco sia molto basso. Allo stesso tempo è opportuno sottolineare che i risultati sopra menzionati sono stati criticati per ragioni connesse alla scarsa specificità dei saggi utilizzati per la rilevazione degli anticorpi anti-vedolizumab nel siero dei pazienti e che, secondo alcuni autori, le percentuali di sviluppo degli anticorpi anti-vedolizumab negli studi GEMINI I e GEMINI II potrebbero essere state sottostimate (Raine, 2014). Sarebbe quindi opportuno che il profilo di immunogenicità del vedolizumab venga rivalutato da studi futuri basati sull'utilizzazione di saggi più specifici per la determinazione dei livelli di anticorpi anti-vedolizumab.

10. Commento

I risultati dello studio GEMINI I suggeriscono che vedolizumab sia efficace nell'indurre e mantenere la remissione delle forme moderate-gravi di colite ulcerosa. In particolare, i dati disponibili suggeriscono che vedolizumab può trovare impiego nel trattamento di questa patologia anche come alternativa terapeutica ai farmaci anti-TNF o nei pazienti con

controindicazione alla terapia con tiopurine. Alcuni aspetti non sono stati esaminati dagli studi clinici pre-registrativi e dovranno essere valutati da studi disegnati *ad hoc* o sulla base delle conoscenze acquisite nella fase *post-marketing*. I punti più importanti comprendono quanto segue: 1) lo studio GEMINI I non è stato specificamente disegnato né per stabilire l'intervallo di tempo necessario ad ottenere l'effetto massimale di vedolizumab nella terapia di induzione della remissione della colite ulcerosa, né per determinare la dose minima efficace di vedolizumab da utilizzare nella terapia di mantenimento della remissione; 2) L'efficacia del vedolizumab nei pazienti che non rispondono alla terapia con farmaci anti-TNF sostiene il suo impiego anche nella terapia del paziente ospedalizzato per colite ulcerosa grave refrattaria, candidato all'intervento chirurgico; tuttavia non è noto se il vedolizumab riesca a sviluppare pienamente la sua azione terapeutica nel breve intervallo di tempo disponibile per ottenere l'induzione in questo tipo di pazienti; in questo contesto, un altro importante quesito riguarda la possibilità di utilizzare il vedolizumab in associazione con altri farmaci, quali gli immunosoppressori tradizionali o i farmaci anti-TNF, per indurre uno stato di remissione.

Complessivamente, i risultati dello studio GEMINI II suggeriscono che vedolizumab sia un farmaco efficace per il trattamento della malattia di Crohn. I dati disponibili hanno evidenziato una superiorità statistica di vedolizumab rispetto al placebo nella terapia di mantenimento della remissione e, in questo contesto, l'efficacia di vedolizumab è risultata evidente indipendentemente dalla precedente esposizione dei pazienti ai farmaci anti-TNF. I dati relativi alla terapia di induzione della remissione lasciano tuttavia un certo margine di incertezza, dal momento che nello studio GEMINI II vedolizumab è risultato superiore al placebo solo per uno dei due parametri primari di esito del trattamento (remissione clinica). Nel tentativo di giustificare queste discrepanze, gli autori dello studio GEMINI II hanno ipotizzato interferenze negative da parte di vari fattori, tra i quali il rischio intrinseco associato alla durata e alla gravità della malattia, la precedente esposizione dei pazienti ad altri

trattamenti farmacologici di lunga durata, il grado di refrattarietà della malattia e la più lenta cinetica di inibizione della migrazione linfocitaria indotta dai farmaci inibitori delle integrine. A questo riguardo è importante considerare che vedolizumab, inibendo i processi di adesione endoteliale e migrazione, blocca l'infiltrazione dei tessuti intestinali da parte di linfociti di recente attivazione, ma non interferisce necessariamente con le funzioni dei linfociti attivati in precedenza e già migrati nei tessuti intestinali infiammati prima dell'inizio del trattamento con vedolizumab. Questo particolare meccanismo d'azione potrebbe quindi spiegare l'iniziale latenza necessaria per ottenere un effetto significativo sull'infiammazione intestinale, ma, allo stesso tempo, potrebbe garantire un'efficacia duratura nel tempo, fattore importante nel trattamento di una patologia cronica recidivante nella quale gli obiettivi della terapia si prefiggono di ottenere risultati positivi a lungo termine. A questo riguardo, i risultati preliminari attualmente disponibili sull'efficacia a lungo termine del vedolizumab suggeriscono che, se da un lato non tutti i pazienti rispondono a questo tipo di farmaco, dall'altro quelli che rispondono tendono a mantenere la risposta terapeutica invariata a lungo termine.

Un altro aspetto degno di nota è rappresentato dal fatto che il margine di efficacia del vedolizumab nell'indurre la remissione della malattia di Crohn rispetto al placebo è risultato inferiore rispetto a quello ottenuto nella colite ulcerosa. Inoltre l'effetto terapeutico del vedolizumab nella malattia di Crohn è insorto con una maggiore latenza e con un picco di attività che tende a manifestarsi più lentamente, intorno alla decima settimana di trattamento. Questo profilo di attività potrebbe dipendere da varie motivazioni, tra le quali: 1) differenze nei meccanismi immunopatogenetici che sottendono la colite ulcerosa e la malattia di Crohn, in relazione soprattutto ai diversi ruoli che le anomalie dei meccanismi dell'immunità innata (ampiamente dipendenti da cellule che non esprimono l'integrina $\alpha_4\beta_7$) svolgono nella patogenesi di queste due malattie; 2) l'elevato grado di gravità della malattia nella

popolazione di pazienti arruolati nello studio GEMINI II (valori basali particolarmente elevati di punteggio CDAI, proteina C reattiva, calprotectina fecale; elevata proporzione di pazienti con malattia fistolizzante, pregressi interventi chirurgici o fallimento terapeutico con almeno un farmaco anti-TNF); 3) a causa della natura transmurale dell'infiammazione nella malattia di Crohn, il trattamento anti-integrine potrebbe richiedere un tempo più prolungato per poter bloccare in maniera efficace la migrazione dei leucociti attivati nella parete intestinale e, di conseguenza, mostrare i propri effetti terapeutici nelle fasi più tardive della terapia; inoltre anche per il natalizumab è stata osservata una cinetica temporale piuttosto lenta della risposta terapeutica da parte dei pazienti con malattia di Crohn. Sulla base di tali considerazioni, gli studi clinici futuri e le esperienze *post-marketing* dovranno attentamente rivalutare il ruolo e l'importanza del vedolizumab nella terapia di induzione della remissione della malattia di Crohn. A questo riguardo è importante considerare che, sebbene gli studi pre-registrativi abbiano evidenziato una saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nei linfociti circolanti superiore al 95% in tutti i pazienti trattati con vedolizumab, la variabilità o il basso grado di risposta terapeutica al vedolizumab potrebbero in realtà dipendere dal grado di saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nei linfociti già migrati e presenti nei tessuti intestinali infiammati. Questa ipotesi dovrebbe essere saggiata da studi disegnati specificamente per valutare la possibile correlazione tra i livelli ematici di vedolizumab e il grado di saturazione dell'integrina $\alpha_4\beta_7$ nei linfociti migrati nei tessuti intestinali infiammati.

E' importante notare infine che il possibile ruolo del vedolizumab nel trattamento di importanti sottogruppi di pazienti con malattia di Crohn, quali i pazienti pediatrici, i pazienti con inizio precoce della malattia, i pazienti con fistole perianali e i pazienti con rischio elevato di recidiva dopo intervento chirurgico, rimane per il momento indeterminato. Il piano di sviluppo clinico di vedolizumab prevede attualmente un programma pediatrico, nonché valutazioni dell'efficacia del farmaco nella condizione della malattia perianale, nelle

manifestazioni extraintestinali, nella pouchite e della prevenzione della recidiva post-chirurgica. E' inoltre previsto uno studio di valutazione dell'efficacia di vedolizumab nell'induzione della guarigione della mucosa nella malattia di Crohn.

Il profilo di sicurezza di vedolizumab è favorevole e si mantiene tale anche nei pazienti che proseguono il trattamento con farmaci immunosoppressori tradizionali. La capacità del vedolizumab di modulare selettivamente l'attività immunitaria a livello della mucosa digestiva, in assenza di interferenze significative per i processi immunitari sistemici, fa prevedere per questo farmaco un profilo di sicurezza sistemico più favorevole rispetto ai farmaci attualmente approvati per il trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali. In particolare, con l'introduzione di vedolizumab nella pratica clinica è attesa una riduzione del rischio di eventi infettivi gravi, che rappresentano un problema rilevante associato alla terapia con i farmaci immunosoppressori tradizionali e anti-TNF. Considerazioni più conclusive e concrete sul profilo di sicurezza del vedolizumab potranno comunque essere fatte dopo periodi di osservazione a lungo termine su popolazioni di pazienti più ampie.

11. Status regolatorio

Vedolizumab è stato approvato negli USA a maggio del 2014 per il trattamento delle forme moderate-gravi di colite ulcerosa e di malattia di Crohn nei pazienti adulti che abbiano mostrato in precedenza una risposta terapeutica inadeguata o intolleranza a farmaci immunosoppressori tradizionali o a farmaci anti-TNF, o che abbiano mostrato una risposta terapeutica inadeguata o intolleranza o abbiano sviluppato dipendenza ai corticosteroidi. Nei pazienti con colite ulcerosa vedolizumab è stato approvato per la terapia sia di induzione della remissione della forma attiva che di mantenimento della risposta e della remissione clinica, per promuovere il miglioramento dello stato della mucosa colica alla valutazione

endoscopica, e per ottenere uno stato di remissione libero dalla necessità di assumere corticosteroidi. Nei pazienti con malattia di Crohn, vedolizumab è stato approvato per ottenere la risposta clinica, la remissione clinica e uno stato di remissione libero dalla necessità di assumere corticosteroidi. Successivamente, vedolizumab è stato approvato anche nell'Unione Europea, Germania, Austria, Norvegia, Islanda e Liechtenstein per le forme moderate e gravi di colite ulcerosa e di malattia di Crohn in pazienti adulti che in precedenza abbiano mostrato una risposta inadeguata o intolleranza alle terapie farmacologiche tradizionali o ai farmaci anti-TNF.

Vedolizumab viene fornito in fiale da 20 mL contenenti 300 mg di principio attivo da utilizzare per una singola somministrazione. Al momento della somministrazione, il principio attivo deve essere ricostituito in 250 mL di soluzione fisiologica sterile. Sia nella colite ulcerosa che nella malattia di Crohn, vedolizumab deve essere somministrato alla dose di 300 mg, infusa per via endovenosa nell'arco di 30 minuti, alle settimane zero, 2 e 6 e successivamente ogni 8 settimane. Il trattamento dovrebbe essere interrotto se non si osserva alcun beneficio terapeutico alla quattordicesima settimana di terapia.

Prima di iniziare la terapia con vedolizumab, i pazienti dovrebbero essere sottoposti a tutte le vaccinazioni obbligatorie o raccomandate dalle autorità sanitarie. La scheda tecnica di vedolizumab riporta inoltre alcuni importanti avvertimenti concernenti il rischio di reazioni da ipersensibilità immunitaria, il rischio di infezioni e il possibile rischio di PML. Sebbene negli studi clinici condotti su vedolizumab non si sia manifestato alcun caso di PML, l'autorità regolatoria ritiene che il rischio di tale evento avverso non possa essere escluso del tutto. Per questa ragione è stato raccomandato che i pazienti in trattamento con vedolizumab vengano attentamente monitorati in modo da rilevare tempestivamente la comparsa di sintomi neurologici di nuova insorgenza o l'aggravamento di sintomi neurologici pregressi. Nella fase *post-marketing* sarà inoltre condotto uno studio con l'obiettivo di valutare il rischio di

infezioni gravi, PML, neoplasie maligne e infezioni specifiche, con particolare attenzione per le infezioni del tratto gastrointestinale e le infezioni del tratto respiratorio prossimale.

12. Conclusioni

I dati attualmente disponibili indicano che vedolizumab rappresenta una importante opzione terapeutica per il trattamento dei pazienti sia con colite ulcerosa che con malattia di Crohn, sia naive che dopo fallimento del trattamento con farmaci anti-TNF. Vedolizumab si è infatti dimostrato efficace e sicuro sia nei pazienti non trattati in precedenza con altri farmaci anti-IBD, ivi compresi i farmaci anti-TNF, sia nei pazienti che in precedenza avevano mostrato una risposta terapeutica insufficiente, o avevano perso la risposta terapeutica o avevano sviluppato intolleranza ad almeno un trattamento standard, ivi compresi i farmaci anti-TNF. Se questo profilo di efficacia e sicurezza sarà confermato dall'esperienza acquisita nella fase di osservazione *post-marketing*, il vedolizumab si collocherà nel panorama terapeutico delle malattie infiammatorie croniche intestinali come capostipite di una nuova classe di farmaci, sviluppata sulla base del concetto innovativo che il trattamento di queste gravi patologie non richiede necessariamente un'immunosoppressione sistemica, ma locale, mirata al tratto gastrointestinale attraverso il blocco selettivo dell'integrina $\alpha_4\beta_7$. Su tali basi gli studi clinici futuri potranno valutare nuove strategie terapeutiche basate sul possibile impiego combinato, in maniera concomitante o sequenziale, del vedolizumab (e/o di altri farmaci con meccanismo d'azione analogo) con i farmaci anti-TNF o gli immunosoppressori tradizionali.

13. Bibliografia

- Afif W, Loftus EV Jr, Faubion WA, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1133-9.
- Agace WW. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:682-92.
- Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, et al. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int* 2002; 52:367-74.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000; 6:583-8.
- Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14+ macrophages. *Gastroenterology* 2011; 141:2026-38.
- Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003; 348:601-8.
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007; 369:1641-57
- Ben-Horin S, Chowers Y. Review article: loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:987-95.
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, et al. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993; 74:185-95.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, et al. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 295:2275-85.
- Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, et al. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997; 151:97-110.
- Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, et al. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010; 464:1371-5.
- Butcher EC, Williams M, Youngman K, et al. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 1999; 72:209-53.
- Cahill RN, Poskitt DC, Frost DC, et al. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med* 1977; 145:420-8.
- Chen Y, Bord E, Tompkins T, et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* 2009; 361:1067-74.
- Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132:52-65.

Colombel JF, Sands B, Feagan BG, et al. Integrated safety analysis of vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gastroenterology* 2013a; 144 (Suppl. 1): S-113.

Colombel JF, Sands B, Hanauer SB, et al. Long-term safety of vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis or Crohn's disease. *United European Gastroenterology Journal* 2013; 1(Suppl. 1), A107.

Connor EM, Eppihimer MJ, Morise Z, et al. Expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in acute and chronic inflammation. *J Leukoc Biol* 1999; 65:349-55.

Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett* 2014; 161:231-5.

Del Pilar Martin M, Cravens PD, Winger R, et al. Decrease in the numbers of dendritic cells and CD4 + T cells in cerebral perivascular spaces due to natalizumab. *Arch Neurol* 2008; 65:1596–603.

Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *J Crohns Colitis* 2010; 4:28–62.

Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, et al. Second European evidence based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* 2012; 6:991–1030.

Dirks NL, Rosario M, Gastonguay MR, et al. Population pharmacokinetic modeling of vedolizumab in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. *Gastroenterology* 2014; 1(suppl):S-591.

Dubree NJ, Artis DR, Castanedo G, et al. Selective alpha4beta7 integrin antagonists and their potential as antiinflammatory agents. *J Med Chem* 2002; 45:3451-7.

European Medicine Agency (EMA)/CHMP/676643/2013 assessment report, 15-166.

Feagan BG, McDonald J, Greenberg G, et al. An ascending dose trial of a humanized $\alpha 4\beta 7$ antibody in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 118:A874.

Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *N Engl J Med* 2005; 352:2499–507.

Feagan BG, Sandborn WJ, Hass S, et al. Health-related quality of life during natalizumab maintenance therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2737–46.

Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of active Crohn's disease with MLN0002, a humanized antibody to the alpha4beta7 integrin. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:1370–7.

Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2013; 369:699-710.

Feagan BG, Sandborn WJ, Smyth M, et al. Effects of continued vedolizumab therapy for ulcerative colitis in week 6 induction therapy nonresponders. *J Crohns Colitis* 2014a; 8(Suppl.):S276–7.

Feagan BG, Colombel JF, Rubin DT, et al. Health-related quality of life in patients with ulcerative colitis after treatment with vedolizumab: results from the GEMINI 1 study. *Gastroenterology* 2014b; 1(Suppl.):S-590.

Feagan BG, Kaser A, Smyth M, et al. Long-term efficacy of vedolizumab therapy for ulcerative colitis. *United European Gastroenterology Journal* 2014c; 2 (Suppl. 1).

Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119:1473-1482.

- Fedyk ER, Wyant T, Yang L-L, et al. Exclusive antagonism of the $\alpha 4\beta 7$ integrin by vedolizumab confirms the gut-selectivity of this pathway. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:2107-19.
- Fiorino G, Correale C, Fries W, et al. Leukocyte traffic control: a novel therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2010; 6:567-72.
- French J, Rosario M, Dirks NL, et al. Vedolizumab exposure-response relationship during induction therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2014a; 1(suppl):S592-3.
- French J, Rosario M, Dirks NL, et al. Exposure-response relationship of vedolizumab treatment in adults with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2014b; 1(suppl):S-592.
- Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV, Fleming MP, et al. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2011; 208:1127-33.
- Geremia A, Biancheri P, Allan P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014; 13:3-10.
- Ghosh S, Mitchell R. Impact of inflammatory bowel disease on quality of life: Results of the European Federation of Crohn's and Ulcerative Colitis Associations (EFCCA) patient survey. *J Crohns Colitis* 2007; 1:10-20.
- Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, et al. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001; 121:268-74.
- Gordon FH, Hamilton MI, Donoghue S, et al. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:699-705.
- Gorelik L, Reid C, Testa M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. *J Infect Dis* 2011; 204:103-14.
- Gorfu G, Rivera-Nieves J, Hoang S, et al. Beta7 integrin deficiency suppresses B cell homing and attenuates chronic ileitis in SAMP1/YitFc mice. *J Immunol* 2010; 185:5561-8.
- Goto A, Arimura Y, Shinomura Y, et al. Antisense therapy of MAdCAM-1 for trinitrobenzenesulfonic acid-induced murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:758-65.
- Grayson MH, Van der Vieren M, Sterbinsky SA, et al. α 4 β 2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* 1998; 188:2187-91.
- Haanstra KG, Hofman SO, Lopes DM, et al. Antagonizing the $\alpha 4\beta 1$ integrin, but not $\alpha 4\beta 7$, inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2013; 190:1961-73.
- Hall JG, Hopkins J, Orlans E. Studies on the lymphocytes of sheep. III. Destination of lymph-borne immunoblasts in relation to their tissue of origin. *Eur J Immunol* 1977; 7:30-7.
- Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, et al. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* 1994; 152:3282-93.

- Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1541-9.
- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1:S3-9.
- Hanauer S, Rutgeerts P, Xu J, et al. Long-term efficacy of vedolizumab therapy for Crohn's disease. *United European Gastroenterology Journal* 2014; 2(Suppl. 1).
- Hesterberg PE, Winsor-Hines D, Briskin M, et al. Rapid resolution of chronic colitis in the cotto-top tamarin with an antibody to a gut-homing integrin $\alpha 4\beta 7$. *Gastroenterology* 1996; 111:1373-80.
- Himmel ME, Yao Y, Orban PC, Steiner TS, Levings MK. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology* 2012; 136:115-22.
- Hokari R, Kato S, Matsuzaki K, et al. Involvement of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in the pathogenesis of granulomatous colitis in rats. *Clin Exp Immunol* 2001; 126:259-65.
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Wurbel MA, et al. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med* 2003; 198:963-9.
- Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, et al. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology* 2005; 128:922-34.
- Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, et al. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005; 54:1121-5.
- Kato S, Hokari R, Matsuzaki K. et al. Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:183-189.
- Katz S. "Mind the Gap": an unmet need for new therapy in IBD. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41:799-809.
- Kerlero de Rosbo NH, Brok HP, et al. Thesus monkey are highly susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein: characterization of immunodominant T and B-cell epitopes. *J Neuroimmunol* 2000; 110:83-96.
- Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 2000; 192:761-8.
- Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002; 16:1-4.
- Laudanna C, Kim JY, Constantin G, et al. Rapid leukocyte integrine activation by chemokines. *Immunol Rev* 2002; 186:37-46.
- Lefrançois L, Parker CM, Olson S, et al. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999; 189:1631-8.

- Levesque BG, Greenberg GR, Zou G, et al. A prospective cohort study to determine the relationship between serum infliximab concentration and efficacy in patients with luminal Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39:1126-35.
- Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2011; 7:235-41.
- Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, et al. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:621-30.
- Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, et al. Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of followup in the TREATTM registry. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1409-22.
- Lim WC, Hanauer S. Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 12:CD008870.
- Lobatón T, Vermeire S, Van Assche G, et al. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39:579-94.
- Madara JL, Podolsky DK, King NW, et al. Characterization of spontaneous colitis in cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*) and its response to sulfasalazine. *Gastroenterology* 1985; 88:13-9.
- Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 2010; 61:35-47.
- Matsuzaki K, Tsuzuki Y, Matsunaga H, et al. In vivo demonstration of T lymphocyte migration and amelioration of ileitis in intestinal mucosa of SAMP1/Yit mice by the inhibition of MAdCAM-1. *Clin Exp Immunol* 2005; 140:22-31.
- McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol* 1979; 122:1892-8.
- McLean LP, Shea-Donohue T, Cross R. Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Immunotherapy* 2012; 4:883-898.
- Meenan J, Spaans J, Grool TA, et al. Variation in gut-homing CD27-negative lymphocytes in inflammatory colon disease. *Scand J Immunol* 1998; 48:318-23.
- Milch C, Wyant T, Xu J, et al. Vedolizumab, a monoclonal antibody to the gut homing alpha4beta7 integrin, does not affect cerebrospinal fluid T-lymphocyte immunophenotype. *J Neuroimmunol* 2013; 264:123-6.
- Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, et al. Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther* 2014, in press.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142:46-54.
- Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:329-42.
- Ng SC, Benjamin JL, McCarthy NE, et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis* 2011; 17:2027-37.

- Papadakis KA, Prehn J, Moreno ST, et al. CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001; 121:246-54.
- Parikh A, Paolino J, Fedy ER, et al. No association between vedolizumab exposure and serum JC virus levels (abstract). *J Crohns Colitis* 2011; 5 (suppl 1):S109–10.
- Parikh A, Leach T, Wyant T et al. Vedolizumab for the treatment of active ulcerative colitis: a randomized controlled phase 2 dose-ranging study. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18:1470-9.
- Parikh A, Fox I, Leach T, et al. Long term clinical experience with vedolizumab in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1691–9.
- Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, et al. Monoclonal antibodies specific for beta 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of scid mice reconstituted with CD45RBhigh CD4+ T cells. *J Immunol* 1997; 158:2099-106.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354:899-910.
- Poole RM. Vedolizumab: First global approval. *Drugs* 2014; 74:1293-303.
- Raine T. Vedolizumab for inflammatory bowel disease: Changing the game, or more of the same? *United European Gastroenterol J* 2014; 2:333-44.
- Ransohoff RM. Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 2005; 8:1275.
- Rietdijk ST and D'Haens GR. Vedolizumab for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014; 7:423-30.
- Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, et al. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology* 2006; 131:1518-29.
- Rosario M, Fox I, Milch C, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship and immunogenicity of vedolizumab in adults with inflammatory bowel disease: additional results from GEMINI 1 and 2. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(suppl):S80.
- Rosario M, Wyant T, Milch C, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic relationship and immunogenicity of vedolizumab in adults with inflammatory bowel disease: additional results from the GEMINI 1 and 2 studies. *J Crohns Colitis* 2014a; 8(suppl 1):S42–3.
- Rosario M, Dirks N, Gastonguay M, et al. Population pharmacokinetic modelling of vedolizumab in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2014b; 8(suppl 1):S225–6.
- Rosario M, French J, Dirks N, et al. Exposure-response relationship during vedolizumab induction therapy in adults with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2014c; 8 (suppl 1):S270-1.
- Rosario M, French J, Dirks N, et al. Exposure-response relationship of vedolizumab after 6 weeks of treatment in adults with Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2014d; 8 (suppl 1):S270.
- Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354:911-23.
- Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005; 353:2462–76.

- Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 353:1912-25.
- Sandborn WJ, Colombel JF, D'Haens G, et al. One-year maintenance outcomes among patients with moderately-to-severely active ulcerative colitis who responded to induction therapy with adalimumab: subgroup analyses from ULTRA 2. *Aliment Pharmacol Ther* 2013a; 37:204–13.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2013b; 369:711–21.
- Sandborn WJ, Feagan B, Reinisch W, et al. Efficacy of continued vedolizumab therapy in patients with Crohn's disease who did not respond to vedolizumab induction therapy at week 6. *J Crohns Colitis* 2014; 8(suppl):S274–5
- Sands B, Hanauer S, Colombel JF, et al. Reductions in corticosteroid use in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease treated with vedolizumab. *Am J Gastroenterol* 2013a; 108(suppl):S503.
- Sands B, Hanauer S, Colombel JF. Reductions in corticosteroid use in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease treated with vedolizumab. *Am J Gastroenterol* 2013b; 108(suppl):P887.
- Sands BE, Feagan BG, Rutgeerts P, et al. Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology* 2014; 147:618-27.
- Saruta M, Papadakis KA. Lymphocyte homing antagonists in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin North Am* 2014; 43:581-601.
- Schulthess J, Meresse B, Ramiro-Puig E, et al. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* 2012; 37:108-21.
- Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, et al. Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-trophism. *J Immunol* 1993; 151:717-29.
- Singh JA, Wells GA, Christensen R, et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 2:CD008794.
- Smith MA, Mohammad RA. Vedolizumab: an $\alpha 4\beta 7$ integrin inhibitor for inflammatory bowel diseases. *Ann Pharmacother* 2014; 48:1629-35.
- Soler D, Chapman T, Yang L-L, et al. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti- $\alpha 4\beta 7$ integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330:864-75.
- Souza HS, Elia CC, Spencer J, et al. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1999; 45:856-63.
- Stefanich EG, Danilenko DM, Wang H, et al. A humanized monoclonal antibody targeting the $\beta 7$ integrin selectively blocks intestinal homing of T lymphocytes. *Br J Pharmacol* 2011; 162:1855-70.
- Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, et al. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 2006; 107:3447-54.

- Sternthal MB, Murphy SJ, George J, et al. Adverse events associated with the use of cyclosporine in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:937–43.
- Sugiura T, Kageyama S, Andou A, et al. Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice. *J Crohns Colitis* 2013; 7:e533-42.
- Svensson M, Marsal J, Ericsson A, et al. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest* 2002; 110:1113-21.
- Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial. *Gastroenterology* 2007; 132:1672-83.
- Thomas S, Baumgart DC. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 2012; 20:1-18
- Tidswell, M., R. Pachynski, S. W. Wu, et al. Structure-function analysis of the integrin $\beta 7$ subunit (Identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1). *J Immunol* 1997; 159:1497-505.
- Tiisala S, Paavonen T, Renkonen R. Alpha E beta 7 and alpha 4 beta 7 integrins associated with intraepithelial and mucosal homing, are expressed on macrophages. *Eur J Immunol* 1995; 25:411-7.
- Troncone E, Marafini I, Pallone F, et al. Th17 cytokines in inflammatory bowel diseases: discerning the good from the bad. *Int Rev Immunol* 2013; 32:526-33.
- Van Assche G and Rutgeerts P. Antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:291-300.
- Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005; 353:362–8.
- Vermeire S, Ghosh S, Panes J, et al. The mucosal addressin cell adhesion molecule antibody PF-00547,659 in ulcerative colitis: a randomized study. *Gut* 2011; 60:1068-75.
- Villablanca EJ, Mora JR. Competitive homing assays to study gut-tropic t cell migration. *J Vis Exp* 2011; 49:1-4.
- Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343:1020-34.
- Wahed M, Louis-Auguste JR, Baxter LM, et al. Efficacy of methotrexate in Crohn's disease and ulcerative colitis patients unresponsive or intolerant to azathioprine/ mercaptopurine. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30:614–20.
- Walters MJ, Wang Y, Lai N, et al. Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 335:61-9.
- Wang C, Hanly EK, Wheeler LW, et al. Effect of $\alpha 4\beta 7$ blockade on intestinal lymphocyte subsets and lymphoid tissue development. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:1751-62.
- Watanabe C, Miura S, Hokari R, et al. Spatial heterogeneity of TNF-alpha-induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MAdCAM-1 and VCAM-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:G1379-87.

- Williams C, Panaccione R, Ghosh S, et al. Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 2011; 4:237–48.
- Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 2000; 30:262-71.
- Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, et al. Impaired accumulation of antigen-specific CD8 lymphocytes in chemokine CCL25-deficient intestinal epithelium and lamina propria. *J Immunol* 2007; 178:7598-606.
- Wyant T, Yang L, Fedyk E. In vitro assessment of the effects of vedolizumab binding on peripheral blood lymphocytes. *mAbs* 2013; 5:842-50.
- Wyant T, Leach T, Sankoh S, et al. Vedolizumab affects antibody responses to immunisation selectively in the gastrointestinal tract: randomised controlled trial results. *Gut* 2015; 64:77-83.
- Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992; 356:63–6.
- Yousry TA, Major EO, Ryschkewitsch C, et al. Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 2006; 354:924–33.
- Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999; 190:1241-56.