



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

“Modelli matematici della cinetica degli anticorpi monoclonali ”

Relatore: Prof.ssa Chiara Dalla Man

Laureando: Nicolò Bugno

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 23/09/2022

Indice dei contenuti

ABSTRACT	1
CAPITOLO 1: Introduzione	3
1.1 Gli anticorpi monoclonali	3
1.2 Impiego degli anticorpi monoclonali	3
1.3 Somministrazione sottocutanea degli anticorpi monoclonali	5
1.4 I modelli farmacocinetici per le proteine terapeutiche	6
1.5 Obiettivo e contenuti della tesi	7
CAPITOLO 2: Metodi e modelli	9
2.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo	9
2.1.1 Introduzione	9
2.1.2 Stima dei parametri e analisi di sensitività	10
2.1.3 Costruzione del modello farmacocinetico fisiologico minimo	10
2.1.4 Parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico	11
2.1.5 Equazioni del modello	13
2.1.6 Validazione del modello	15
2.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo	17
2.2.1 Introduzione	17
2.2.2 Stima dei parametri e analisi di sensitività	19
2.2.3 Determinanti biofisici dei parametri del modello farmaco-specifico	19
2.2.4 Struttura del modello	20
2.2.5 Parametri fisiologici relativi al sito di somministrazione sottocutanea	21
2.2.6 Parametri fisiologici relativi al sistema linfatico centrale	26
2.2.7 Parametri fisiologici relativi al plasma venoso centrale	27
2.2.8 Parametri fisiologici relativi al sito di campionamento periferico e agli altri organi/tessuti	28
2.2.9 Biodisponibilità prevista dal modello	28
CAPITOLO 3: Risultati	35
3.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo	35

3.1.1 Stima dei parametri endovenosi del modello a 2 compartimenti	35
3.1.2 Stima della clearance linfatica tronco-linfonodale	36
3.1.3 Applicazioni del modello farmacocinetico fisiologico minimo per valutare l'impatto della ialuronidasi nella formulazione di anticorpi monoclonali	37
3.1.4 Confronto della clearance linfatica tronco-linfonodale con punto isoelettrico e biodisponibilità degli anticorpi monoclonali	39
3.1.5 Analisi della sensitività e validazione del modello	40
3.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo	41
3.2.1 Farmacocinetica endovenosa	41
3.2.2 Farmacocinetica sottocutanea	41
3.2.3 Determinanti biofisici dell'assorbimento sottocutaneo degli anticorpi monoclonali	42
3.2.4 Analisi della sensitività e simulazioni	43
CAPITOLO 4: Conclusioni	46
4.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo	46
4.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo	49
4.3 Considerazioni finali	52
BIBLIOGRAFIA	53

ABSTRACT

L'uso della via sottocutanea per la somministrazione di anticorpi monoclonali per il trattamento di condizioni croniche è stato ostacolato a causa di una comprensione incompleta dei meccanismi fondamentali che controllano l'assorbimento degli anticorpi monoclonali nel sito sottocutaneo e a causa della limitata traducibilità degli studi preclinici. Tuttavia, vista l'elevata potenzialità della terapia a base di anticorpi monoclonali, la ricerca in quest'ambito è in costante sviluppo, nel tentativo di individuare molecole sempre più efficaci e con meno effetti collaterali possibili. L'obiettivo di questo lavoro è dunque proprio lo studio e la descrizione di due modelli farmacocinetici degli anticorpi monoclonali, uno cosiddetto minimo, che utilizza solo due compartimenti, e l'altro basato invece sulla fisiologia dell'intero organismo.

Il modello minimo è stato costruito utilizzando parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea, al sistema linfatico e ai dati clinici di farmacocinetica per via endovenosa. Per valutare la biodisponibilità e l'assorbimento degli anticorpi monoclonali, sono stati utilizzati il punto isoelettrico, la clearance, la proteolisi e vari parametri relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico. Successivamente sono stati fatti studi per mettere in relazione anche punto isoelettrico e clearance tra di loro.

Il modello basato sulla fisiologia dell'intero organismo, invece, utilizza un sito di campionamento periferico per riflettere meglio la concentrazione misurata negli studi clinici, mentre, per il sito sottocutaneo, sono inclusi sia l'assorbimento capillare linfatico sia i processi di degradazione. In questo caso, sono stati messi in correlazione la carica locale delle CDR (complementary determining region) e il punto isoelettrico con i parametri relativi alla pinocitosi, al trasporto diffusivo/convettivo e alla clearance.

I modelli hanno mostrato risultati coerenti con altri studi riportati in letteratura e forniscono quindi una piattaforma per caratterizzare e prevedere la cinetica degli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione sottocutanea nell'uomo.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Gli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi (immunoglobuline), sono molecole complesse prodotte dai linfociti B, cellule che fanno parte del sistema di difesa del corpo umano (sistema immunitario), in risposta alla presenza di un'altra molecola, detta antigene, estranea all'organismo (ad esempio, batteri, virus, ecc.) [1].

A volte, il sistema immunitario identifica erroneamente i propri organi o tessuti normali come estranei e produce anticorpi contro di essi (autoanticorpi) aggredendoli. Questo processo è la causa delle malattie autoimmuni quali, ad esempio, l'artrite reumatoide e la sclerosi multipla.

Gli anticorpi riconoscono in modo specifico la sostanza estranea da combattere (antigene) grazie alla loro conformazione e hanno il compito di neutralizzarne l'effetto.

Gli anticorpi monoclonali sono molecole prodotte in laboratorio, a partire dai linfociti B estratti dalla milza del topo, e fuse con cellule tumorali del sangue (cellule di mieloma) che hanno la caratteristica di essere immortali. Queste cellule fuse, chiamate ibridoma, sono coltivate singolarmente, in altre parole sono clonate (una cellula in un pozzetto). La singola cellula divenuta immortale successivamente si divide formando un clone di cellule identiche capaci di produrre quantità illimitate dello stesso anticorpo chiamato, appunto, monoclonale che può essere purificato. Gli anticorpi monoclonali sono progettati per riconoscere specificamente un unico, determinato antigene e si legano ad esso neutralizzandolo.

Esistono quattro tipi di anticorpi monoclonali:

- murini (-omab), interamente derivati da cellule di topo. Possono portare a una reazione allergica negli esseri umani;
- chimerici (-ximab), ottenuti mediante tecniche di biologia molecolare che consentono di sostituire alcune parti dell'anticorpo monoclonale derivato da cellule di topo (la regione costante) con la corrispondente parte di proteina di origine umana. Possono causare allergia;
- umanizzati (-zumab), derivati principalmente da cellule umane ad eccezione della parte dell'anticorpo che si lega all'antigene bersaglio;
- umani (-umab), interamente derivati da cellule umane.

1.2 Impiego degli anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali possono essere prodotti in grandi quantità contro gli antigeni derivanti da una serie di malattie infiammatorie, di infezioni e di tumori e sono utilizzati sia per scopi diagnostici, sia per scopi terapeutici. Inoltre, sono impiegati anche per potenziare le difese naturali del corpo.

Gli anticorpi monoclonali possono essere anche legati (coniugati) a farmaci o a molecole radioattive (radio immunoterapia) per veicolare e indirizzare con estrema precisione il principio attivo verso il suo bersaglio. In questo modo si evita di coinvolgere altre parti dell'organismo riducendo gli effetti indesiderati e aumentando le probabilità di efficacia della terapia. La radio immunoterapia è una tecnica che viene applicata soprattutto nella cura dei tumori.

In diagnostica, gli anticorpi monoclonali possono essere impiegati per determinare la presenza (diagnosticare) di un antigene specifico ed eventualmente misurarne la quantità. Sono quindi utilizzati per individuare antigeni di agenti infettivi, quali virus e batteri, come pure proteine specifiche e antigeni presenti sulle cellule tumorali (markers tumorali). Possono essere impiegati anche nei kit diagnostici domestici quali, ad esempio, i test di gravidanza.

Gli anticorpi monoclonali utilizzati in terapia (cura) possono essere suddivisi in base alla loro attività antinfiammatoria, immunosoppressiva o antitumorale [2].

I primi esercitano un'azione antinfiammatoria perché il loro antigene bersaglio è costituito da sostanze coinvolte nell'infiammazione come, ad esempio, il TNF- α . Il TNF- α (tumor necrosis factor alfa) è coinvolto nella comparsa dell'insieme dei disturbi (sintomi) che si riscontrano nelle malattie infiammatorie su base autoimmune quali, ad esempio, l'artrite reumatoide e l'artrite psoriasica. Appartengono a questo gruppo di farmaci l'infliximab e l'adalimumab.

Gli anticorpi monoclonali ad attività immunosoppressiva hanno il compito di sopprimere le difese immunitarie dell'organismo. Questi anticorpi monoclonali, infatti, sono rivolti soprattutto contro le cellule immunitarie, linfociti B e linfociti T, e contro le proteine fondamentali per il loro differenziamento e la loro attivazione come, per esempio, l'interleuchina-2. Sono impiegati nella cura di malattie autoimmuni e nella prevenzione del rigetto degli organi trapiantati. Appartengono a questo gruppo di farmaci il rituximab (impiegato anche nella terapia di alcuni tipi di linfomi), il basiliximab e anche l'omalizumab, usato nella cura dell'asma allergica.

Infine, gli anticorpi monoclonali ad attività antitumorale riconoscono e si legano a fattori fondamentali per lo sviluppo delle cellule tumorali oppure ad antigeni derivanti da alcuni tipi di tumori come, ad esempio, l'HER-2, nei tumori della mammella. Appartengono a questo gruppo di anticorpi monoclonali il trastuzumab, il rituximab, il cetuximab e il bevacizumab e moltissimi altri. Anticorpi monoclonali ad attività antitumorale sono anche quelli diretti contro i "check-point immunologici" che vengono utilizzati in immunoterapia.

Le cellule tumorali possono evitare di essere riconosciute dal sistema immunitario o bloccare l'attività del sistema immunitario stesso. Alcuni anticorpi monoclonali, specifici, hanno la capacità di attivare la risposta del sistema di difesa dell'organismo (risposta immunitaria) contro i tumori in diversi modi:

- segnalando la presenza di cellule tumorali: le cellule tumorali rivestite dagli anticorpi monoclonali possono essere più facilmente scoperte e distrutte dal sistema immunitario;
- attivando la distruzione della membrana cellulare: alcuni anticorpi monoclonali possono innescare una risposta del sistema immunitario che può distruggere la membrana delle cellule tumorali;
- bloccando la crescita cellulare: alcuni anticorpi monoclonali bloccano la crescita delle cellule tumorali;

- prevenendo la crescita dei vasi sanguigni; infatti, affinché un tumore cresca e sopravviva, deve essere nutrito: alcuni anticorpi monoclonali bloccano l'interazione tra le cellule e le proteine necessarie per lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni;
- bloccando gli inibitori del sistema immunitario, poiché alcune proteine che si legano alle cellule del sistema immunitario regolano l'attività del sistema stesso: gli anticorpi monoclonali si legano a queste proteine bloccando l'inibizione del sistema immunitario e promuovendo l'attività contro le cellule tumorali;
- attaccando direttamente le cellule tumorali: alcuni anticorpi monoclonali possono aggredire direttamente la cellula tumorale attivando una serie di eventi all'interno della cellula stessa che portano alla sua autodistruzione;
- veicolando isotopi radioattivi: per le sue caratteristiche di elevata affinità, un anticorpo monoclonale può essere progettato come mezzo di trasporto di altre terapie; per esempio, quando è legato a una particella radioattiva, la trasporta direttamente alle cellule tumorali bersaglio minimizzando, così, l'effetto delle radiazioni sulle cellule sane (questa variazione della radioterapia tradizionale è chiamata radio immunoterapia);
- veicolando farmaci chemioterapici: alcuni anticorpi monoclonali vengono legati a un farmaco chemioterapico per trasportarlo direttamente alle cellule tumorali evitando l'effetto distruttivo sulle cellule sane;
- legandosi a cellule tumorali e a cellule immunitarie: alcune terapie utilizzano la combinazione di due anticorpi monoclonali, uno rivolto alla cellula tumorale e uno rivolto a una specifica cellula del sistema immunitario (questa combinazione può aumentare l'efficienza dell'attacco del sistema immunitario alle cellule tumorali);

Le terapie con anticorpi monoclonali sono state approvate per alcuni tumori tra cui la leucemia linfatica cronica, il linfoma di Hodgkin, il linfoma non-Hodgkin, il melanoma, il cancro del cervello, il cancro del seno, il cancro del colon-retto, il cancro del polmone, il cancro della prostata, il cancro dello stomaco.

Gli anticorpi monoclonali sono somministrati per via endovenosa. Alcuni anticorpi monoclonali possono essere utilizzati in combinazione con cure chemioterapiche o ormonali. Altri sono ancora in via di sperimentazione e utilizzati solo quando gli altri trattamenti non hanno avuto successo.

In generale, la terapia con anticorpi monoclonali comporta meno effetti indesiderati (effetti collaterali) rispetto ai trattamenti chemioterapici tradizionali, sebbene alcuni possano essere anche gravi. Spetta al medico illustrare quali effetti collaterali siano associati a quel particolare farmaco.

Gli effetti indesiderati (effetti collaterali) più comuni causati dagli anticorpi monoclonali includono reazioni allergiche, come orticaria o prurito, segni e sintomi simili all'influenza, tra cui brividi, affaticamento, febbre e dolori muscolari, nausea, diarrea, eruzioni cutanee, bassa pressione sanguigna. Il rapporto rischi-benefici di ciascuna terapia e l'opportunità di sottoporvisi deve essere discussa con il proprio medico.

1.3 Somministrazione sottocutanea degli anticorpi monoclonali

Attualmente gli anticorpi monoclonali vengono somministrati principalmente per via sottocutanea; questo tipo di somministrazione viene preferita a quella endovenosa per via delle visite più brevi per

i pazienti, della possibilità di autosomministrazione e della sua natura meno invasiva. Tuttavia, rispetto alla via endovenosa, l'iniezione sottocutanea presenta sfide associate alla biodisponibilità incompleta e alla somministrazione indolore di volumi di liquidi maggiori.

Il tessuto sottocutaneo e il sistema linfatico sono barriere importanti per l'assorbimento degli anticorpi monoclonali. Dopo la somministrazione sottocutanea, gli anticorpi monoclonali viaggiano attraverso i vasi linfatici e i linfonodi prima di raggiungere la circolazione sistemica. La biodisponibilità sottocutanea degli anticorpi monoclonali è tipicamente compresa tra il 52 e l'80% [3]. La proteolisi all'interno del sistema linfatico e del sito di iniezione sottocutanea può essere parzialmente responsabile della ridotta biodisponibilità degli anticorpi monoclonali. Il tasso di legame e riciclo del recettore Fc neonatale (FcRn) supera il tasso di traffico lisosomiale/endosomiale di anticorpi monoclonali; pertanto, la proteolisi endosomiale contribuisce solo in minima parte alla bassa biodisponibilità degli anticorpi monoclonali [3]. Inoltre, la disposizione mediata del farmaco target (TMDD) è spesso saturata a causa di recettori limitati. Pertanto, gli anticorpi monoclonali vengono eliminati lentamente dalla circolazione sistemica. Le proteine terapeutiche, come le immunoglobuline G (IgG1, IgG2, IgG4), hanno una emivita di circa 23 giorni, che è sostanzialmente più lunga di altre proteine di peso molecolare simile. Inoltre, il tasso di comparsa degli anticorpi monoclonali nel plasma è lento (T_{max} generalmente di 2-14 giorni). La bassa biodisponibilità degli anticorpi monoclonali può derivare da efficienti meccanismi di clearance pre-sistemica o da ritenzione irreversibile (e successiva eliminazione) di dosi significative nel sito di iniezione o nei tessuti circostanti [3].

Charman et al. [4] ha studiato le cause della ridotta biodisponibilità della proteina dell'ormone della crescita umano (hGH) utilizzando un modello di pecora. La degradazione del sito di iniezione sottocutanea era minima per hGH, mentre la proteolisi linfatica era responsabile della sua ridotta biodisponibilità dopo una somministrazione sottocutanea. Gli autori ipotizzano quindi che la proteolisi interstiziale nel sistema linfatico possa essere responsabile della minore biodisponibilità degli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione sottocutanea.

1.4 I modelli farmacocinetici per le proteine terapeutiche

Per oltre 30 anni sono stati riportati diversi modelli farmacocinetici fisiologici per le proteine terapeutiche. Questi modelli sono stati applicati per studiare la cinetica degli anticorpi monoclonali per diverse applicazioni, tra cui il ridimensionamento inter-specie, la guida dell'ingegneria degli anticorpi e la previsione delle interazioni farmaco-farmaco. Nel 1986, Covell et al. applicarono per primo un modello farmacocinetico fisiologico per studiare la farmacocinetica dell'immunoglobulina G1 (IgG1) e frammenti di anticorpi nei topi [5]. Baxter et al. ottennero i parametri fisiologici dell'uomo da quelli dei topi per predire i profili farmacocinetici clinici di un anticorpo monoclonale [6]. L'influenza del recettore Fc neonatale (FcRn) sulla disposizione degli anticorpi monoclonali è stata incorporata per la prima volta in un modello farmacocinetico fisiologico da Ferl et al. [7]. Nel 2013, Zhao e colleghi hanno messo insieme un modello compartimentale della cinetica con un modello di assorbimento basato sulla fisiologia per quantificare il processo di assorbimento degli anticorpi monoclonali dopo il rilascio sottocutaneo o intramuscolare [8]. Gill et al. hanno sviluppato un modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo per vari farmaci proteici nell'uomo [9], che rappresenta i tessuti sottocutanei utilizzando compartimenti collegati al sistema circolatorio tramite il flusso sanguigno e il flusso linfatico. Questo modello, tuttavia, non tiene conto dei processi di ricircolo mediati dal recettore FcRn nei compartimenti degli organi e richiede valori

precedentemente determinati della biodisponibilità degli anticorpi monoclonali. Offman et al. hanno incorporato la via di assorbimento linfatico in un modello farmacocinetico basato su tutto il corpo per un peptide somministrato per via sottocutanea [10]. Più recentemente, Glassman e Balthasar hanno riportato un modello farmacocinetico fisiologico basato sull'intero organismo per fare previsioni a priori della farmacocinetica clinica degli anticorpi monoclonali che esibiscono un'eliminazione target-mediata [11], e Li e Balthasar hanno applicato questo modello per valutare gli effetti della terapia anti-FcRn nell'uomo [12].

I modelli sopra menzionati per l'assorbimento sottocutaneo di anticorpi monoclonali presentano diversi limiti. I modelli ibridi a causa delle loro componenti compartimentali, sono meno adatti per la traduzione da preclinica a clinica, né consentono predizioni delle concentrazioni di farmaci nei siti d'azione. I modelli farmacocinetici basati sulla fisiologia dell'intero organismo non tengono conto di alcuni importanti processi fisiologici coinvolti nel trasporto di anticorpi monoclonali, non predicono la biodisponibilità sottocutanea degli anticorpi e non incorporano le proprietà biofisiche dell'anticorpo monoclonale per predire l'assorbimento sottocutaneo e la farmacocinetica plasmatica.

Alcuni degli autori hanno anche proposto l'approccio farmacocinetico fisiologico minimo per eliminare la complessità associata ai modelli [3]. Sebbene questi modelli possano essere utili per una comprensione meccanicistica dei processi di clearance e assorbimento nel sito di iniezione sottocutanea e nel sistema linfatico, l'uso di modelli farmacocinetici fisiologici per la previsione farmacocinetica delle proteine terapeutiche è limitato. Nel complesso, il modello minimo proposto può essere utilizzato per la comprensione meccanicistica dell'assorbimento degli anticorpi monoclonali e la previsione della farmacocinetica fisiologica dopo somministrazione sottocutanea.

1.5 Obiettivi e contenuti della tesi

La farmacocinetica è un ramo della farmacologia che analizza le modalità di assorbimento, distribuzione, trasformazione biologica ed eliminazione dei farmaci da parte dell'organismo [13].

Utilizzando fatti noti sulla farmacocinetica si può raggiungere un obiettivo clinico mediante un'opportuna scelta della dose, della modalità e del sito di somministrazione, della formulazione del farmaco e del suo veicolo tra quelli disponibili (una particolare concentrazione di un farmaco in una particolare parte del corpo). Di conseguenza, ogni nuova molecola e ogni nuovo preparato di interesse farmacologico devono essere studiati per le loro proprietà farmacocinetiche, ma rimane comunque importante lo studio critico di vecchi metodi per valutarne la validità e l'applicabilità ai nuovi farmaci e alle nuove formulazioni. Per la progettazione e lo sviluppo di un farmaco è quindi fondamentale la farmacocinetica, che trova la sua forza proprio nel metodo sperimentale e nella creazione di modelli.

Vista l'elevata potenzialità della terapia a base di anticorpi monoclonali, la ricerca in quest'ambito è in costante sviluppo, nel tentativo di individuare molecole sempre più efficaci e con meno effetti collaterali possibili. L'obiettivo di questo lavoro sarà proprio lo studio e la descrizione di due modelli farmacocinetici degli anticorpi monoclonali, uno cosiddetto minimo, che utilizza solo due compartimenti, e l'altro basato invece sulla fisiologia dell'intero organismo.

Nel Capitolo 2 vengono presentati i modelli farmacocinetici e i metodi utilizzati per la loro messa a punto, nonché i dati impiegati negli studi. Nel Capitolo 3 sono presenti i risultati più rilevanti ottenuti da queste analisi, mentre nel Capitolo 4 sono riassunte le conclusioni.

CAPITOLO 2

METODI E MODELLI DELLA CINETICA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

In questo capitolo si illustrano i principali metodi e modelli matematici proposti in letteratura per descrivere la cinetica degli anticorpi monoclonali.

Il primo è il modello farmacocinetico fisiologico minimo, che permette una comprensione meccanicistica dei processi di clearance e di assorbimento nel sito di iniezione sottocutanea e nel sistema linfatico; il suo approccio “minimo” elimina la complessità associata ai modelli a livello di organismo, come ad esempio quello proposto in seguito.

Il secondo, infatti, è il modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo, il quale fornisce una piattaforma che serve a caratterizzare e prevedere la cinetica plasmatica degli anticorpi monoclonali in seguito alla loro somministrazione sottocutanea nell'uomo.

2.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo

2.1.1 Introduzione

In [14], è stato utilizzato un modello farmacocinetico fisiologico minimo per comprendere il transito sequenziale degli anticorpi monoclonali e per stimare la clearance linfatica utilizzando la farmacocinetica sottocutanea.

Il modello è stato costruito utilizzando parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea, al sistema linfatico e ai dati clinici di farmacocinetica per via endovenosa. La farmacocinetica endovenosa (35 profili) e sottocutanea (37 profili) di 10 anticorpi monoclonali è stata ottenuta dalla letteratura e digitalizzata utilizzando WebPlotDigitizer (versione 4.1). I profili farmacocinetici per via endovenosa sono stati utilizzati per stimare i parametri del modello a 2 compartimenti, mentre i profili farmacocinetici sottocutanei sono stati utilizzati per stimare la clearance tronco-linfonodale linfatica.

Dopo l'iniezione sottocutanea, l'anticorpo monoclonale viaggia attraverso la rete capillare linfatica, i linfonodi, i tronchi linfatici e il dotto linfatico toracico prima di unirsi alla circolazione sistemica. Quindi, in questo modello, gli organi linfatici sono stati incorporati nel modello farmacocinetico fisiologico minimo e la clearance tronco-linfonodale linfatica è stata stimata utilizzando la farmacocinetica sottocutanea. Sarà interessante notare come la clearance tronco-linfonodale linfatica stimata sia direttamente proporzionale al punto isoelettrico dell'anticorpo monoclonale. Inoltre, il modello potrà essere combinato in futuro con i dati di proteolisi in vitro ottenuti dal sistema linfatico per prevedere la farmacocinetica sottocutanea e la biodisponibilità degli anticorpi monoclonali.

La variabilità nella farmacocinetica in differenti popolazioni e condizioni patologiche, dovuta alla formulazione, a nuove tecnologie di somministrazione e proprietà biofisiche delle proteine terapeutiche può essere affrontata utilizzando proprio il modello farmacocinetico fisiologico minimo.

Nel complesso, il modello proposto può essere utilizzato per la comprensione meccanicistica dell'assorbimento di anticorpi monoclonali e la previsione della farmacocinetica dopo la somministrazione sottocutanea.

2.1.2 Stima dei parametri e analisi di sensitività

Per la stima dei parametri farmacocinetici per via endovenosa del modello a 2 compartimenti è stato utilizzato un modello non lineare a effetti misti con algoritmo stocastico EM. La clearance del tronco-linfonodale linfatico è stata stimata utilizzando o il modello non lineare a effetti misti con algoritmo stocastico EM o un solutore non lineare dei minimi quadrati. L'analisi di sensitività è stata eseguita sui parametri fisiologici, sui parametri correlati agli anticorpi monoclonali e sui parametri stimati. I parametri sono stati modificati di 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 3, 5, 7, 10, 50 e 100 volte rispetto ai valori originali come indicato nella Tabella 2.1. Il coefficiente di riflessione linfatica è stato alterato di 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 volte rispetto al valore del parametro originale per determinare il suo impatto sulla farmacocinetica degli anticorpi monoclonali.

2.1.3 Costruzione del modello farmacocinetico fisiologico minimo

Il modello farmacocinetico fisiologico minimo è stato costruito utilizzando SimBiology (Matlab R2017a). Il modello fisiologico e il modello compartimentale semplice sono stati combinati per descrivere l'assorbimento di anticorpi monoclonali dopo una somministrazione sottocutanea (Figura 2.1). Le equazioni che descrivono il legame e il trasferimento del recettore FcRn attraverso lo spazio interstiziale, endosomiale e vascolare sono state adottate da studi pubblicati in precedenza. Ulteriori parametri fisiologici relativi al sistema linfatico sono stati calcolati o ottenuti dalla letteratura (Tabella 2.2) e utilizzati per costruire il modello. I parametri del modello specifici per gli anticorpi monoclonali sono elencati nella Tabella 2.3. Inoltre, sono stati inclusi compartimenti aggiuntivi per descrivere il trasferimento sequenziale degli anticorpi monoclonali attraverso il sistema linfatico ed è stato assunto che la dose sottocutanea di anticorpi monoclonali si distribuisca equamente nello spazio interstiziale sottocutaneo dopo l'iniezione.

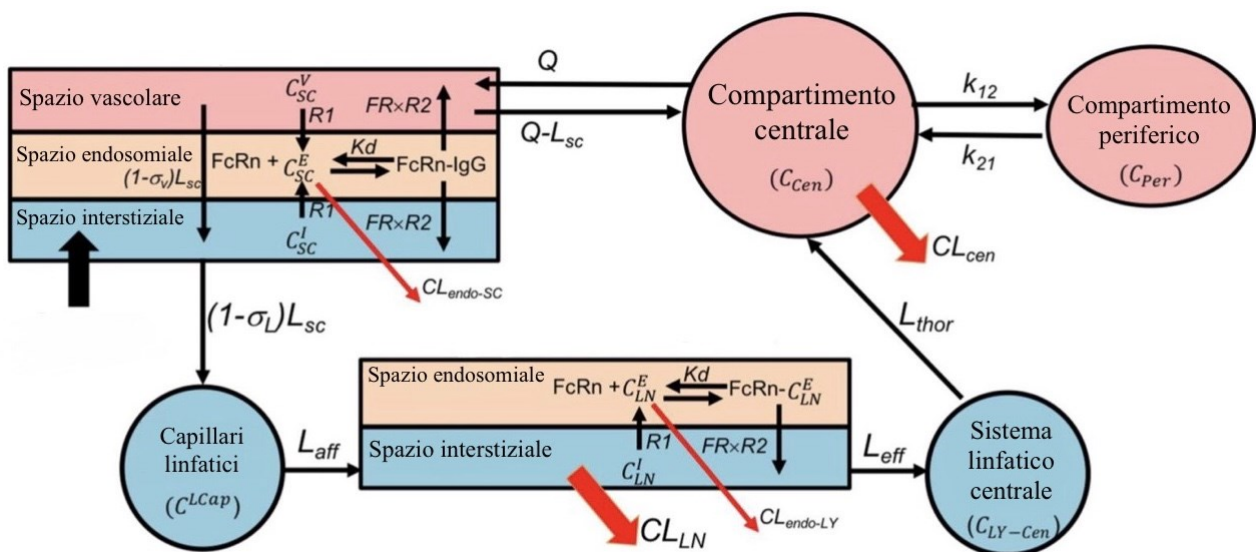


Figura 2.1. Schema del modello farmacocinetico fisiologico minimo per l'assorbimento degli anticorpi monoclonali in seguito ad una iniezione sottocutanea. Adattata da [14]

2.1.4 Parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico

I parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico sono stati ottenuti o calcolati dalla letteratura (Tabella 2.2). Il volume del sito di iniezione sottocutanea è stato calcolato da Gill et al. [9] utilizzando il diametro del deposito di iniezione sottocutanea di immunoglobuline G, IgG, radiomarcate (un tipo di anticorpi). Invece il flusso linfatico del sito sottocutaneo è stato misurato utilizzando il tasso di perdita di IgG radiomarcato dal sito di somministrazione sottocutanea. Il volume capillare linfatico è stato calcolato utilizzando la distanza media tra il sito di iniezione e il linfonodo sentinella (30 cm), la densità della rete linfatica per 1 cm di anello della pelle del braccio (385 cm) e il raggio medio dei capillari linfatici (0.0274 mm). Il flusso linfatico afferente è stato calcolato utilizzando la portata linfatica riportata (40 mm/min) e il raggio dei capillari linfatici nell'uomo (0.0274 mm). Per quanto riguarda la velocità del flusso linfatico efferente, nel modello è stata utilizzata quella degli ovini. Il volume del tronco linfatico è stato calcolato sulla base di una lunghezza approssimativa di 30 cm e di un raggio di 1 mm [15]. Il volume totale dei linfonodi è stato calcolato in base al numero di linfonodi (da 45 a 50) a cui è esposto l'anticorpo monoclonale dopo l'iniezione sottocutanea nella coscia. Il volume medio dei linfonodi cervicali (0.292 ml) riportato nell'uomo è stato utilizzato per calcolare il volume totale dei linfonodi dopo l'iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio, nell'addome e nella coscia.

L'iniezione sottocutanea di proteine terapeutiche nella coscia farebbe sì che queste passassero attraverso i linfonodi inguinali, iliaci e lombari (Figura 2.3). Invece, se si facesse l'iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio, le proteine terapeutiche passerebbero attraverso i linfonodi cubitali e ascellari seguiti dal tronco succlavio. Dopo essere passate attraverso i linfonodi e i tronchi linfatici, si unirebbero al sistema linfatico centrale (dotto toracico e cisterna del chilo), che sono vasi linfatici di diametro maggiore.

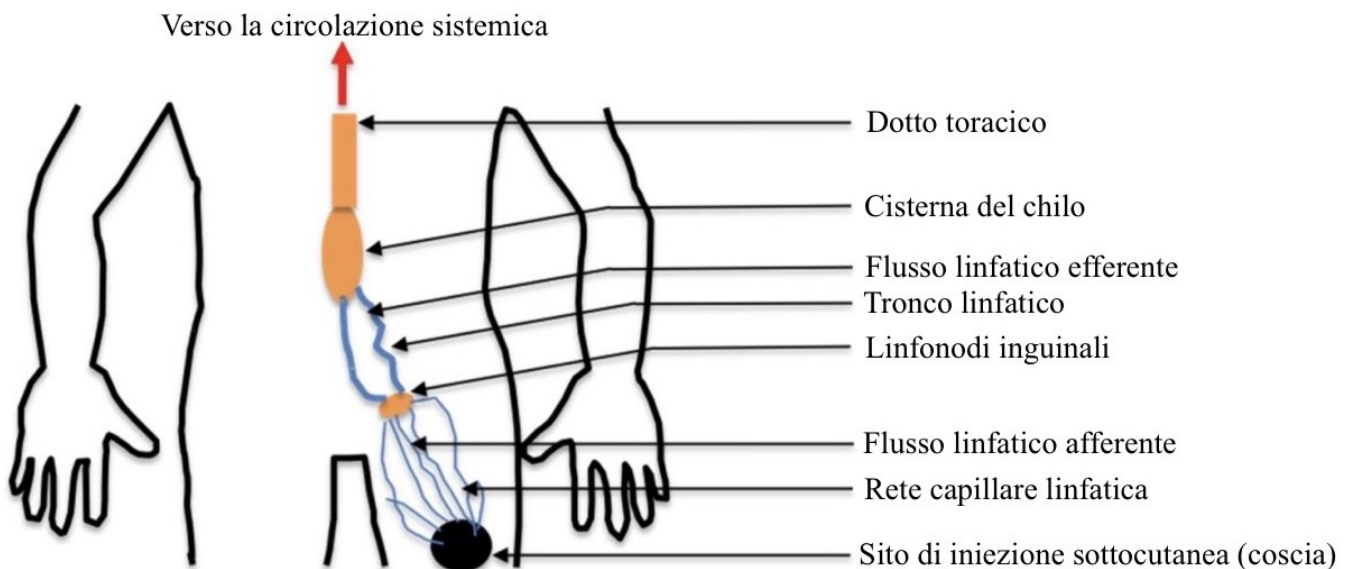


Figura 2.2. *Rappresentazione schematica del flusso di anticorpi monoclonali o di proteine terapeutiche dopo iniezione sottocutanea nella coscia. Adattata da [14]*

Le proteine terapeutiche si unirebbero poi alla circolazione sistemica attraverso il dotto toracico se il sito di iniezione sottocutanea fosse la parte superiore del braccio sinistro, mentre le iniezioni nella

parte superiore del braccio destro entrerebbero attraverso il dotto toracico destro o il dotto linfatico toracico (Figura 2.3). In alternativa, dopo l'iniezione sottocutanea addominale, le proteine terapeutiche generalmente passerebbero attraverso i linfonodi inguinali, iliaci e lombari verso la cisterna del chilo e il dotto toracico, per entrare nella circolazione sanguigna sistemica attraverso la vena succlavia. La struttura anatomica del sistema linfatico è nota ed è stata utilizzata per definire il trasferimento sequenziale degli anticorpi monoclonali [16].

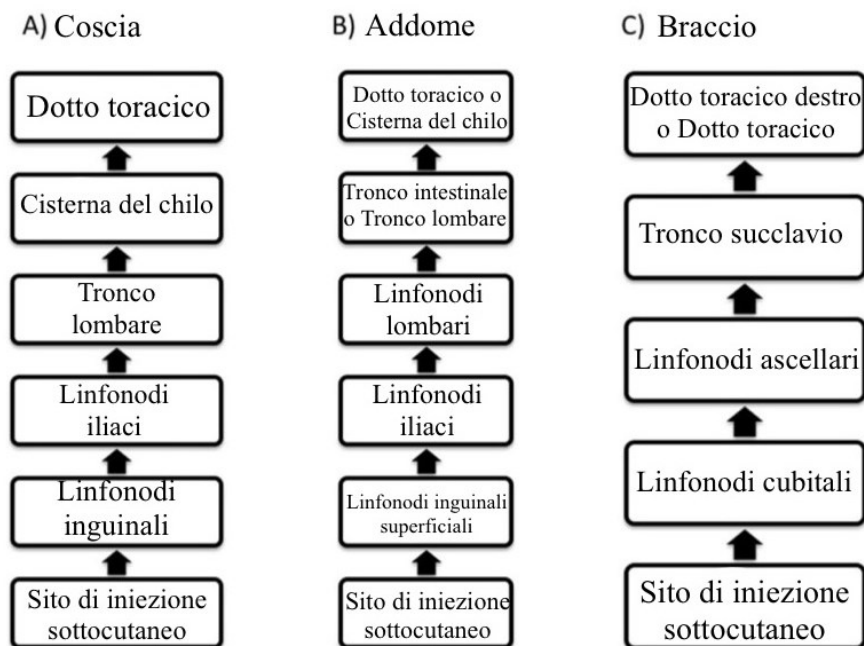


Figura 2.3. *Trasferimento sequenziale degli anticorpi monoclonali verso la circolazione sistemica dopo l'iniezione sottocutanea in A) coscia, B) addome e C) parte superiore del braccio. Adattata da [14]*

I volumi del tronco linfatico e dei linfonodi sono stati combinati per calcolare il volume interstiziale del tronco linfatico. Il volume endosomiale totale dei linfonodi è stato calcolato in base al volume endosomiale in una cellula mononucleare periferica e al numero di linfociti in un linfonodo. Si è scoperto come il volume endosomiale dei linfonodi e il volume interstiziale del tronco linfatico per vari siti di iniezione sottocutanea (coscia, addome e parte superiore del braccio) siano approssimativamente simili (Tabella 2.2).

Il volume del sistema linfatico centrale dipende dal sito di iniezione sottocutanea. In caso di iniezione sottocutanea alla coscia, all'addome o alla parte superiore del braccio sinistro, le proteine terapeutiche passerebbero attraverso il dotto linfatico toracico. Nel caso di iniezioni alla coscia e all'addome, il volume della cisterna del chilo dovrebbe essere compreso nel volume linfatico centrale. Per questo modello, si presumeva che il sito di iniezione sottocutanea fosse la coscia o l'addome, pertanto il volume del dotto toracico e della cisterna del chilo erano inclusi nel volume linfatico centrale. Tuttavia, il volume del sistema linfatico centrale dopo l'iniezione nella parte superiore del braccio o della coscia è risultato simile, poiché il volume della cisterna del chilo è trascurabile rispetto al volume del dotto toracico (Tabella 2.2). I volumi del dotto linfatico toracico e della cisterna del chilo sono stati calcolati sulla base di valori di letteratura di lunghezza e diametro. Nel caso del dotto

linfatico toracico, la lunghezza e il diametro erano rispettivamente di 45 e 5 cm. Mentre, nel caso della cisterna del chilo, la lunghezza e il diametro erano rispettivamente di 2-5 mm e 1 cm.

2.1.5 Equazioni del modello

$$(1) V_{SC}^I \left(\frac{dC_{SC}^I}{dt} \right) = ((1 - \sigma_v) \times L_{SC} \times C_{SC}^V) - (R1 \times C_{SC}^V) + ((1 - FR) \times R2 \times (1 - f_{uSC}) \times C_{SC}^E) - ((1 - \sigma_L) \times L_{SC} \times C_{SC}^1)$$

$$(2) V_{SC}^V \left(\frac{dC_{SC}^V}{dt} \right) = ((1 - \sigma_v) \times L_{SC} \times C_{SC}^V) - ((Q_{SC} - L_{SC}) \times C_{SC}^V) + (FR \times R2 (1 - f_{uSC}) \times C_{SC}^E) - (R1 \times C_{SC}^V) + (Q_{SC} \times C_{Cen})$$

$$(3) V_{SC}^E \left(\frac{dC_{SC}^E}{dt} \right) = (R1 \times C_{SC}^1) - (FR \times R2 \times (1 - f_{uSC}) \times C_{SC}^E) - ((1 - FR) \times R2 \times (1 - f_{uSC}) \times C_{SC}^E) + (R1 \times C_{SC}^V) - ((1 - f_{uSC}) \times CL_{En} \times C_{SC}^E)$$

$$(4) V^{LCap} \left(\frac{dC^{LCap}}{dt} \right) = ((1 - \sigma_L) \times L_{SC} \times C^{LCap}) - (L_{Aff} \times C^{LCap})$$

$$(5) V_{LN}^I \left(\frac{dC_{LN}^I}{dt} \right) = (L_{Aff} \times C_{LN}^{Cap}) - (L_{Eff} \times C_{LN}^I) - (CL_{LN} \times C_{LN}^I) - (R1 \times C_{LN}^I) + ((1 - FR) \times R2 \times (1 - f_{uLN}) \times C_{LN}^E)$$

$$(6) V_{LN}^E \left(\frac{dC_{LN}^E}{dt} \right) = (R1 \times C_{LN}^I) - ((1 - FR) \times R2 \times (1 - f_{uLN}) \times C_{LN}^E) - ((1 - f_{uLN}) \times CL_{Endo-LN} \times C_{LN}^E)$$

$$(7) V_{LN-Cen} \left(\frac{dC_{LN-C}}{dt} \right) = -(L_{Thor} \times C_{LN-C}) + (L_{Eff} \times C_{LN}^I)$$

$$(8) V_{Cen} \left(\frac{dC_{Cen}}{dt} \right) = (L_{Thor} \times C_{LN-C}) + ((Q_{SC} - L_{SC}) \times C_{SC}^V) - (CL_{Cen} \times C_{Cen}) - (K_{12} \times C_{Cen}) - (K_{21} \times C_{Per}) - (Q_{SC} \times C_{Cen})$$

$$(9) V_{Per} \left(\frac{dC_{Per}}{dt} \right) = (K_{12} \times C_{Cen}) - (K_{21} \times C_{Per})$$

$$(10) f_{uSC} = 1 - \left(\frac{1}{2 \times (C_{Endo} + C_{SC}^E)} \right) \times \left((K_d + nPt + C_{Endo} + C_{SC}^E) - \left(\sqrt{(K_d + nPt + C_{Endo} + C_{SC}^E)^2 - (4 \times (C_{Endo} + C_{SC}^E) \times nPt)} \right) \right)$$

$$(11) f_{uLN} = 1 - \left(\frac{1}{2 \times (C_{Endo} + C_{LN}^E)} \right) \times \left((K_d + nPt + C_{Endo} + C_{LN}^E) - \left(\sqrt{(K_d + nPt + C_{Endo} + C_{LN}^E)^2 - (4 \times (C_{Endo} + C_{LN}^E) \times nPt)} \right) \right)$$

Tabella 2.1 Descrive i parametri del modello

Parametro	Definizione
V_{SC}^I	Volume interstiziale nel sito di iniezione sottocutanea
V_{SC}^E	Volume endosomiale nel sito di iniezione sottocutanea
V_{SC}^V	Volume vascolare nel sito di iniezione sottocutanea
V^{LCap}	Volume dei capillari linfatici
V_{LY-UA}^I	Volume interstiziale combinato del tronco linfatico e dei linfonodi dopo l'iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio
V_{LY}^I	Volume interstiziale combinato del tronco linfatico e dei linfonodi dopo l'iniezione sottocutanea nella coscia
V_{LY-Ab}^I ^a	Volume interstiziale combinato del tronco linfatico e dei linfonodi dopo l'iniezione sottocutanea nell'addome
V_{LY-UA}^E ^a	Volume endosomiale combinato di tutti i linfonodi a cui è esposto l'anticorpo monoclonale dopo l'iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio
V_{LY}^E	Volume endosomiale combinato di tutti i linfonodi a cui è esposto l'anticorpo monoclonale dopo l'iniezione sottocutanea nella coscia
V_{LY-Ab}^E	Volume endosomiale combinato di tutti i linfonodi a cui è esposto l'anticorpo monoclonale dopo l'iniezione sottocutanea nell'addome
V_{LY-Cen}	Volume del sistema linfatico centrale
V_{Thor} ^b	Volume del dotto linfatico toracico
V_{CC} ^b	Volume della cisterna del chilo
L_{SC}	Flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutanea
L_{Aff}	Flusso linfatico afferente ai linfonodi (nell'uomo)
L_{Eff}	Flusso linfatico efferente ai linfonodi (nelle pecore)
L_{Thor}	Flusso linfatico del dotto toracico
Q_{SC}	Flusso sanguigno nel sito di iniezione sottocutanea
C_{Endo}	Concentrazione di anticorpi monoclonali endogeni nel compartimento endosomiale

Kd	Costante di dissociazione per il legame dell'anticorpo FcRn
nPt	Concentrazione di FcRn nel tessuto sottocutaneo o nei linfonodi
σ_V	Coefficiente di riflessione vascolare
σ_L	Coefficiente di riflessione linfatica
R1	Tasso di assorbimento endosomiale dell'anticorpo
R2	Tasso di ritorno endosomiale dell'anticorpo
FR	Frazione di riciclaggio dell'anticorpo monoclonale legato a FcRn
$CL_{Endo-SC}^a$	Clearance endosomiale dell'anticorpo monoclonale nel sito di iniezione sottocutanea
$CL_{Endo-LN}^b$	Clearance endosomiale dell'anticorpo monoclonale nei linfonodi

2.1.6 Validazione del modello

Il modello è stato validato confrontando i profili farmacocinetici osservati e quelli previsti dopo una somministrazione sottocutanea di anticorpi monoclonali. Inoltre, l'accuratezza delle previsioni è stata valutata tracciando i rapporti di $T_{max-osservato}/T_{max-previsto}$, $C_{max-osservata}/C_{max-prevista}$ con il punto isoelettrico, la clearance del tronco-linfonodale linfatico e la biodisponibilità. I valori della biodisponibilità e del punto isoelettrico per gli anticorpi monoclonali sono stati ottenuti dalla letteratura. Nel caso di anifrolumab (un anticorpo monoclonale umano di immunoglobulina G1 kappa, IgG1 κ , per il trattamento di pazienti adulti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) attivo), il valore del punto isoelettrico è stato stimato utilizzando la sequenza di amminoacidi e ProtParam, uno strumento web [42].

Tabella 2.2 Parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico

Parametro	Valore
V_{SC}^I	0.003115 L
V_{SC}^E	0.000025 L
V_{SC}^V	0.00025 L
V^{LCap}	0.00033 L
V_{LY-UA}^I	0.01408 L
V_{LY}^I	0.01349 L
V_{LY-Ab}^I ^a	0.01758 L
V_{LY-UA}^E ^a	0.000014 mL
V_{LY}^E	0.0000126 mL
V_{LY-Ab}^E	0.00001596 mL
V_{LY-Cen}	0.00888 L

V_{Thor}^b	0.00884 L
V_{CC}^b	0.000039 L
L_{SC}	0.0001356 L/h
L_{Aff}	0.00000564 L/h
L_{Eff}	0.00387 L/h
L_{Thor}	0.06 L/h
Q_{SC}	0.04992 L/h
C_{Endo}	10000 mg/L
Kd	45.36 mg/L
nPt	2880 mg/L

^a Non usato nel modello (la coscia è stata assunta come sito di iniezione sottocutanea)

^b Usato per calcolare il volume linfatico centrale totale

Tabella 2.3 Parametri correlati agli anticorpi monoclonali utilizzati nel modello farmacocinetico fisiologico minimo

Parametro	Valore
σ_V	0.95
σ_L	0.2
R1	0.00000926 /h
R2	0.26 /h
FR	0.715
$CL_{Endo-SC}^a$	0.003675 L/h
$CL_{Endo-LY}^b$	0.0001254 L/h

^a La clearance endosomiale della pelle è stata assunta simile a quella del sito di iniezione sottocutanea

^b La clearance endosomiale della milza è stata assunta simile a quella tronco-linfonodale linfatica

2.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo

2.2.1 Introduzione

In quest'altro studio [17], è stato modificato ed esteso il precedente modello farmacocinetico basato sull'intero organismo per gli anticorpi monoclonali somministrati per via endovenosa [11] per includere una rappresentazione meccanicistica della degradazione pre-sistemica, del traffico e dell'assorbimento degli anticorpi monoclonali nel sito di iniezione sottocutanea. Il modello incorpora anche una metrica basata sulla carica locale delle regioni complementari all'anticorpo monoclonale per spiegare le differenze tra gli anticorpi monoclonali nei processi di trasporto, nonché la loro degradazione nel sito sottocutaneo. Per ciascun organo, il modello rappresenta lo scambio transcapillare utilizzando una teoria del trasporto a due pori che include il transito sequenziale e l'elaborazione dell'anticorpo monoclonale nello spazio endosomiale delle cellule endoteliali. Il modello per il sistema linfatico centrale include linfonodi concentrati e compartimenti dei vasi linfatici (quest'ultimo include l'elaborazione degli anticorpi monoclonali delle cellule endoteliali). Un sito di campionamento periferico viene utilizzato per riflettere meglio la concentrazione misurata negli studi clinici. Per il modello del sito sottocutaneo, sono inclusi sia l'assorbimento capillare linfatico sia i processi di degradazione.

I parametri del modello specifico per gli anticorpi monoclonali sono stati stimati utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico basato sull'intero organismo, mentre i dati farmacocinetici per via endovenosa sono stati ottenuti da 20 anticorpi monoclonali e i dati farmacocinetici sottocutanei da 12 di questi anticorpi monoclonali. Le concentrazioni plasmatiche medie dopo la somministrazione endovenosa dei 20 anticorpi monoclonali elencati nella Tabella 2.4 e dopo la somministrazione sottocutanea di 12 di questi anticorpi monoclonali elencati nella Tabella 2.5 sono state digitalizzate dai dati riportati nelle pubblicazioni citate. I pesi molecolari di questi anticorpi variano da 1.42×10^5 a 1.50×10^5 g/mol. I dati della maggior parte degli anticorpi monoclonali includevano risultati a livelli di dose multipli (vedere Tabelle 2.4 e 2.5). La normalizzazione della dose dei dati farmacocinetici non ha mostrato alcuna evidente non linearità causata dalla disposizione del farmaco target-mediata (TMDD). Anche le concentrazioni plasmatiche medie dopo la somministrazione sottocutanea di altri quattro anticorpi monoclonali (omalizumab, tildrakizumab, ixekizumab, lanadelumab) sono state digitalizzate dalle pubblicazioni e utilizzate per un'ulteriore valutazione del modello come descritto di seguito.

Tabella 2.4 Anticorpi monoclonali con farmacocinetica plasmatica dopo somministrazione endovenosa. Vengono inoltre mostrati i parametri farmaco-specifici stimati (S_{pino} e $S_{diff-conv}$) determinati utilizzando i dati di farmacocinetica per via endovenosa per ciascun anticorpo monoclonale

mAb (abbreviazione)	Peso molecolare (g/mol x10 ⁵)	Dose	S_{pino} (RSE%)	$S_{diff-conv}$ (RSE%)
Actoxumab (Act)	1.459	1–20 mg/kg	0.627 (5.2)	1.04 (5.7)
Adalimumab (Ada)	1.442	0.25–5 mg/kg	1.19 (3.4)	1.24 (5.3)
Belimumab (Bel)	1.470	240mg	1.21 (2.6)	1.00 (10)
Canakinumab (Can)	1.452	1–3mg/kg; 600mg	0.868 (1.2)	1.15 (4.9)
Daclizumab (Dac)	1.426	200 mg; 400 mg	1.20 (1.3)	1.46 (6.6)
Enokizumab (Eno)	1.484	0.3–9 mg/kg	0.839 (2.7)	1.05 (4.7)

Figitumumab (Fig)	1.460	10 mg/kg; 20mg/kg	0.897 (2.1)	1.16 (7.6)
Gevokizumab (Gev)	1.452	0.01–3 mg/kg	0.833 (2.8)	0.823 (4.9)
GNbAC1 (GNb)	1.470	2 mg/kg; 6mg/kg	0.849 (11)	1.27 (9.6)
Golimumab (Gol)	1.469	100mg	2.14 (2.0)	1.49 (7.6)
Guselkumab (Gus)	1.436	0.03–10 mg/kg	1.43 (1.2)	1.89 (3.3)
Infliximab (Inf)	1.491	5 mg/kg	1.41 (3.4)	1.34 (9.7)
Mepolizumab (Mep)	1.492	250 mg	0.963 (2.4)	0.452 (13)
PAmAb (Pam)	1.500	1–40 mg/kg	1.13 (1.5)	0.640 (6.5)
Risankizumab (Ris)	1.456	200, 600, 1200mg	0.783 (3.2)	1.41 (5.9)
Siltuximab (Sil)	1.450	1–12 mg/kg	0.872 (11)	2.21 (5.6)
Tefibazumab (Tef)	1.476	10–20 mg/kg	1.23 (2.9)	1.62 (5.9)
Tralokinumab (Tral)	1.439	150 mg	0.936 (4.0)	0.630 (13)
Trastuzumab (Tras)	1.480	6mg/kg	1.16 (11)	0.822 (15)
Urtioxazumab (Urt)	1.446	0.1–3 mg/kg	0.742 (4.0)	0.981 (6.4)

Tabella 2.5 Anticorpi monoclonali con farmacocinetica plasmatica dopo somministrazione sottocutanea. Per ciascun anticorpo monoclonale sono anche mostrati i parametri farmacologici stimati (CL_{LymCap}^{SC} e S_{LymUpt}^{SC}) nel modello del sito del tessuto sottocutaneo determinati utilizzando dati di farmacocinetica sottocutanea

mAb (abbreviazione)	Dose	CL_{LymCap}^{SC} (RSE%) (ml/giorno)	S_{LymUpt}^{SC} (RSE%)
Adalimumab (Ada)	40 mg	0.957 (9.5)	0.166 (4.6)
Belimumab (Bel)	200, 240 mg	0.501 (15)	0.204 (3.9)
Canakinumab (Can)	150, 300 mg	0.798 (11)	0.220 (5.8)
Daclizumab (Dac)	50, 150, 300 mg	0.469 (17)	0.0904 (3.7)
Enokizumab (Eno)	1, 3, 9 mg/kg	0.441 (20)	0.301 (5.0)
Gevokizumab (Gev)	0.03, 0.3 mg/kg	0.732 (22)	0.130 (7.5)
Golimumab (Gol)	100 mg	2.72 (8.1)	0.193 (7.5)
Guselkumab (Gus)	10, 30, 100, 300 mg	3.66 (5.0)	0.283 (5.1)
Infliximab (Inf)	120 mg	0.950 (15)	0.262 (8.6)
Mepolizumab (Mep)	250 mg	0.700 (14)	0.272 (5.9)
Risankizumab (Ris)	18, 90, 300mg	1.38 (9.0)	0.217 (5.6)
Tralokinumab (Tral)	150, 300 mg	1.69 (7.4)	0.186 (5.2)

Il modello viene utilizzato per prevedere la biodisponibilità dopo una somministrazione sottocutanea, per studiare i contributi specifici del percorso relativo alla somministrazione sistemica dalla somministrazione sottocutanea e per esaminare, attraverso l'analisi di sensitività, il ruolo delle proprietà chiave coinvolte nell'assorbimento sottocutaneo.

2.2.2 Stima dei parametri e analisi di sensitività

Prima della somministrazione di anticorpi monoclonali, il modello è stato simulato per raggiungere lo stato stazionario per tutte le concentrazioni di IgG endogene. I dati di concentrazione plasmatica per ciascuno dei 20 anticorpi monoclonali somministrati per via endovenosa (Tabella 2.4) sono stati utilizzati per stimare i parametri specifici del farmaco S_{pino} e $S_{diff-conv}$. Per gli anticorpi monoclonali somministrati in dosi diverse, i dati sono stati raggruppati per ottenere un unico insieme di stime di S_{pino} e $S_{diff-conv}$ per ciascun anticorpo monoclonale. Il software ADAPT (versione 5) [18] è stato utilizzato per ottenere le stime di massima verosimiglianza per questi parametri assumendo un modello di varianza dell'errore additivo più proporzionale. L'applicazione di analisi Naïve Pooled Data (NPD) è stata utilizzata per gli anticorpi monoclonali con dati a dose multipla, mentre l'applicazione della stima individuale (ID) è stata utilizzata per gli anticorpi monoclonali con una singola dose.

Per i 12 anticorpi monoclonali per i quali erano disponibili dati sulla concentrazione plasmatica anche dopo una somministrazione sottocutanea o endovenosa (Tabella 2.5), sono stati stimati i parametri specifici del sito sottocutaneo S_{LymUpt}^{SC} e CL_{LymCap}^{SC} . Nella stima che coinvolge ciascuno di questi anticorpi monoclonali, i valori farmaco-specifici per i parametri S_{pino} e $S_{diff-conv}$ sono stati fissati ai valori stimati ottenuti dai loro dati per via endovenosa. Le stime di massima verosimiglianza di S_{LymUpt}^{SC} e CL_{LymCap}^{SC} sono state ottenute utilizzando l'applicazione NPD o ID in ADAPT, come descritto sopra per i dati endovenosi.

Per gli anticorpi monoclonali sottocutanei sono state condotte anche analisi di simulazione per quantificare il contributo alla biodisponibilità della via linfatica e della circolazione sanguigna. Inoltre, l'analisi di sensitività è stata eseguita utilizzando uno degli anticorpi monoclonali sottocutanei (Golimumab) per quantificare l'influenza del flusso linfatico sulla farmacocinetica, alterando il flusso linfatico di 0.1, 0.5, 10, 100 volte il valore originale.

2.2.3 Determinanti biofisici dei parametri del modello farmaco-specifico

Un obiettivo centrale del lavoro è determinare se le proprietà biofisiche degli anticorpi monoclonali, oltre il peso molecolare, possono essere incorporate in un modello per prevedere le caratteristiche farmacocinetiche dei diversi anticorpi monoclonali. A tal fine, abbiamo esplorato le relazioni tra i parametri farmaco-specifici stimati del modello (S_{LymUpt}^{SC} e CL_{LymCap}^{SC} per amministrazione sottocutanea e S_{pino} e $S_{diff-conv}$ sia per via endovenosa che sottocutanea) e diverse caratteristiche biofisiche degli anticorpi monoclonali. Sono stati studiati il punto isoelettrico (pI) e altri cinque parametri in silico calcolati dalle strutture del dominio variabile dell'anticorpo monoclonale. Il pI di ciascun anticorpo monoclonale è stato calcolato con il calcolatore del punto isoelettrico delle proteine utilizzando la sequenza di amminoacidi dell'anticorpo monoclonale. Altre cinque metriche, calcolate utilizzando la piattaforma TAP, caratterizzano la lunghezza delle regioni determinanti la complementarità (CDR), le cariche nelle CDR (carica positiva, PPC e carica negativa, PNC), l'idrofobia superficiale e l'asimmetria nelle cariche superficiali nette. Quattro anticorpi monoclonali (GNbAC1, PAmAb, Tefibazumab, Urtoxazumab) senza valori disponibili per queste metriche sono stati esclusi da questa analisi.

2.2.4 Struttura del modello

Il modello si basa su quello riportato da Glassman e Balthasar [11] per descrivere la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione endovenosa. Al loro modello sono stati aggiunti un sito di somministrazione sottocutanea e un modello del sistema linfatico centrale, come illustrato in Figura 2.4. Inoltre, il modello incorpora un formalismo a due pori per descrivere lo scambio vascolare e interstiziale in ciascun tessuto come proposto da Li e Shah [19], insieme ad un sito di prelievo di sangue periferico distinto.

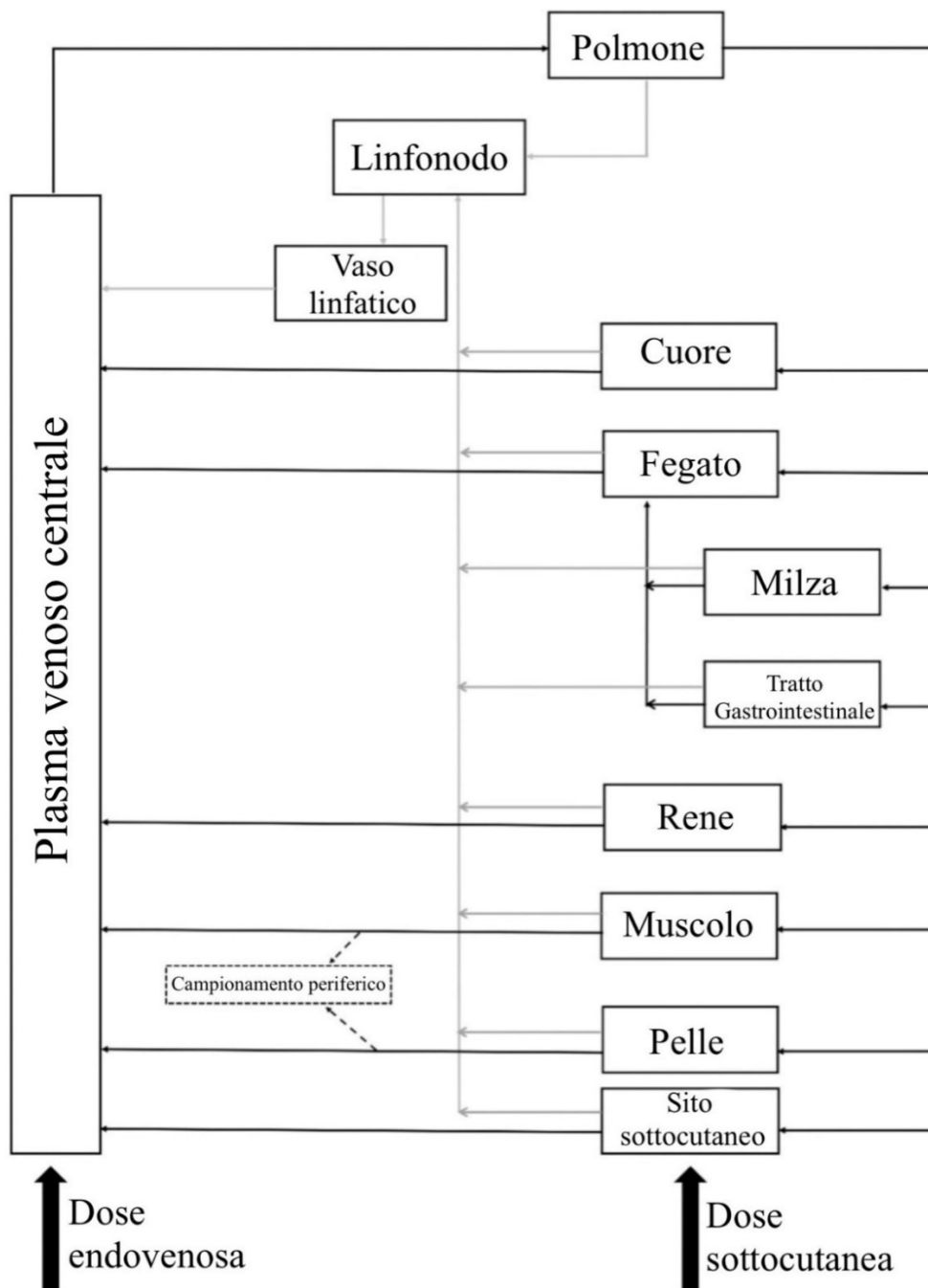


Figura 2.4. Schema della struttura del modello sviluppato per gli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione endovenosa o sottocutanea. Adattata da [17]

2.2.5 Parametri fisiologici relativi al sito di somministrazione sottocutanea

Il modello per il sito di somministrazione sottocutanea è collegato al sistema circolatorio di tutto il corpo attraverso il flusso plasmatico (Q^{SC}) e il flusso linfatico (L^{SC}) del sito di somministrazione sottocutanea. Il modello del tessuto sottocutaneo è composto da: plasma, endotelio, spazio interstiziale, sistema linfatico e cellule (Figura 2.5). Dopo una somministrazione sottocutanea, gli anticorpi monoclonali si distribuiscono all'interno della matrice extracellulare (ECM) del tessuto sottocutaneo, entrano nei capillari sanguigni e vengono trasportati ai capillari linfatici locali prima di drenare nel plasma venoso sistemico e nel sistema linfatico centrale.

I processi predominanti che regolano il trasporto di IgG tra lo spazio vascolare e quello interstiziale sono la convezione, la diffusione e la pinocitosi. Il lavoro riportato in [19] ha concluso che il trasporto trans-capillare di proteine terapeutiche (da 13 a 150 kDa) tramite convezione e diffusione può essere descritto utilizzando un modello a due pori. Sulla base del modello e dei risultati presentati in [19], il trasporto di anticorpi monoclonali di 142-150 kDa potrebbe essere descritto utilizzando un modello a pori (grandi) singoli. Per generalità e per consentire future estensioni, tuttavia, in questo caso è stato incorporato il modello a due pori (Figura 2.5).

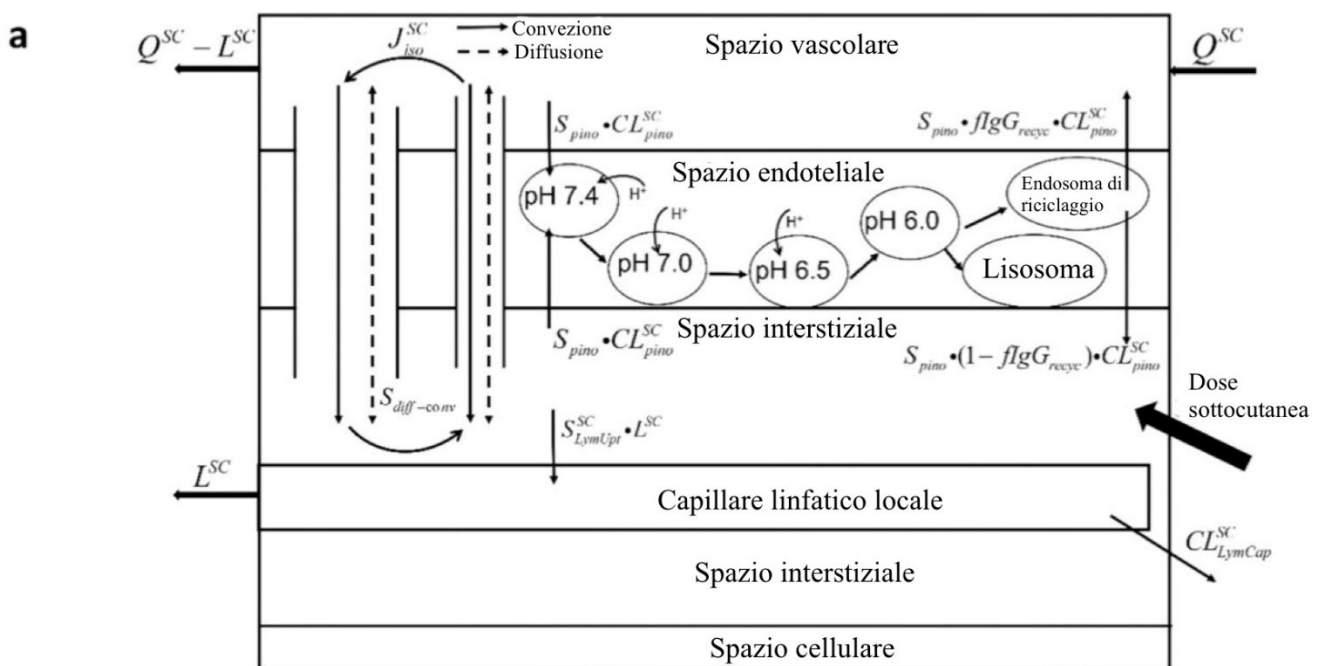


Figura 2.5. Schema del modello (a livello di organi) del tessuto sottocutaneo, include lo spazio vascolare, lo spazio endoteliale (con i sottocompartimenti endosomiali), lo spazio interstiziale e lo spazio cellulare. La dose sottocutanea viene somministrata nello spazio interstiziale, da dove gli anticorpi monoclonali possono essere drenati nei capillari linfatici locali per entrare nel sistema linfatico o possono essere assorbiti tramite la perfusione sanguigna. Adattata da [17]

Lo scambio di IgG tra lo spazio vascolare e quello interstiziale avviene anche attraverso la pinocitosi endoteliale vascolare seguita da un processo endosomiale mediato dal recettore FcRn e pH-dipendente. Per incorporare questi meccanismi e quindi rappresentare questo processo endosomiale continuo, abbiamo incluso sub-compartimenti endosomiali separati e pH-specifici. Abbiamo inoltre incluso quattro sottocompartimenti endosomiali per rappresentare il processo e lo smistamento

endosomiale, ciascuno con un valore di pH distinto compreso tra 7.4 e 6.0 (Figura 2.5). Dal quarto sottocompartimento, l'IgG viene smistato o in un pool di endosomi di riciclo da cui viene poi trasportato negli spazi vascolari e interstiziali, o in un pool di lisosomi per la degradazione proteolitica (Figura 2.5).

Date queste ipotesi, e seguendo la Figura 2.5, possono essere scritte le seguenti equazioni per descrivere le concentrazioni nello spazio vascolare sottocutaneo di IgG endogeno ($CIgG_{vasc}^{SC}$) e anticorpo monoclonale somministrato ($CmAb_{vasc}^{SC}$):

$$(12) \quad V_{vasc}^{SC} \times \frac{dCIgG_{vasc}^{SC}}{dt} = Q^{SC} \times CIgG_{vasc}^{Lung} - (Q^{SC} - L^{SC}) \times CIgG_{vasc}^{SC} - CL_{pino}^{SC} \times CIgG_{vasc}^{SC} + fIgG_{recyc} \times CL_{pino}^{SC} \times CIgG_{recyc}^{SC} - PS_L^{SC} \times (CIgG_{vasc}^{SC} - CIgG_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_L}{e^{Pe_L}-1} - PS_S^{SC} \times (CIgG_{vasc}^{SC} - CIgG_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_S}{e^{Pe_S}-1} - J_L^{SC} \times (1 - \sigma_L) \times CIgG_{vasc}^{SC} - J_S^{SC} \times (1 - \sigma_S) \times CIgG_{vasc}^{SC}$$

$$(13) \quad V_{vasc}^{SC} \times \frac{dCmAb_{vasc}^{SC}}{dt} = Q^{SC} \times CmAb_{vasc}^{Lung} - (Q^{SC} - L^{SC}) \times CmAb_{vasc}^{SC} - S_{pino} \times CL_{pino}^{SC} \times CmAb_{pino}^{SC} + S_{pino} \times fIgG_{recyc} \times CL_{pino}^{SC} \times CmAb_{recyc}^{SC} - S_{diff-conv} \times PS_L^{SC} \times (CmAb_{vasc}^{SC} - CmAb_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_L}{e^{Pe_L}-1} - S_{diff-conv} \times PS_S^{SC} \times (CmAb_{vasc}^{SC} - CmAb_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_S}{e^{Pe_S}-1} - S_{diff-conv} \times J_L^{SC} \times (1 - \sigma_L) \times CmAb_{vasc}^{SC} - S_{diff-conv} \times J_S^{SC} \times (1 - \sigma_S) \times CmAb_{vasc}^{SC}$$

I simboli per i parametri del modello e altre variabili di concentrazione sono definiti nella Tabella 2.6. Le prime righe delle equazioni (12) e (13) rappresentano la perfusione vascolare dello spazio sottocutaneo, mentre le seconde righe riflettono l'assorbimento tramite pinocitosi e la via di riciclo attraverso le cellule dell'endotelio vascolare. Le terze righe in ciascuna equazione rappresentano il trasporto di IgG e degli anticorpi monoclonali tramite diffusione attraverso pori grandi e piccoli guidati da differenze di concentrazione ($CIgG_{vasc}^{SC} - CIgG_{inter}^{SC}$) e ($CmAb_{vasc}^{SC} - CmAb_{inter}^{SC}$), mentre le quarte righe descrivono la convezione attraverso pori grandi e piccoli. I valori dei prodotti della superficie di permeabilità (PS_L^{SC} e PS_S^{SC}), numeri di Peclet (Pe_L e Pe_S), flusso linfatico (J_L^{SC} e J_S^{SC}) e coefficienti di riflessione (σ_L e σ_S) dipendono dal peso molecolare dell'anticorpo monoclonale come vedremo in seguito. Ulteriori differenze nello scambio di anticorpi monoclonali rispetto all'IgG sono state rappresentate nell'equazione (13) da fattori di scala applicati alla pinocitosi (S_{pino}) e ai processi di diffusione e convezione dei pori grandi e piccoli ($S_{diff-conv}$), seguendo l'approccio del modello farmacocinetico fisiologico per via endovenosa basato su [11]. Questi due fattori di scala farmacocinetici sono stati stimati per ciascun anticorpo monoclonale come descritto di seguito.

Nello spazio endoteliale all'interno di ciascun sottocompartimento, l'azione di massa pH-dipendente tra IgG e il recettore FcRn è stata modellata utilizzando costanti di velocità di associazione e di dissociazione pH specifiche (k_{on}^{pHx} e k_{off}^{pHx}) (Figura 3.6). Nel sottocompartimento endoteliale a pH = 7.4, le concentrazioni di $CIgG_{7.4}^{SC}$, $CIgG_{7.4}^{SC}$, $CmAb_{7.4}^{SC}$ e $CmAb_{7.4}^{SC}$ possono essere descritte dalle seguenti equazioni:

$$(14) \frac{dC_{IgG_{7.4}}^{SC}}{dt} = (CL_{pino}^{SC} \times C_{IgG_{vasc}}^{SC} + CL_{pino}^{SC} \times C_{IgG_{inter}}^{SC})/V_{endo,sub}^{SC} + K_{off}^{7.4} \times C_{IgFc_{7.4}}^{SC} - k_{on}^{7.4} \times C_{IgG_{7.4}}^{SC} \times C_{FcRn_{7.4}}^{SC} - \frac{1}{\tau} \times C_{IgG_{7.4}}^{SC}$$

$$(15) \frac{dC_{IgFc_{7.4}}^{SC}}{dt} = k_{on}^{7.4} \times C_{IgG_{7.4}}^{SC} \times C_{FcRn_{7.4}}^{SC} - k_{off}^{7.4} \times C_{IgFc_{7.4}}^{SC} - \frac{1}{\tau} \times C_{IgFc_{7.4}}^{SC}$$

$$(16) \frac{dC_{mAb_{7.4}}^{SC}}{dt} = (S_{pino} \times CL_{pino}^{SC} \times C_{mAb_{vasc}}^{SC} + S_{pino} \times CL_{pino}^{SC} \times C_{mAb_{inter}}^{SC})/V_{endo,sub}^{SC} + k_{off}^{7.4} \times C_{mAbFc_{7.4}}^{SC} - k_{on}^{7.4} \times C_{mAb_{7.4}}^{SC} \times C_{FcRn_{7.4}}^{SC} - \frac{1}{\tau} \times C_{mAb_{7.4}}^{SC}$$

$$(17) \frac{dC_{mAbFc_{7.4}}^{SC}}{dt} = k_{on}^{7.4} \times C_{mAb_{7.4}}^{SC} \times C_{FcRn_{7.4}}^{SC} - k_{off}^{7.4} \times C_{mAbFc_{7.4}}^{SC} - \frac{1}{\tau} \times C_{mAbFc_{7.4}}^{SC}$$

I parametri del modello e le variabili di concentrazione sono definiti nella Tabella 2.6. Si presume che la concentrazione del recettore FcRn in questo primo sottocompartimento endosomiale ($C_{FcRn_{pH7.4}}^{SC}$) sia costante e pari a 3.3×10^4 nm. Le prime righe delle equazioni (14) e (16) rappresentano l'assorbimento tramite pinocitosi di IgG libere o di anticorpi monoclonali liberi dagli spazi vascolari e interstiziali del sito sottocutaneo, mentre i primi due termini delle seconde righe di queste equazioni riflettono l'interazione tra il recettore FcRn e le IgG. Le seconde righe delle equazioni (14) e (16) rappresentano il transito delle IgG nel sottocompartimento successivo. Nelle equazioni (15) e (17), i primi due termini rappresentano l'interazione tra le IgG, il recettore FcRn e il complesso anticorpo monoclonale-FcRn, mentre gli ultimi termini rappresentano il transito del complesso IgG-FcRn e del complesso anticorpo monoclonale-FcRn nel sottocompartimento successivo.

b

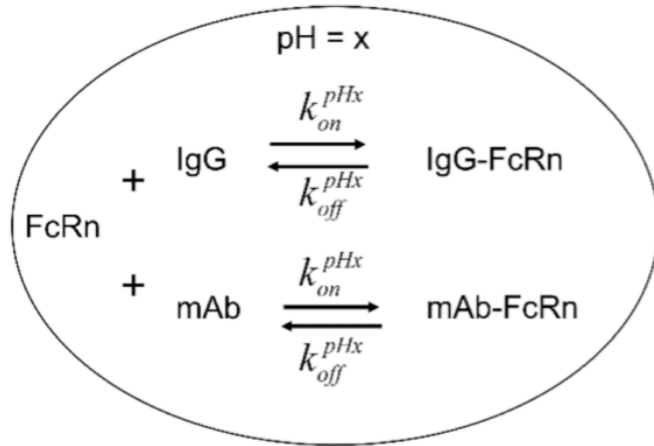


Figura 2.6. Schema del modello (a livello di organi) dei sottocompartimenti endosomiali, dove avviene l'interazione tra il recettore FcRn e le IgG a un certo valore di pH (x). Adattata da [17]

Le seguenti equazioni descrivono le concentrazioni corrispondenti per ciascuna specie nel sottocompartimento endoteliale a pH=7.0:

$$(18) \frac{dCIgG_{7.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{7.0} \times CIgFc_{7.0}^{SC} - k_{on}^{7.0} \times CIgG_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CIgG_{7.4}^{SC} - CIgG_{7.0}^{SC})$$

$$(19) \frac{dCIgFc_{7.0}^{SC}}{dt} = k_{on}^{7.0} \times CIgG_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} - k_{off}^{7.0} \times CIgFc_{7.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CIgFc_{7.4}^{SC} - CIgFc_{7.0}^{SC})$$

$$(20) \frac{dCmAb_{7.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{7.0} \times CmAbFc_{7.0}^{SC} - k_{on}^{7.0} \times CmAb_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CmAb_{7.4}^{SC} - CmAb_{7.0}^{SC})$$

$$(21) \frac{dCmAbFc_{7.0}^{SC}}{dt} = k_{on}^{7.0} \times CmAb_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} - k_{off}^{7.0} \times CmAbFc_{7.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CmAbFc_{7.4}^{SC} - CmAbFc_{7.0}^{SC})$$

$$(22) \frac{dCFcRn_{pH7.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{7.0} \times CIgFc_{7.0}^{SC} - k_{on}^{7.0} \times CIgG_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} + k_{off}^{7.0} \times CmAbFc_{7.0}^{SC} - k_{on}^{7.0} \times CmAb_{7.0}^{SC} \times CFcRn_{7.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CFcRn_{pH7.4}^{SC} - CFcRn_{pH7.0}^{SC})$$

Le variabili di concentrazione e i parametri del modello sono definiti nella Tabella 2.6. I primi due termini delle equazioni (18) e (21) riflettono l'interazione del recettore FcRn e delle IgG a pH = 7.0. I restanti termini in queste equazioni rappresentano il transito delle IgG dal precedente sottocompartimento al successivo. Nell'equazione (22), le prime due linee rappresentano l'interazione del recettore FcRn con le IgG endogene e l'anticorpo monoclonale somministrato, mentre la terza linea riflette il transito attraverso il pool di recettori FcRn.

Per il sottocompartimento endoteliale a pH=6.0 si applicano le seguenti equazioni:

$$(23) \frac{dCIgG_{6.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{6.0} \times CIgFc_{6.0}^{SC} - k_{on}^{6.0} \times CIgG_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CIgG_{6.5}^{SC} - CIgG_{6.0}^{SC})$$

$$(24) \frac{dCIgFc_{6.0}^{SC}}{dt} = k_{on}^{6.0} \times CIgG_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} - k_{off}^{6.0} \times CIgFc_{6.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CIgFc_{6.5}^{SC} - CIgFc_{6.0}^{SC})$$

$$(25) \frac{dCmAb_{6.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{6.0} \times CmAbFc_{6.0}^{SC} - k_{on}^{6.0} \times CmAb_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CmAb_{6.5}^{SC} - CmAb_{6.0}^{SC})$$

$$(26) \frac{dCmAbFc_{6.0}^{SC}}{dt} = k_{on}^{6.0} \times CmAb_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} - k_{off}^{6.0} \times CmAbFc_{6.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CmAbFc_{6.5}^{SC} - CmAbFc_{6.0}^{SC})$$

$$(27) \frac{dCFcRn_{pH6.0}^{SC}}{dt} = k_{off}^{6.0} \times CIgFc_{6.0}^{SC} - k_{on}^{6.0} \times CIgG_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} + k_{off}^{6.0} \times CmAbFc_{6.0}^{SC} - k_{on}^{6.0} \times CmAb_{6.0}^{SC} \times CFcRn_{6.0}^{SC} + \frac{1}{\tau} \times (CFcRn_{pH6.5}^{SC} - CFcRn_{pH6.0}^{SC})$$

Nella Tabella 2.6 si trovano le definizioni dei simboli dei parametri delle variabili di concentrazione. Gli ultimi termini delle equazioni (23) e (25) rappresentano le IgG libere e gli anticorpi monoclonali liberi trasportati nei lisosomi per la degradazione. Gli ultimi termini delle equazioni (24) e (26) rappresentano il trasporto delle IgG legato al recettore FcRn e degli anticorpi monoclonali legati al recettore FcRn negli endosomi di riciclo.

Le seguenti equazioni descrivono le concentrazioni del complesso IgG-FcRn ($CIgFc_{recyc}^{SC}$) e del complesso anticorpo monoclonale-FcRn ($CmAbFc_{recyc}^{SC}$) nel pool di endosomi di riciclo:

$$(28) \quad \frac{dCIgFc_{recyc}^{SC}}{dt} = \frac{1}{\tau} \times CIgFc_{6.0}^{SC} - CL_{pino}^{SC} \times CIgFc_{recyc}^{SC} / V_{endo,sub}^{SC}$$

$$(29) \quad \frac{dCmAbFc_{recyc}^{SC}}{dt} = \frac{1}{\tau} \times CmAbFc_{6.0}^{SC} - S_{pino} \times CL_{pino}^{SC} \times CmAbFc_{recyc}^{SC} / V_{endo,sub}^{SC}$$

I secondi termini nelle equazioni (28) e (29) rappresentano il riciclo dei complessi IgG-FcRn e anticorpo monoclonale-FcRn negli spazi vascolari e interstiziali del sito sottocutaneo.

Dalla Figura 2.5, le seguenti equazioni possono essere scritte per descrivere le concentrazioni interstiziali delle IgG endogene ($CIgG_{inter}^{SC}$) e di anticorpo monoclonale somministrato ($CmAb_{inter}^{SC}$):

$$(30) \quad V_{inter}^{SC} \frac{dCIgG_{inter}^{SC}}{dt} = (1 - fIgG_{recyc}) \times CL_{pino}^{SC} \times CIgFc_{recyc}^{SC} - CL_{pino}^{SC} \times CIgG_{inter}^{SC} - L^{SC} \times CIgG_{inter}^{SC} + PS_L^{SC} \times (CIgG_{vasc}^{SC} - CIgG_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_L}{e^{Pe_L-1}} + PS_S^{SC} \times (CIgG_{vasc}^{SC} - CIgG_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_S}{e^{Pe_S-1}} + J_L^{SC} \times (1 - \sigma_L) \times CIgG_{vasc}^{SC} + J_S^{SC} \times (1 - \sigma_S) \times CIgG_{vasc}^{SC}$$

$$(31) \quad V_{inter}^{SC} \frac{dCmAb_{inter}^{SC}}{dt} = S_{pino} \times (1 - fIgG_{recyc}) \times CL_{pino}^{SC} \times CmAbFc_{recyc}^{SC} - S_{pino} \times CL_{pino}^{SC} \times CmAb_{inter}^{SC} - S_{LymUpt}^{SC} \times L^{SC} \times CmAb_{inter}^{SC} + S_{diff-conv} \times PS_L^{SC} \times (CmAb_{vasc}^{SC} - CmAb_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_L}{e^{Pe_L-1}} + S_{diff-conv} \times PS_S^{SC} \times (CmAb_{vasc}^{SC} - CmAb_{inter}^{SC}) \times \frac{Pe_S}{e^{Pe_S-1}} + S_{diff-conv} \times J_L^{SC} \times (1 - \sigma_L) \times CmAb_{vasc}^{SC} + S_{diff-conv} \times J_S^{SC} \times (1 - \sigma_S) \times CmAb_{vasc}^{SC}$$

Le variabili di concentrazione e i parametri del modello sono definiti nella Tabella 2.6. La concentrazione iniziale dell'anticorpo monoclonale nello spazio interstiziale sottocutaneo ($CmAb_{inter}^{SC}(0)$) è data da Dose / V_{inter}^{SC} . Nelle prime righe di queste equazioni, il terzo termine rappresenta il trasporto linfatico di IgG o anticorpi monoclonali ai capillari linfatici locali. In [20], stata dimostrata la quasi totale rimozione di primo ordine di IgG dal sito di somministrazione sottocutanea dopo un breve periodo, quindi il flusso linfatico del sito sottocutaneo è descritto utilizzando costante (L^{SC}). Le differenze nell'assorbimento linfatico degli anticorpi monoclonali rispetto alle IgG sono modellate utilizzando un fattore di scala (S_{LymUpt}^{SC}) nell'equazione (31). Altri termini corrispondono a quelli nelle equazioni precedenti.

Rispetto ai vasi sanguigni, i capillari linfatici possiedono spazi più ampi tra le cellule endoteliali, hanno diametri dei vasi maggiori e non hanno membrane basali ben definite. Pertanto, si ritiene che l'assorbimento linfatico sia il principale processo di assorbimento degli anticorpi monoclonali somministrati per via sottocutanea, considerando il loro grande peso molecolare. La degradazione degli anticorpi monoclonali si verifica nello spazio interstiziale dei siti sottocutanei, nei capillari linfatici locali e nei vasi linfatici, tramite enzimi proteolitici e/o target solubili e target della membrana cellulare. Senza informazioni quantitative sul contributo relativo delle diverse vie cataboliche in questi siti, il modello caratterizza la degradazione degli anticorpi monoclonali utilizzando un termine di clearance netta (CL_{LymCap}^{SC}) assegnato al compartimento capillare linfatico locale (Figura 2.5). Le equazioni seguenti descrivono le concentrazioni capillari linfatiche sottocutanee locali delle IgG ($CIgG^{LymCap}$) e degli anticorpi monoclonali ($CmAb^{LymCap}$):

$$(32) V^{LymCap} \frac{dCIgG^{LymCap}}{dt} = L^{SC} \times CIgG_{inter}^{SC} - L^{SC} \times CIgG^{LymCap}$$

$$(33) V^{LymCap} \frac{dCmAb^{LymCap}}{dt} = S_{LymUpt}^{SC} \times L^{SC} \times CmAb_{inter}^{SC} - L^{SC} \times CmAb^{LymCap} - CL_{LymCap}^{SC} \times CmAb^{LymCap}$$

Nella Tabella 2.6 si può vedere la definizione dei simboli dei parametri delle variabili di concentrazione. Nelle equazioni (32) e (33), i primi termini rappresentano il flusso linfatico (L^{SC}) dallo spazio interstiziale sottocutaneo, i secondi termini sono il drenaggio linfatico nel linfonodo. L'ultimo termine nell'equazione (33) è la degradazione pre-sistemica di primo ordine dell'anticorpo monoclonale con il tasso di clearance CL_{LymCap}^{SC} . Al contrario, si assume che la degradazione delle IgG endogene nel sito sottocutaneo sia trascurabile poiché rappresenta una frazione piccola della degradazione complessiva delle IgG rispetto a tutti gli altri organi e tessuti.

2.2.6 Parametri fisiologici relativi al sistema linfatico centrale

Il modello utilizzato per descrivere il sistema linfatico centrale è illustrato in Figura 2.4. Si assume che il flusso linfatico che drena tutti gli organi e i tessuti sia raccolto in un compartimento linfonodale a “grumi”. Un unico compartimento dei vasi linfatici (Figura 2.7) viene utilizzato per rappresentare tutti i vasi linfatici centrali (es. tronchi linfatici, dotto toracico, ecc.). Sulla base della precedente conferma dell'esistenza del recettore FcRn nei vasi linfatici [21], nel modello è stata inclusa anche la protezione mediata dal recettore FcRn delle IgG nell'endotelio dei vasi linfatici. Le seguenti equazioni descrivono la quantità di IgG e di anticorpi monoclonali nei linfonodi (equazioni (34) e (35)) e le loro concentrazioni nei compartimenti dei vasi linfatici (equazioni (36) e (37)):

$$(34) \frac{dAIgG_{LymNode}}{dt} = \Sigma(1 - \sigma) \times L^{organ} \times CIgG_{inter}^{organ} + L^{SC} \times CIgG^{LymCap} - k^{LymNode} \times AIgG^{LymNode}$$

$$(35) \frac{dAmAb_{LymNode}}{dt} = \Sigma(1 - \sigma) \times L^{organ} \times CmAb_{inter}^{organ} + L^{SC} \times CmAb^{LymCap} - k^{LymNode} \times AmAb^{LymNode}$$

$$(36) V^{LymVes} \frac{dCIgG^{LymVes}}{dt} = k^{LymNode} \times AIgG^{LymNode} - Q^{LymVes} \times CIgG^{LymVes} - CL_{pino}^{LymVes} \times CIgG^{LymVes} + CL_{pino}^{LymVes} \times CIgFc_{recyc}^{LymVes}$$

$$(37) V^{LymVes} \frac{dCmAb^{LymVes}}{dt} = k^{LymNode} \times AmAb^{LymNode} - Q^{LymVes} \times CmAb^{LymVes} - S_{pino} \times CL_{pino}^{LymVes} \times CmAb^{LymVes} + S_{pino} \times CL_{pino}^{LymVes} \times CmAbFc_{recyc}^{LymVes}$$

Le variabili di concentrazione e i parametri del modello sono definiti nella Tabella 2.6. Gli ultimi termini delle equazioni (34) e (35) rappresentano il transito di IgG o di anticorpi monoclonali dal compartimento linfonodale, corrispondenti ai primi termini delle equazioni (36) e (37). Il secondo termine delle equazioni (36) e (37) rappresenta il trasporto di IgG o di anticorpi monoclonali dai vasi linfatici. Le equazioni per il transito e l'elaborazione delle IgG nei sottocompartimenti endosomiali mediata dai recettori FcRn seguono le equazioni viste sopra per lo spazio endoteliale sottocutaneo.

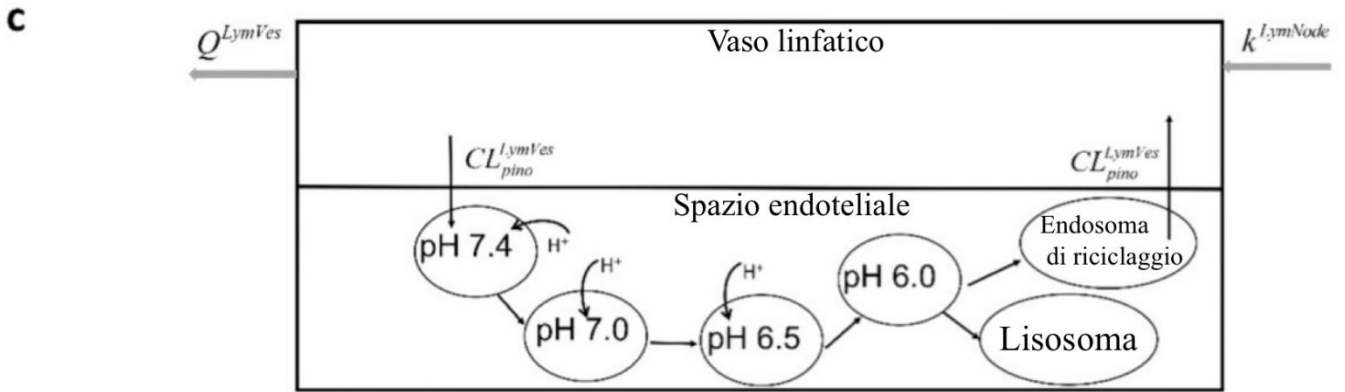


Figura 2.7. Schema del modello (a livello di organi) del vaso linfatico, suddiviso in flusso linfatico e spazio endoteliale linfatico. Adattata da [17]

2.2.7 Parametri fisiologici relativi al plasma venoso centrale

Nel modello, il compartimento plasmatico centrale rappresenta il pool venoso centrale sistemico, esclusi gli spazi vascolari nei compartimenti degli organi (Figura 2.4). La concentrazione endogena di IgG ($CIgG^{Plasma}$) e le concentrazioni di anticorpi monoclonali ($CmAb^{Plasma}$) nel plasma venoso centrale possono essere scritte:

$$(38) V^{plasma} \frac{dCIgG^{plasma}}{dt} = 1000 \times IgG0 + (Q^{liver} - L^{liver}) \times CIgG_{vasc}^{liver} + (Q^{Heart} - L^{heart}) \times CIgG_{vasc}^{heart} + (Q^{kidney} - L^{kidney}) \times CIgG_{vasc}^{kidney} + (Q^{skin} - L^{skin}) \times CIgG_{vasc}^{skin} + (Q^{muscle} - L^{muscle}) \times CIgG_{vasc}^{muscle} + (Q^{SC} - L^{SC}) \times CIgG_{vasc}^{SC} - Q^{lung} \times CIgG^{plasma} + Q^{LymVes} \times CIgG^{LymVes}$$

$$(39) V^{Plasma} \frac{dCmAb^{Plasma}}{dt} = (Q^{Liver} - L^{Liver}) \times CmAb_{vasc}^{Liver} + (Q^{Heart} - L^{Heart}) \times CmAb_{vasc} + (Q^{Kidney} - L^{Kidney}) \times CmAb_{vasc}^{Kidney} + (Q^{Skin} - L^{Skin}) \times CmAb_{vasc}^{Skin} + (Q^{Muscle} - L^{Muscle}) \times CmAb_{vasc}^{Muscle} + (Q^{SC} - L^{SC}) \times CmAb_{vasc}^{SC} - Q^{Lung} \times CmAb^{Plasma} + Q^{LymVes} \times CmAb^{LymVes} + IVmAb(t)$$

La Tabella 2.6 elenca i parametri del modello e le definizioni delle variabili. Nelle equazioni qui sopra IgG0 rappresenta la velocità di produzione di IgG endogena e IVmAb(t) è la velocità dell'infusione endovenosa.

2.2.8 Parametri fisiologici relativi al sito di campionamento periferico e agli altri organi/tessuti

Per riflettere meglio la concentrazione plasmatica di anticorpi monoclonali venosi periferici campionati, e in particolare per fare previsioni in modo rapido immediatamente dopo la somministrazione endovenosa, il modello incorpora un compartimento separato per il sito di campionamento periferico. Il campionamento periferico è composto dai contributi di pelle e muscoli (Figura 2.4) come segue: $CmAb^{peri} = 0.7 \cdot CmAb_{vasc}^{Skin} + 0.3 \cdot CmAb_{vasc}^{Muscle}$, dove $CmAb^{peri}$ è la concentrazione di anticorpi monoclonali periferici misurati, $CmAb_{vasc}^{Skin}$ è la concentrazione di anticorpi monoclonali somministrati nello spazio vascolare della pelle e $CmAb_{vasc}^{Muscle}$ è la concentrazione di anticorpi monoclonali nello spazio vascolare muscolare.

Le strutture modello di altri organi e tessuti sono le stesse presentate sopra per il tessuto sottocutaneo (Figura 2.5 ed equazioni (1) – (20)). Poiché questi organi non ricevono la somministrazione diretta di anticorpi monoclonali, la distribuzione degli anticorpi monoclonali nei capillari linfatici locali è bassa a causa del flusso linfatico significativamente più lento rispetto al plasma. Pertanto, non è stato incluso un compartimento capillare linfatico locale per questi organi.

2.2.9 Biodisponibilità prevista dal modello

Utilizzando il modello con i valori dei parametri farmaco-specifici, è stata determinata la biodisponibilità per ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali somministrati per via sottocutanea. La biodisponibilità è stata calcolata come la quantità totale della dose di anticorpo monoclonale assorbita attraverso lo spazio capillare linfatico sottocutaneo locale più la quantità totale erogata attraverso il flusso sanguigno del sito sottocutaneo, divisa per la dose sottocutanea.

$$biodisponibilità = \frac{AmAb^{LymNode} + AmAb^{Plasma}}{Dose}$$

Per gli anticorpi monoclonali somministrati a dosi differenti, la biodisponibilità è stata calcolata separatamente per ciascuna dose, con la media riportata. La biodisponibilità è stata calcolata anche dai dati medi per ciascun anticorpo monoclonale tramite un'analisi non compartimentale (NCA).

Tabella 2.6 Definizioni dei parametri e delle variabili usate nelle equazioni del modello

Parametro / variabile	Unità di misura	Definizione
t	giorni	Tempo
V^{Plasma}	ml	Volume del compartimento plasmatico centrale
$CIgG^{Plasma}$	nM	Concentrazione di IgG endogene nel compartimento plasmatico centrale
$CmAb^{Plasma}$	nM	Concentrazione di anticorpi monoclonali somministrati nel compartimento plasmatico centrale
IgG0	nmol/giorno	Tasso di produzione di IgG endogene
V_{vasc}^{Organ}	ml	Volume dello spazio vascolare
V_{inter}^{Organ}	ml	Volume dello spazio interstiziale
V_{endo}^{Organ}	ml	Volume dello spazio endosomiale
$V_{endo, sub}^{Organ}$	ml	Volume del sottocompartimento endosomiale
Q^{Organ}	ml/giorno	Flusso plasmatico
L^{Organ}	ml/giorno	Flusso linfatico
$CIgG_{vasc}^{Organ}$	nM	Concentrazione di IgG endogene nello spazio vascolare
$CmAb_{vasc}^{Organ}$	nM	Concentrazione di anticorpi monoclonali somministrati nello spazio vascolare
$CIgG_{inter}^{Organ}$	nM	Concentrazione di IgG endogene nello spazio interstiziale
$CmAb_{inter}^{Organ}$	nM	Concentrazione di anticorpi monoclonali somministrati nello spazio interstiziale
$CIgG_{pHx}^{Organ}$	nM	Concentrazione di IgG endogene libere nel sottocompartimento endosomiale con pH = x dell'endotelio vascolare
$CmAb_{pHx}^{Organ}$	nM	Concentrazione di anticorpi monoclonali liberi somministrati nel sottocompartimento endosomiale con pH = x dell'endotelio vascolare
$CIgFc_{pHx}^{Organ}$	nM	Concentrazione del complesso endogeno IgG-FcRn nel sottocompartimento endosomiale con pH = x dell'endotelio vascolare
$CmAbFc_{pHx}^{Organ}$	nM	Concentrazione del complesso anticorpo monoclonale-FcRn somministrato nel sottocompartimento endosomiale con pH = x dell'endotelio vascolare
$CIgG_{recyc}^{Organ}$	nM	Concentrazione di IgG endogene libere nell'endosoma di riciclo dell'endotelio vascolare
$CmAb_{recyc}^{Organ}$	nM	Concentrazione di anticorpi monoclonali endogeni liberi somministrati nell'endosoma di riciclo dell'endotelio vascolare
$CIgFc_{recyc}^{Organ}$	nM	Concentrazione del complesso endogeno IgG-FcRn nell'endosoma di riciclo dell'endotelio vascolare

$CmAbFc_{recyc}^{Organ}$	nM	Concentrazione del complesso anticorpo monoclonale-FcRn somministrato nell'endosoma di riciclo dell'endotelio vascolare
$CFcRn_{pHx}^{Organ}$	nM	Concentrazione di FcRn nel sottocompartimento endosomiale con pH = x dell'endotelio vascolare
$flgG_{recyc}$	-	Frazione di riciclo di IgG del complesso IgG-FcRn nello spazio vascolare
τ	giorni	Tempo di transito delle IgG attraverso i sottocompartimenti endosomiali
k_{on}^{pHx}	$nM^{-1}giorni^{-1}$	Costante di velocità di associazione tra IgG e FcRn a pH = x
k_{off}^{pHx}	$giorni^{-1}$	Costante di velocità di dissociazione tra IgG e FcRn a pH = x
V^{LymCap}	ml	Volume dei capillari linfatici locali
k^{LymCap}	$giorni^{-1}$	Costante di velocità dell'anticorpo monoclonale in uscita dal linfonodo
V^{LymVes}	ml	Volume del compartimento dei vasi linfatici
Q^{LymVes}	ml/giorno	Flusso linfatico dal compartimento dei vasi linfatici
$AIGC^{LymNode}$	pmol	Quantità di IgG endogene nel compartimento linfonodale
$AmAb^{LymNode}$	pmol	Quantità di anticorpo monoclonale somministrato nel compartimento linfonodale
$CIgG^{LymVes}$	nM	Concentrazione di IgG endogene nel compartimento dei vasi linfatici
$CmAb^{LymVes}$	nM	Concentrazione dell'anticorpo monoclonale somministrato nel compartimento dei vasi linfatici
$CIgG^{LymCap}$	nM	Concentrazione di IgG endogene nel compartimento capillare linfatico locale
$CmAb^{LymCap}$	nM	Concentrazione dell'anticorpo monoclonale somministrato nel compartimento capillare linfatico locale
σ	-	Coefficiente di riflessione linfatica
CL_{pino}^{Organ}	ml/giorno	Tasso di pinocitosi dell'endotelio vascolare
$IVmAb(t)$	pmol/giorno	Velocità di infusione endovenosa di anticorpi monoclonali
Dose	pmol	Dose sottocutanea di anticorpi monoclonali
S_{pino}	-	Fattore di scala della velocità di trasporto della pinocitosi specifico per anticorpi monoclonali
$S_{diff-conv}$	-	Fattore di scala della diffusione e del trasporto convettivo specifico per anticorpi monoclonali
CL_{LymCap}^{SC}	ml/giorni	Clearance dell'anticorpo monoclonale nei capillari linfatici del sito sottocutaneo
S_{LymUpt}^{SC}	-	Fattore di scala dell'assorbimento di anticorpi monoclonali dal sito sottocutaneo interstiziale ai capillari linfatici
σ_S	-	Coefficiente di riflessione vascolare dei pori piccoli
σ_L	-	Coefficiente di riflessione vascolare dei pori grandi

Pe_S	–	Numero di Peclet di pori piccoli
Pe_L	-	Numero di Peclet di pori grandi
PS_S^{Organ}	ml/giorno	Prodotto permeabilità-area superficiale di un piccolo poro di un organo
PS_L^{Organ}	ml/ giorno	Prodotto di permeabilità-area superficiale di un grande poro di un organo
J_{iso}^{Organ}	ml/ giorno	Flusso isogravimetrico circolare di un organo
J_S^{Organ}	ml/ giorno	Flusso linfatico attraverso piccoli pori di un organo
J_L^{Organ}	ml/ giorno	Flusso linfatico attraverso grandi pori di un organo

Tabella 2.7 Parametri fisiologici dei singoli organi/tessuti presenti nel modello

	Polmone	Cuore	Fegato	Milza
Volume vascolare V_{vasc}^{Organ}	99.90	15.00	181.0	17.00
Volume interstiziale V_{inter}^{Organ}	300.0	42.90	362.0	34.70
Volume cellulare V_{cell}^{Organ}	599.0	242.0	1270	122.0
Flusso plasmatico Q^{organ}	3.152×10^6 d	1.728×10^5	1.152×10^6	1.987×10^5
Flusso linfatico L^{organ}	3463	190.1	1267	218.6
FcRn $CFcRn_{7.4}^{Organ}$	3.300×10^4	3.300×10^4	3.300×10^4	3.300×10^4
Clearance delle IgG vascolari tramite pinocitosi CL_{pino}^{Organ}	3.306	0.9927	5.986	0.5744
Volume endosomiale V_{endo}^{Organ}	0.01240	0.003723	0.02245	0.002154

	Tratto gastrointestinale	Rene	Muscolo	Pelle	Sito sottocutaneo
Volume vascolare V_{vasc}^{Organ}	43.00	28.40	700.0	462.0	0.6200
Volume interstiziale V_{inter}^{Organ}	373.0	96.60	4560	2313d	3.115
Volume cellulare	1730	159.0	2.97×10^4	6110	8.230

V_{cell}^{Organ}					
Flusso plasmatico Q_{organ}^{organ}	6.739×10^5	9.072×10^5	5.947×10^5	3.168×10^5	2952
Flusso linfatico L_{organ}^{organ}	741.3	997.9	654.2	348.5	3.240
FcRn $CFcRn_{7.4}^{organ}$	4180	3.300×10^4	3.300×10^4	3.300×10^4	3.300×10^4
Clearance delle IgG vascolari tramite pinocitosi CL_{pino}^{organ}	7.104	0.9397	115.8	22.50	0.03961
Volume endosomiale V_{endo}^{organ}	0.02664	0.003524	0.4343	0.08438	0.0001485

Tabella 2.8 Valore dei parametri per i sistemi venoso centrale e linfatico centrale

Parametro	Valore
Sistema venoso centrale	
Q^{Plasma}	3.152×10^6
V^{Plasma}	1202
IgG0	1.540×10^4
Sistema linfatico centrale	
$V^{LymNode}$	175.2
$Q^{LymNode}$	4000
$k^{LymNode}$	23.83
V^{LymVes}	11.35
Q^{LymVes}	4000
σ	0.2

Tabella 2.9 Valori dei parametri per i processi endosomiali e per il trasporto transcapillare degli anticorpi monoclonali

Parametro	Valore
Validi per tutti gli organi, tessuti e anticorpi monoclonali	
τ	0.001875
$fIgG_{recyc}$	0.7150
$k_{on}^{6.0}$	13.42
$k_{on}^{6.5}$	1.354
$k_{on}^{7.0}$	0.6336

$k_{on}^{7.4}$	0
$k_{off}^{6.0}$	573.1
$k_{off}^{6.5}$	573.1
$k_{off}^{7.0}$	573.1
$k_{off}^{7.4}$	0
rs	4.440
rL	22.85
as	0.9580
aL	0.04200

Validi per determinati pesi molecolari (ad esempio IgG di 150 kDa)

a_e	4.810
σ_s	0.9980
σ_L	0.1800
A/A_{0s}	9.28×10^{-7}
A/A_{0l}	0.3490
P_{es}	9.820
P_{eL}	4.480

Validi per determinati pesi molecolari e per determinati organi e tessuti (ad esempio IgG di 150 kDa nel fegato)

PS_S^{Liver}	0.1560
PS_L^{Liver}	97.61
J_{iso}^{Liver}	481.5
J_S^{Liver}	732.3
J_L^{Liver}	534.7

CAPITOLO 3

RISULTATI

In questo capitolo vengono illustrati i risultati più rilevanti ottenuti dagli studi che impiegano i modelli presentati nel Capitolo 2.

3.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo

3.1.1 Stima dei parametri endovenosi del modello a 2 compartimenti

Il modello a 2 compartimenti è stato utilizzato per stimare i parametri utilizzando i dati di farmacocinetica della letteratura dopo un'iniezione endovenosa in bolo o un'infusione endovenosa (Tabella 3.1). Questi parametri sono diversi per ciascun anticorpo monoclonale e sono stati fissati nel modello farmacocinetico fisiologico minimo. Gli anticorpi monoclonali hanno un volume medio di 3.56 ± 1.11 L (media \pm deviazione standard) per il compartimento centrale e 1.81 ± 1.03 L (media \pm deviazione standard) per il compartimento periferico. I valori medi per CL_{cen} , K_{12} e K_{21} sono rispettivamente 0.015 L/h, 0.100 h^{-1} e 0.345 h^{-1} .

Tabella 3.1 I parametri del modello a 2 compartimenti per vari anticorpi monoclonali dopo somministrazione endovenosa

mAb	V_{cen} (L)	V_{per} (L)	CL_{cen} (L/h)	K₁₂ (h⁻¹)	K₂₁ (h⁻¹)
Adalimumab	3.21	2.24	0.010	0.012	0.017
Anifrolumab	2.17	3.77	0.011	0.020	0.012
Belimumab	3.05	2.39	0.010	0.016	0.021
Canakinumab	3.29	2.36	0.008	0.009	0.013
Daclizumab	5.53	1.76	0.011	0.003	0.008
Golimumab	2.33	2.33	0.015	0.013	0.013
Guselkumab	4.94	0.41	0.023	0.001	0.010
Infliximab	4.58	1.26	0.017	0.891	3.23
Tocilizumab	3.51	1.01	0.036	0.011	0.038
Trastuzumab	2.96	0.52	0.013	0.016	0.090
Media	3.56	1.81	0.015	0.099	0.345
Deviazione standard	1.11	1.03	0.008	0.278	1.01

3.1.2 Stima della clearance linfatica tronco-linfonodale

Con questo modello è stato stimato un solo parametro (la clearance linfatica tronco-linfonodale), mentre i rimanenti parametri del modello sono stati fissati utilizzando i valori della letteratura come descritto nella sezione dei metodi. La clearance rappresenta la proteolisi degli anticorpi monoclonali nello spazio interstiziale dei tronchi linfatici e dei linfonodi. Il modello è in grado di predire un totale di 37 profili farmacocinetici sottocutanei (10 anticorpi monoclonali con 26 dosi diverse), che sono stati confrontati con i dati medi osservati negli esperimenti (Figure 3.1 e 3.2). Tuttavia, nel caso di belimumab (un anticorpo monoclonale IgG1 λ umano, indicato come terapia aggiuntiva nei pazienti adulti con lupus eritematoso sistemico (LES) attivo), il profilo farmacocinetico predetto è stato ottenuto da una media geometrica dei valori della letteratura. La clearance linfatica tronco-linfonodale stimata è compresa tra 0.0001 e 0.008 L/h con una media di 0.002 L/h (da 0.001 a 0.003, intervalli di confidenza inferiori e superiori al 95% della media). I valori medi di clearance linfatica tronco-linfonodale per ciascun anticorpo monoclonale sono riportati nella Tabella 3.2.

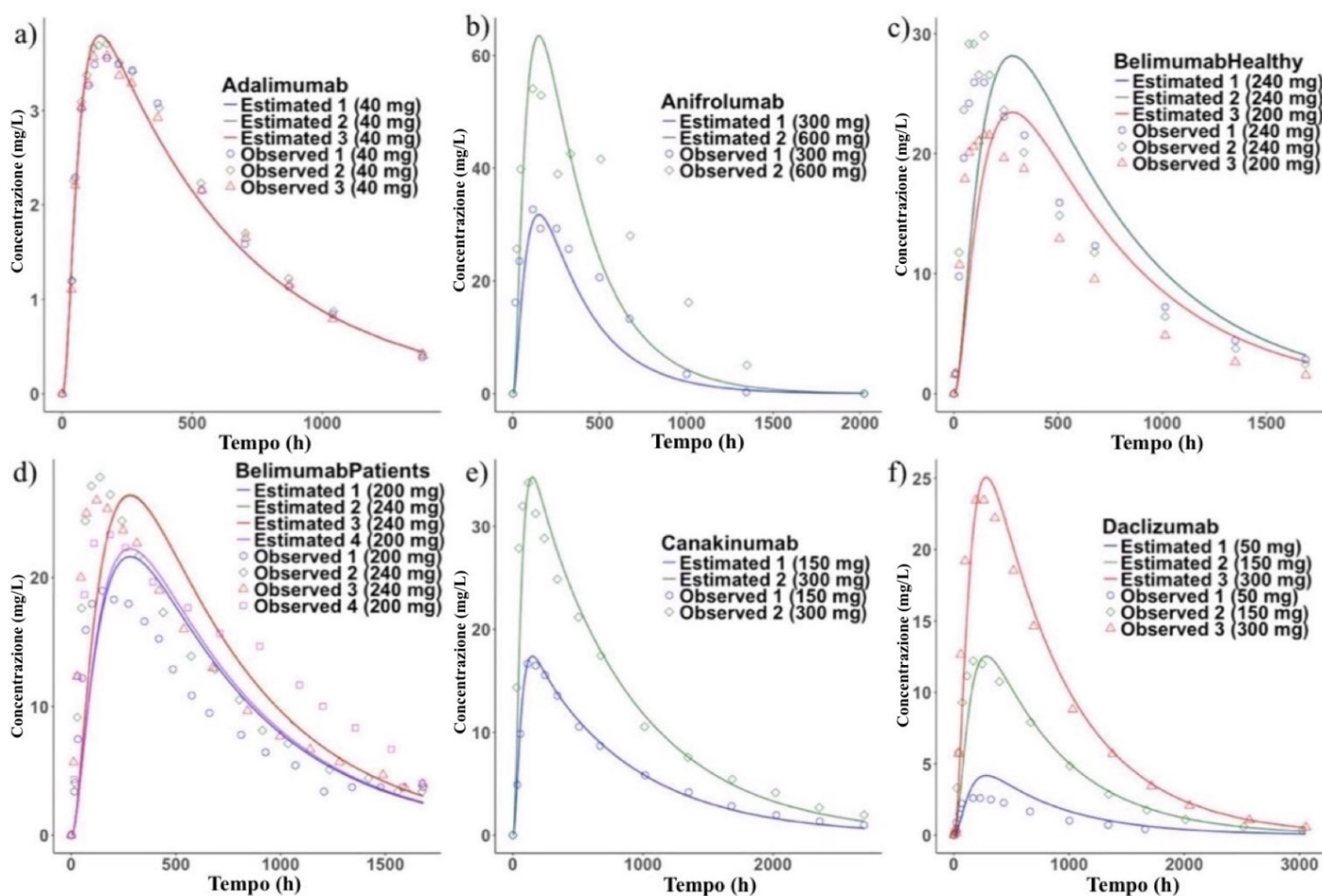


Figura 3.1 Profili farmacocinetici sottocutanei osservati (cerchi) e predetti dal modello (linea continua). a) adalimumab, b) anifrolumab, c) belimumab (sani), d) belimumab (pazienti affetti da LES attivo), e) canakinumab, f) daclizumab (i profili farmacocinetici medi osservati sono stati utilizzati per il confronto con le stime del modello). Adattata da [14]

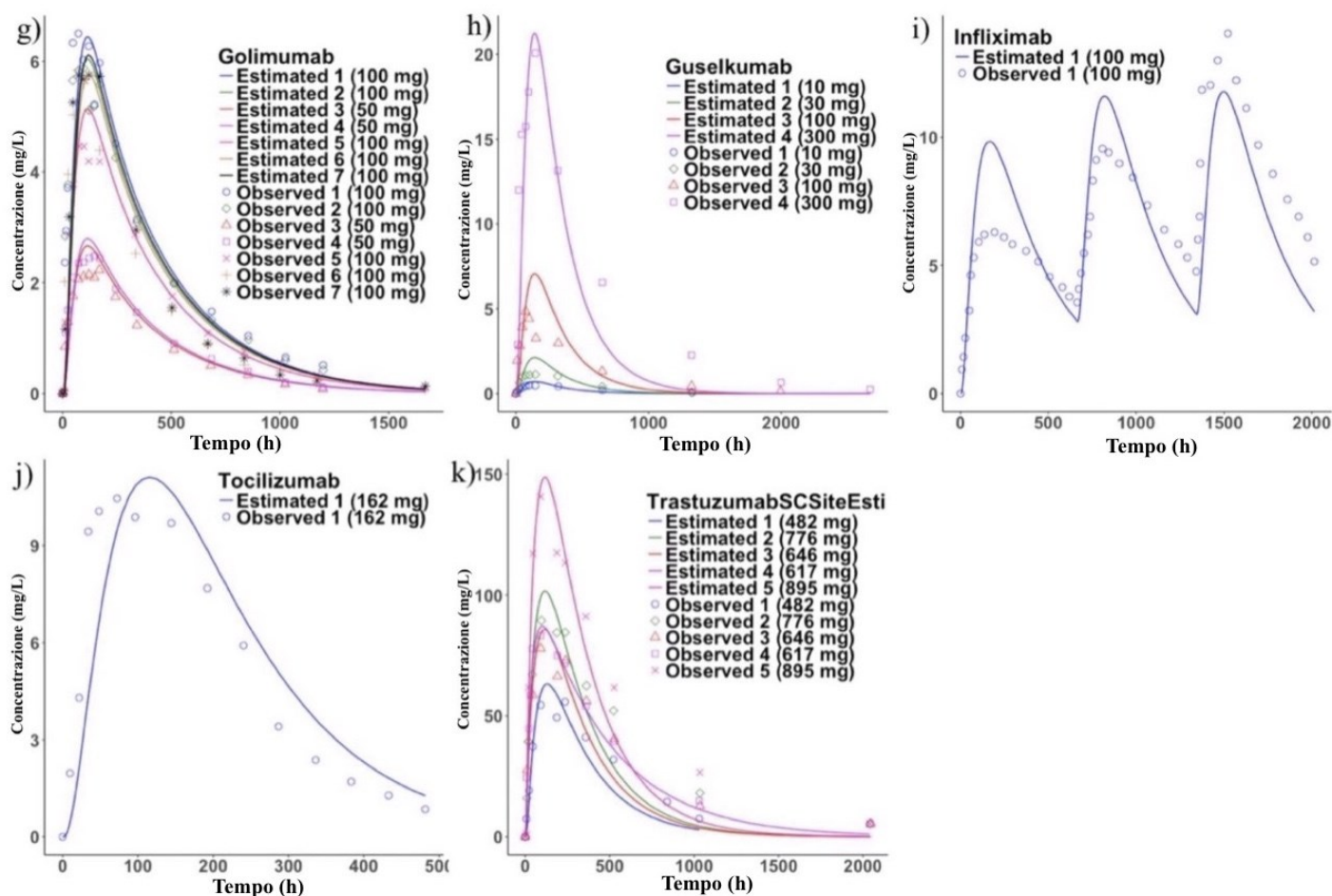


Figura 3.2 Profili farmacocinetici sottocutanei osservati (cerchi) e predetti dal modello (linea continua). g) golimumab, h) guselkumab, i) infliximab, j) tocilizumab, k) trastuzumab (i profili farmacocinetici medi osservati sono stati utilizzati per il confronto con le stime del modello).
Adattata da [14]

3.1.3 Applicazioni del modello farmacocinetico fisiologico minimo per valutare l'impatto della ialuronidasi nella formulazione di anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali per la somministrazione sottocutanea sono formulati come soluzioni altamente concentrate per erogare dosi più elevate (tipicamente 500-900 mg). Il volume di iniezione non può essere aumentato di oltre 1-2 ml a causa del disagio dell'iniezione. Tuttavia, la ialuronidasi è stata utilizzata in diversi studi per consentire volumi di iniezione più elevati interrompendo la complessa rete della matrice extracellulare sottocutanea formata dall'acido ialuronico [22,23]. Inoltre, la ialuronidasi può aumentare la velocità di assorbimento delle proteine terapeutiche portando a una diminuzione del T_{max} , un aumento della C_{max} , un aumento dell'area sotto la curva (AUC) e una maggiore biodisponibilità delle proteine terapeutiche. In questo studio, i dati di farmacocinetica sottocutanea ottenuti dopo la co-formulazione di ialuronidasi, tocilizumab e trastuzumab sono stati utilizzati per stimare la clearance linfatica tronco-linfonodale. A causa della co-formulazione con la ialuronidasi, il T_{max} per tocilizumab e trastuzumab era sovrastimato. Il rapporto $T_{max} - \text{osservato} / T_{max} - \text{previsto}$ per tocilizumab e trastuzumab era rispettivamente di 0.58 e 0.60. Gli autori hanno ipotizzato che l'alterazione del sito di iniezione sottocutanea da parte della ialuronidasi possa portare a un flusso linfatico alterato in tale sito. Pertanto, la clearance linfatica tronco-linfonodale e il flusso linfatico

sottocutaneo nel sito di iniezione sono stati stimati simultaneamente (Tabella 3.2). Dopo la stima simultanea di entrambi i parametri, la previsione del T_{max} è stata migliorata per tocilizumab ($T_{max\text{ osservato}}/T_{max\text{ previsto}} = 0.87$). Allo stesso modo, anche l'accuratezza della previsione del T_{max} di trastuzumab è stata migliorata ($T_{max\text{ osservato}}/T_{max\text{ previsto}} = 0.82$). Il flusso linfatico sottocutaneo stimato nel sito di iniezione per la co-formulazione dell'anticorpo monoclonale e della ialuronidasi era maggiore rispetto al flusso linfatico originale utilizzato nel modello. Il flusso linfatico sottocutaneo stimato per tocilizumab era 0.045 L/h, 330 volte superiore al valore del modello (Tabella 2.1). Nel caso di trastuzumab, il flusso linfatico sottocutaneo medio nel sito di iniezione era 0.003 L/h, 22 volte superiore al valore originale, per le volontarie sane e le pazienti con carcinoma mammario HER2-positivo (profili farmacocinetici osservati e stimati dal modello mostrati in Figura 3.2). Nel caso di altri profili farmacocinetici sottocutanei (dati non mostrati) ottenuti da volontari sani, il flusso linfatico del sito sottocutaneo era 0.013 L/h, 96 volte superiore al valore originale.

Oltre all'analisi di cui sopra, i profili di farmacocinetica sottocutanea (tocilizumab) ottenuti senza co-formulazione con l'enzima ialuronidasi sono stati utilizzati anche per la stima simultanea del flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutanea e della clearance linfatica tronco-linfonodale utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico minimo. Ciò è stato fatto per dimostrare che il cambiamento nel flusso linfatico del sito sottocutaneo osservato in precedenza era in realtà dovuto alla co-formulazione di ialuronidasi e anticorpi monoclonali. Nel caso di tocilizumab senza ialuronidasi, il flusso linfatico del sito sottocutaneo era 0.001 L/h (solo 7 volte superiore al valore originale). Ciò dimostra che il flusso linfatico sottocutaneo nel sito di iniezione è stato alterato quando è stata utilizzata la strategia di co-formulazione della ialuronidasi. Per i profili sottocutanei in cui questa strategia non è stata utilizzata, il flusso linfatico sottocutaneo nel sito di iniezione è stato relativamente meno influenzato.

Tabella 3.2 Stima della clearance linfatica tronco-linfonodale dopo somministrazione sottocutanea di anticorpi monoclonali. *F* rappresenta la biodisponibilità dopo la somministrazione sottocutanea, CL_{LN} rappresenta la clearance dell'anticorpo monoclonale nel compartimento interstiziale del tronco linfatico linfonodale

mAb	Sito di iniezione sottocutanea	Dose (F)	Popolazione	CL_{LN} media stimata del modello
Adalimumab	Basso ventre	40 mg (64%)	Volontari sani	0.002 L/h
Anifrolumab	Addome	300, 600 mg (73%)	Volontari sani	0.0001 L/h
Belimumab	Addome o coscia	200, 2*120, 240 mg (76%)	Pazienti con lupus eritematoso	0.0003 L/h
Belimumab	Addome o coscia	200, 2*120, 240 mg (76%)	Volontari sani	0.0000002 L/h
Canakinumab	Non disponibile	150, 300 mg (70 %)	Volontari sani	0.001 L/h
Daclizumab	Non disponibile	50, 150, 300 mg	Volontari sani	0.001 L/h
Golimumab	Addome/Coscia/Braccio	50, 100 mg (50 %)	Volontari sani	0.007 L/h
Guselkumab	Non disponibile	10, 30, 100, 300 mg (49%)	Volontari sani	0.002 L/h
Infliximab	Non disponibile	100 mg (on day 0, 28 and 56) (71%)	Pazienti con artrite reumatoide	0.001 L/h

Tocilizumab	Addome	162 mg (49%)	Volontari sani	0.002 L/h
Tocilizumab	Coscia	162 mg (con ialuronidasi)	Volontari sani	0.001 L/h
Trastuzumab	Coscia	482, 645, and 776 mg (con ialuronidasi)	Volontari sani	0.002 L/h
Trastuzumab	Coscia	895 mg (con ialuronidasi)	Pazienti con tumore al seno HER2-positivo	0.001 L/h
Trastuzumab	Coscia	600 mg (con ialuronidasi)	Volontari sani	0.002 L/h

3.1.4 Confronto della clearance linfatica tronco-linfonodale con punto isoelettrico e biodisponibilità degli anticorpi monoclonali

La clearance linfatica tronco-linfonodale stimata è stata confrontata con il punto isoelettrico (Figura 3.3) e la biodisponibilità (Figura 3.4) degli anticorpi monoclonali. Lo spazio interstiziale ha una carica anionica complessiva dovuta alla superficie cellulare di varie cellule immunitarie presenti nei linfonodi. Gli anticorpi monoclonali con punto isoelettrico più elevato hanno valori più elevati della clearance linfatica tronco-linfonodale stimata. La clearance linfatica tronco-linfonodale aumenta con la diminuzione della biodisponibilità (ottenuta dalla letteratura) degli anticorpi monoclonali (Figura 3.4). Ciò indica che il modello di fatto spiega la proteolisi linfatica degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea e quindi che il sistema linfatico è importante per la clearance degli anticorpi monoclonali.

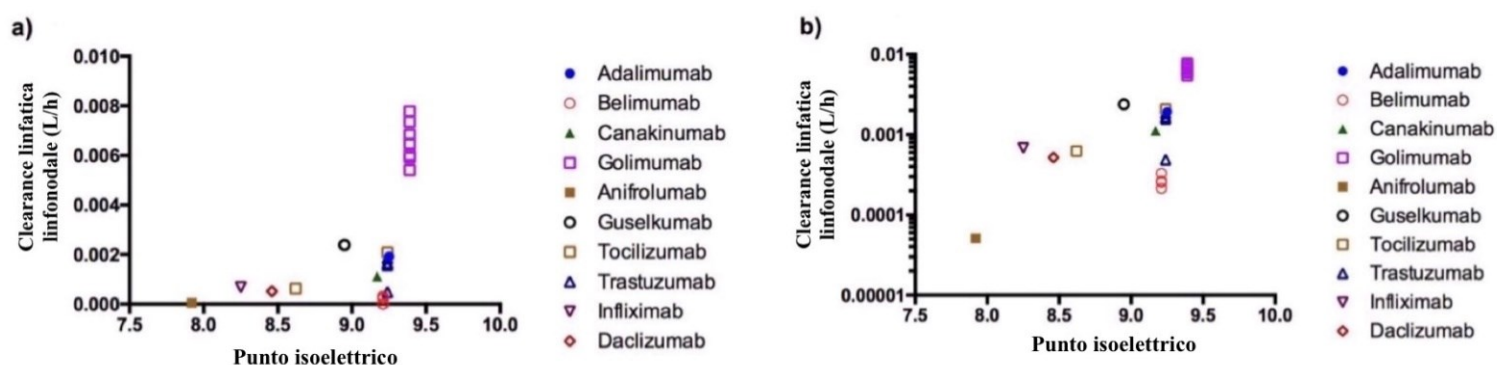


Figura 3.3 Correlazione tra la clearance linfatica tronco-linfonodale stimata del modello con il punto isoelettrico a) Scala lineare, b) Scala logaritmica. Adattata da [14]

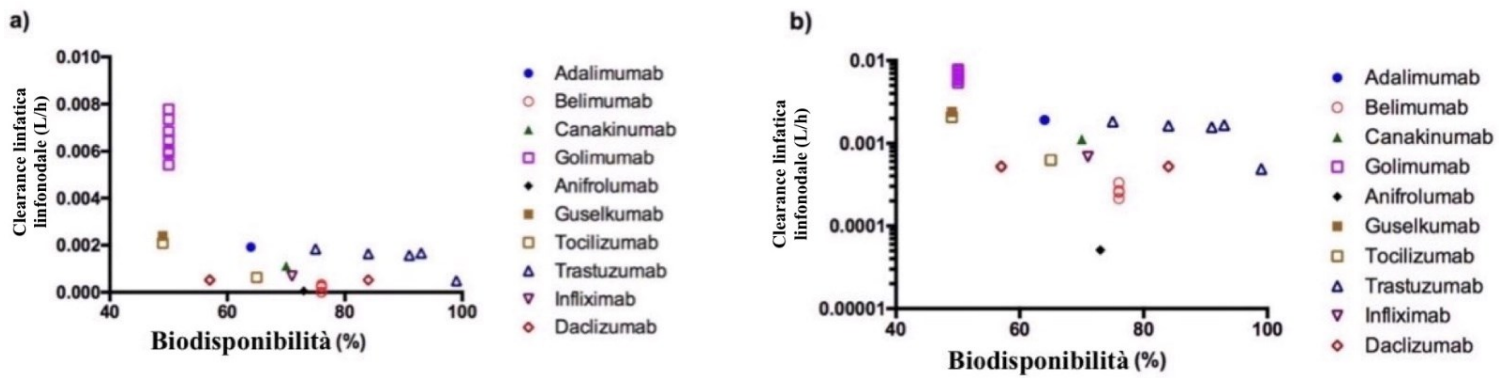


Figura 3.4 Correlazione tra la clearance linfatica tronco-linfonodale stimata del modello con la biodisponibilità a) Scala lineare, b) Scala logaritmica (Trastuzumab: co-formulato con ialuronidasi. Tocilizumab: solo un campione co-formulato con ialuronidasi.). Adattata da [14]

3.1.5 Analisi della sensitività e validazione del modello

L'analisi di sensitività ha mostrato che il volume interstiziale del sito di iniezione sottocutanea (V_{SC}^I), il flusso linfatico sottocutaneo (L_{SC}), il volume capillare linfatico (V_{LC}^{cap}) e il flusso linfatico afferente (L_{Aff}) sono responsabili delle variazioni di C_{max} e T_{max} degli anticorpi monoclonali. Nel caso del volume interstiziale tronco-linfonodale linfatico (V_{LY}^I), aumenti del volume di 50 e 100 volte portano ad alterazioni dei profili farmacocinetici degli anticorpi monoclonali, mentre variazioni da 0.1 a 10 volte del valore originale non hanno alterato C_{max} o T_{max} . L'alterazione della clearance linfatica tronco-linfonodale (CL_{LN}) e del flusso linfatico efferente (L_{Eff}) portano principalmente alla modifica della C_{max} . Inoltre, i cambiamenti nel flusso linfatico del dotto toracico (L_{Thor}) e nel volume linfatico centrale (V_{LY-Cen}) non hanno influito sulla farmacocinetica degli anticorpi monoclonali. Ciò indica che il transito attraverso il sistema linfatico iniziale dopo l'iniezione sottocutanea è la fase determinante per l'assorbimento di anticorpi monoclonali, mentre questo non è vero per il dotto toracico. Pertanto, il volume del sito di iniezione sottocutanea, il flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutaneo, il volume capillare linfatico, il flusso linfatico afferente e il flusso linfatico efferente sono parametri fisiologici importanti per l'assorbimento degli anticorpi monoclonali. Invece, cambiamenti nel flusso linfatico del dotto toracico e nel volume linfatico centrale non hanno alterato la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali. Sia la C_{max} che il T_{max} sono sensibili alle variazioni del volume del sito di iniezione sottocutanea, del flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutaneo, del volume capillare linfatico e del flusso linfatico afferente. Tuttavia, i cambiamenti nel flusso linfatico efferente non hanno avuto alcun impatto sul T_{max} . Inoltre, quando il coefficiente di riflessione linfatica è stato aumentato, C_{max} è diminuita, mentre T_{max} è aumentato. Non vi è stato alcun cambiamento nel profilo farmacocinetico dopo l'alterazione del coefficiente di riflessione vascolare.

L'accuratezza della previsione del modello è stata valutata tracciando i valori osservati e previsti di C_{max} e T_{max} . Inoltre, il rapporto tra C_{max} e T_{max} osservato e previsto è stato tracciato con il punto isoelettrico, la clearance linfatica del tronco-linfonodo e la biodisponibilità. Nel caso di C_{max} , tutti i valori previsti erano compresi tra 1.2 e 0.5 volte i valori di letteratura osservati. Il T_{max} previsto era compreso tra 1.8 e 0.3 volte i valori osservati.

3.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo

3.2.1 Farmacocinetica endovenosa

La clearance totale delle IgG tramite pinocitosi in tutti gli organi/tessuti CL_{pino}^{Total} è stata stimata intorno ai 157.3 ml/giorno (errori standard relativi, RSE% = 11.6) utilizzando la concentrazione basale di IgG endogene di 12.1 mg/ml. Il rapporto allo stato stazionario simulato tra la concentrazione interstiziale delle IgG nell'organo e la concentrazione plasmatica era 0.41, che concorda con il precedente intervallo riportato di 0.1-0.5 in [24].

Per ciascuno dei 20 anticorpi monoclonali endovenosi, i valori per i due parametri stimati, S_{pino} e $S_{diff-conv}$, sono elencati nelle due colonne di destra della Tabella 2.3 insieme ai loro errori standard relativi percentuali. I risultati indicano che il modello può predire la farmacocinetica plasmatica di ciascuno di questi 20 anticorpi monoclonali per le diverse dosi somministrate, con R^2 che varia da 0.941 per Siltuximab a 0.998 per Belimumab. I parametri che rappresentano le differenze specifiche dell'anticorpo monoclonale nello scambio tissutale tramite pinocitosi (S_{pino}) e diffusione/convezione ($S_{diff-conv}$) sono stati stimati con buona precisione come mostrato nella Tabella 2.3. Le stime di S_{pino} vanno da 0.627 a 2.14, con una media, mediana e deviazione standard rispettivamente di 1.07, 0.949 e 0.337. Mentre le stime per $S_{diff-conv}$ vanno da 0.452 a 2.21, con una media, mediana e deviazione standard rispettivamente di 1.18, 1.16 e 0.429. Non c'è una correlazione significativa tra S_{pino} e $S_{diff-conv}$ tra questi 20 anticorpi monoclonali.

3.2.2 Farmacocinetica sottocutanea

I risultati della stima dei due parametri farmaco-specifici del sito sottocutaneo, S_{LymUpt}^{SC} e CL_{LymCap}^{SC} , per ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali somministrati per via sottocutanea sono elencati nella Tabella 2.4 (S_{pino} e $S_{diff-conv}$ fissati ai valori ottenuti dalla corrispondente analisi endovenosa). I valori di R^2 variano da 0.948 per Daclizumab a 0.987 per Gevokizumab. Come mostrato nella Tabella 2.4, sia S_{LymUpt}^{SC} che CL_{LymCap}^{SC} sono stati stimati con precisione. Il valore di CL_{LymCap}^{SC} stimato varia da 0.441 a 3.66, con una media, mediana e deviazione standard di 1.25, 0.874 e 0.998. Le stime di S_{LymUpt}^{SC} sono comprese nell'intervallo 0.090 e 0.301, con una media, mediana e deviazione standard rispettivamente di 0.210, 0.211 e 0.063.

La previsione della biodisponibilità basata sul modello viene tracciata rispetto al valore calcolato dall'analisi non compartimentale per ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali in Figura 3.5. Come previsto, questi risultati sono in buon accordo ($R^2 = 0.91$), dato che il modello farmacocinetico fisiologico ha prodotto buone previsioni dei dati di concentrazione plasmatica per ciascun anticorpo monoclonale.

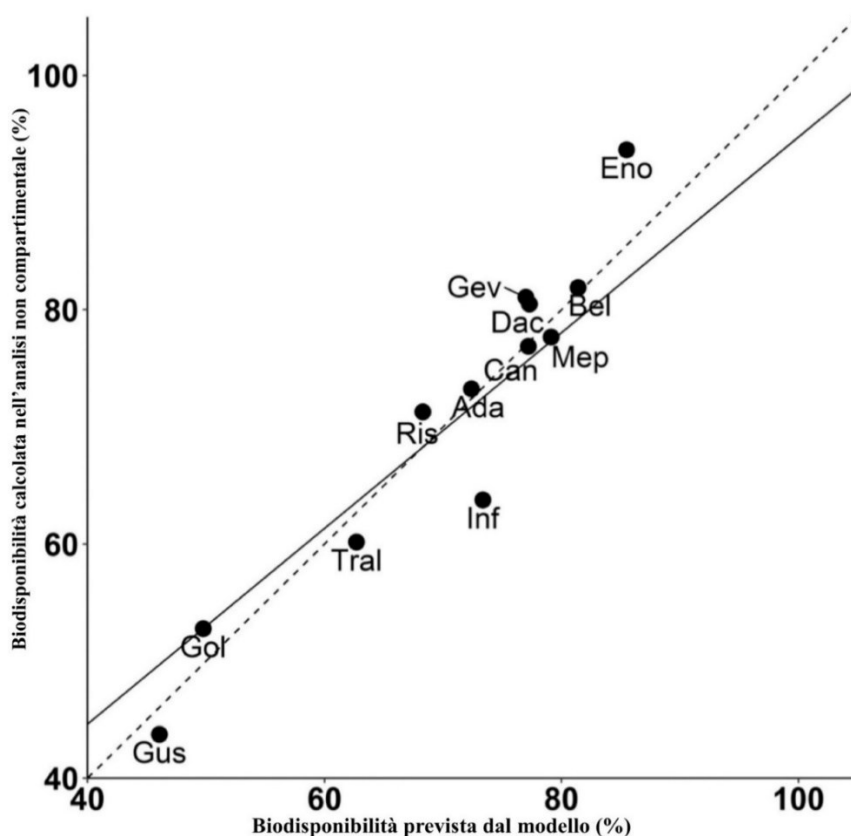


Figura 3.5 Valutazione della correlazione lineare tra la biodisponibilità calcolata dall'analisi non compartimentale (%) e la biodisponibilità prevista dal modello (%). Sono inclusi tutti gli anticorpi monoclonali con dati di farmacocinetica sottocutanea (la linea continua rappresenta la linea di regressione ($R^2 = 0,91$), la linea tratteggiata rappresenta l'ipotetica linea di identità). Adattata da [17]

La relazione tra le caratteristiche farmacocinetiche sottocutanee osservate, biodisponibilità e T_{max} , e i parametri stimati del modello del sito sottocutaneo CL_{LymCap}^{SC} e S_{LymUpt}^{SC} sono le seguenti: la biodisponibilità è correlata con CL_{LymCap}^{SC} ($p < 0.0001$) ma non con S_{LymUpt}^{SC} , mentre T_{max} è correlato con S_{LymUpt}^{SC} ($p < 0.001$) ma non con CL_{LymCap}^{SC} .

3.2.3 Determinanti biofisici dell'assorbimento sottocutaneo degli anticorpi monoclonali

I valori calcolati dei punti isoelettrici vanno da 6.36 a 7.37. Non c'è alcuna relazione lineare significativa (risultati non mostrati) tra il punto isoelettrico e i quattro parametri specifici del modello (S_{pino} , $S_{diff-conv}$, CL_{LymCap}^{SC} , S_{LymUpt}^{SC}). È stata testata la correlazione lineare tra i quattro parametri stimati del modello e tutte e cinque le metriche fornite nella piattaforma TAP [25]. Le uniche due relazioni significative tra i parametri del modello e le metriche calcolate erano tra CL_{LymCap}^{SC} e PPC ($P=0.000362$), S_{pino} e PPC ($P=0.0013$). La metrica PPC varia da 0 a 1.36 per ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali. Le relazioni di regressione risultanti sono: $CL_{LymCap}^{SC} = 0.51 + 2.13 \cdot PPC$ ($R^2 = 0.74$, $p = 0.00036$, errore standard residuo = 0.539), $S_{pino} = 0.89 + 0.72 \cdot PPC$ ($R^2 = 0.53$, $p = 0.0013$, errore standard residuo = 0.256). Incorporando la PPC nel modello farmacocinetico fisiologico, la deviazione standard di CL_{LymCap}^{SC} diminuisce da 0.998 a 0.539, mentre la deviazione standard di S_{pino}

viene ridotta da 0.362 a 0.256. Questi risultati suggeriscono che questo modello spiega alcune delle differenze nella pinocitosi e nella clearance capillare linfatica sottocutanea tra gli anticorpi monoclonali.

3.2.4 Analisi della sensitività e simulazioni

Utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico, abbiamo confrontato i contributi all'assorbimento sottocutaneo attribuibili alla via linfatica e alla via di perfusione sanguigna, per ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali. Per questi anticorpi monoclonali, l'assorbimento attraverso la via linfatica rappresenta tra il 91.6% e il 99.0% della quantità totale di dose assorbita. Questo risultato mostra il ruolo primario dell'assorbimento linfatico nell'assorbimento degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea ed è coerente con gli studi precedenti sugli ovini [26] e altri studi riportati in [22]. Il modello farmacocinetico fisiologico è stato impiegato anche per prevedere la variazione del tasso di assorbimento sottocutaneo nel tempo. L'assorbimento sottocutaneo è sostanzialmente completo 25 giorni dopo l'iniezione sottocutanea (Figura 3.9). La simulazione in Figura 3.9 dimostra anche il contributo principale del sistema linfatico all'assorbimento di anticorpi monoclonali somministrati per via sottocutanea, utilizzando Golimumab come esempio. Dalla Figura 3.9 si prevede che il picco del tasso di assorbimento attraverso la via linfatica sia di 72.2 nmol/giorno, rispetto ai 4.53 nmol/giorno attraverso la perfusione sanguigna.

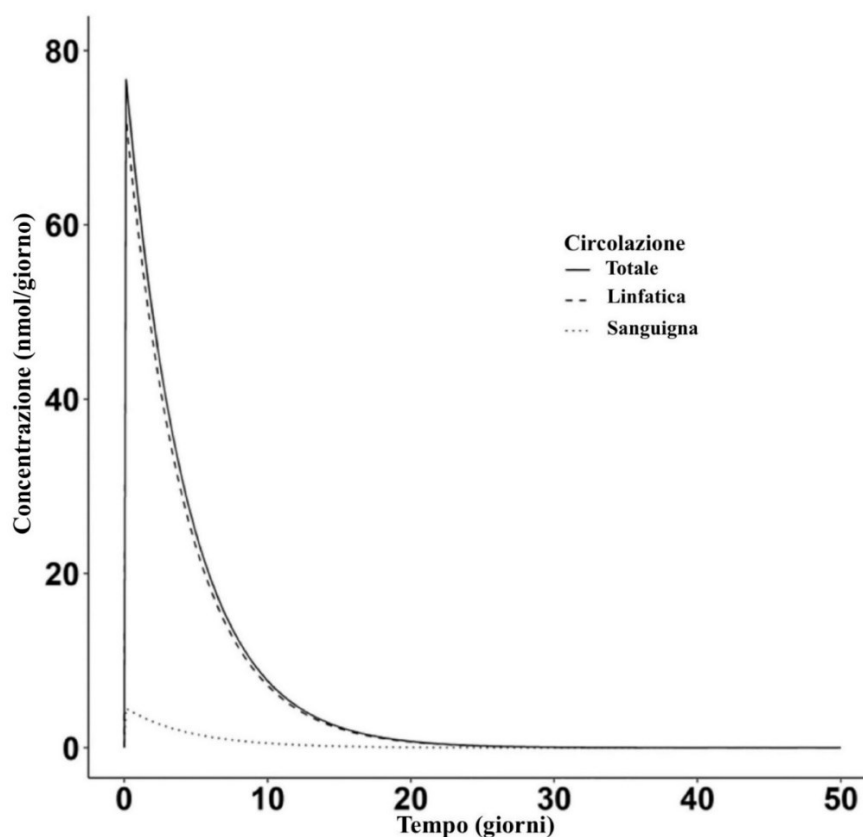


Figura 3.9 Simulazione del tasso di assorbimento di diverse vie dopo la somministrazione sottocutanea, utilizzando Golimumab come esempio. La linea continua rappresenta il tasso di assorbimento totale dopo somministrazione sottocutanea. Le linee tratteggiata e punteggiata indicano rispettivamente il tasso di assorbimento degli anticorpi monoclonali attraverso il sistema linfatico e la perfusione sanguigna. Adattata da [17]

I risultati dell'analisi di sensitività mostrati in Figura 3.10 illustrano il ruolo del flusso linfatico sottocutaneo (L^{SC}) sulla farmacocinetica plasmatica dopo una somministrazione sottocutanea di anticorpi monoclonali. Per Golimumab, ad esempio, la riduzione del flusso linfatico di 0.1 e 0.5 volte può ritardare significativamente l'assorbimento sottocutaneo e ridurre la biodisponibilità rispettivamente a 5.79% e 31.1%, rispetto al 49.8% con il valore del flusso linfatico originale. Al contrario, l'aumento del flusso linfatico (cioè una differenza di 10 volte) può facilitare l'assorbimento dell'anticorpo monoclonale, portando a un maggiore tasso di assorbimento e una maggiore biodisponibilità del 91.3%.

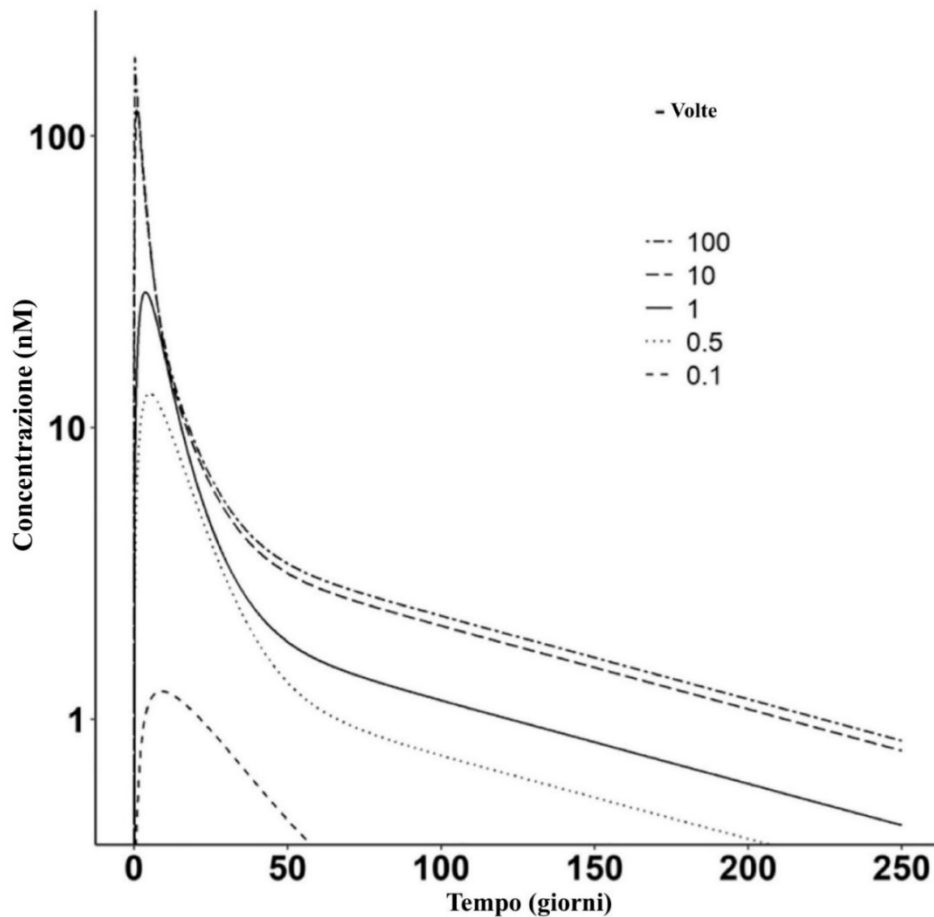


Figura 3.10 Analisi della sensitività del flusso linfatico del sito sottocutaneo, utilizzando come esempio Golimumab. La linea continua rappresenta il profilo farmacocinetico originale di Golimumab dopo somministrazione sottocutanea. Le linee denotano profili farmacocinetici dopo aver modificato il flusso linfatico del sito sottocutaneo a 100, 10, 0.5 e 0.1 volte il valore del parametro originale (0.00225 ml/min). Adattata da [17]

CAPITOLO 4

CONCLUSIONI

In questo capitolo vengono discussi i risultati ottenuti nel Capitolo 3 e vengono evidenziate le caratteristiche di ciascun modello, sulla base degli studi disponibili.

4.1 Modello farmacocinetico fisiologico minimo

Il trasferimento sequenziale degli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione sottocutanea attraverso il sistema linfatico è descritto utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico minimo. Per descrivere questo transito sono stati utilizzati i compartimenti del sito di iniezione sottocutanea (interstiziale, endosomiale, vascolare), i capillari linfatici, il tronco linfonodale linfatico (interstiziale ed endosomiale), il sistema linfatico centrale (dotto toracico e cisterna del chilo). Il resto del corpo è stato schematizzato con un modello a 2 compartimenti basato sui dati di farmacocinetica endovenosa della letteratura. Il trasferimento sequenziale si basava sulla nota anatomia del sistema linfatico [16]. Tuttavia, le vie dettagliate del trasferimento delle proteine terapeutiche attraverso i diversi linfonodi devono essere ulteriormente studiate. Inoltre, alcuni individui possono presentare alterazioni nei modelli di clearance; ad esempio, la clearance nel braccio, nella spalla e nella coscia può essere modificata in modo significativo dopo la mastoidectomia radicale. Infine, un sito di iniezione può sfociare in più bacini linfatici adiacenti.

La clearance dallo spazio interstiziale del sito di iniezione sottocutanea non è stata considerata nel modello, poiché uno studio precedentemente riportato [4] indicava che la degradazione delle proteine (hGH) era minima nel sito di iniezione sottocutanea. Inoltre, la stima simultanea della clearance dallo spazio interstiziale sottocutaneo e dal compartimento interstiziale tronco-linfonodale ha determinato un contributo minore per la proteolisi del sito di iniezione sottocutanea (dati non mostrati). Tuttavia, la proteolisi endosomiale nel sito di iniezione sottocutanea e nei linfonodi è stata comunque considerata.

La clearance interstiziale del tronco-linfonodale è stata stimata utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico minimo e i dati farmacocinetici sottocutanei della letteratura (Tabella 3.2). La clearance stimata cambia con il dosaggio e con le variazioni della popolazione. Questa alterazione della clearance stimata può essere dovuta alle condizioni della malattia, al cambiamento nella formulazione o alle differenze nelle modifiche post-traduzionali (ad esempio la glicosilazione); queste differenze non sono state considerate nel modello. Il modello ha dimostrato che la clearance linfatica tronco-linfonodale stimata degli anticorpi monoclonali può essere correlata alla biodisponibilità (Figura 3.4). La clearance stimata aumenta quando la biodisponibilità dell'anticorpo monoclonale diminuisce: questo indica l'efficienza del modello, in quanto tiene conto della proteolisi degli anticorpi monoclonali nel sistema linfatico. Secondo i rapporti precedentemente pubblicati [4,22], la proteolisi non è stata osservata dopo l'incubazione delle proteine terapeutiche con la linfa appena raccolta, indicando l'assenza di enzimi proteolitici nella linfa. In questo studio, il volume del tronco linfatico (che contiene principalmente fluido linfatico) e il volume del linfonodo (che contiene principalmente

cellule linfonodali) sono stati combinati per rappresentare il compartimento responsabile della proteolisi degli anticorpi monoclonali. Il compartimento tronco-linfonodale era composto principalmente dal volume linfonodale, mentre il volume del tronco linfatico che rappresentava il volume del fluido linfatico era molto minore (<7%).

L'analisi di sensitività ha mostrato che la proteolisi dello spazio interstiziale tronco-linfonodale linfatico è importante per governare la C_{max} degli anticorpi monoclonali. La degradazione degli anticorpi monoclonali nel sistema linfatico è principalmente dovuta alla proteolisi extracellulare o interstiziale. Gli enzimi proteolitici secreti dal linfonodo e da altre cellule immunitarie nello spazio interstiziale possono svolgere un ruolo importante nel ridurre la biodisponibilità degli anticorpi monoclonali. La proteolisi intracellulare o endosomiale degli anticorpi monoclonali è trascurabile a causa della protezione mediata dal legame con il recettore FcRn. La proteolisi intracellulare degli anticorpi monoclonali nel sistema linfatico può dipendere dal loro assorbimento da parte dei linfociti. In questo modello, gli autori hanno utilizzato il tasso di assorbimento endosomiale (R1) da un modello farmacocinetico fisiologico basato sulla letteratura (stimato adattando i dati del fegato) [3]. L'alterazione della velocità di assorbimento endosomiale da 0.1 a 100 volte del valore originale non ha modificato la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali (dati non mostrati). Tuttavia, studi in vitro per calcolare R1 possono essere utili per una comprensione accurata dei processi proteolitici nel sito di iniezione sottocutanea e nel sistema linfatico. Condizioni patologiche, come un'inflammatione, possono anche aumentare l'attività proteolitica della linfa (questo resta da approfondire). Inoltre, l'alterazione della frazione di riciclo dell'anticorpo monoclonale legato al recettore FcRn, la costante di dissociazione per il legame di FcRn dell'anticorpo e la concentrazione di FcRn non hanno modificato la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali (dati non mostrati).

Wang et al. [27] hanno confermato la proteolisi dell'eritropoietina in presenza della sospensione di cellule linfonodali di ratto. La proteina è scomparsa completamente dopo che il numero di cellule linfonodali nell'incubazione è stato aumentato. Ciò indica che i linfonodi sono responsabili della proteolisi delle proteine terapeutiche. Inoltre, dopo l'incubazione della proteina con l'omogenato di tessuto sottocutaneo, il 90-95% della proteina madre è rimasta inalterata. Sebbene gli autori abbiano sollevato dubbi sulla perdita di attività proteolitica durante la preparazione dell'omogenato di tessuto sottocutaneo, questo risultato corrobora la conclusione che la degradazione del sito sottocutaneo gioca un ruolo minore nel determinare la biodisponibilità. Tuttavia, in un altro studio, è stato riportato che l'insulina si degrada nel sito di iniezione sottocutanea [28]. È necessario condurre indagini dettagliate sulla proteolisi in vitro degli anticorpi monoclonali in vari sistemi per arrivare a conclusioni più precise sulla causa della ridotta biodisponibilità dopo una somministrazione sottocutanea.

Gli studi di farmacocinetica nell'uomo indicano che la variazione del sito di iniezione (addome e coscia) non ha alcun impatto su C_{max} e $AUC_{0-\infty}$ di belimumab [29]. In un altro studio clinico [30], il T_{max} mediano di golimumab (un anticorpo monoclonale umano IgG1 κ , indicato per il trattamento dell'artrite idiopatica giovanile poliarticolare) dopo l'iniezione sottocutanea nella coscia era 1.25 volte superiore rispetto all'iniezione sottocutanea nell'addome e nella parte superiore del braccio. La C_{max} dopo l'iniezione sottocutanea nella coscia era 1.33 volte superiore rispetto all'iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio e la C_{max} nell'addome era 1.24 volte superiore a quella della parte superiore del braccio. Ciò suggerisce che i volumi dei compartimenti linfatici e dei flussi linfatici potrebbero non essere significativamente diversi per ciascuno dei siti di iniezione sottocutanea. Pertanto, i volumi linfatici e le velocità di flusso per un sito di iniezione possono essere applicati anche agli altri siti. I calcoli utilizzati nel modello hanno mostrato che il volume interstiziale del tronco-linfonodale linfatico è simile per vari siti di iniezione sottocutanea (braccio, addome e coscia) (Tabella 2.2).

L'accuratezza della previsione del modello è stata determinata tracciando i parametri farmacocinetici osservati e previsti. Non c'è correlazione tra l'accuratezza predittiva di T_{max} o C_{max} con il punto isoelettrico o la biodisponibilità o la clearance linfatica tronco-linfonodale stimata degli anticorpi monoclonali. Ciò conferma che il punto isoelettrico degli anticorpi monoclonali non ha influenzato l'assorbimento da parte del sistema linfatico. Allo stesso modo, la clearance e la biodisponibilità linfatica del tronco-linfonodale non controllano l'accuratezza della previsione del modello.

Il modello ha anche mostrato che per gli anticorpi monoclonali con punto isoelettrico più elevato, la clearance linfatica tronco-linfonodale stimata è maggiore. Le proteine cationiche con punto isoelettrico più alto hanno una propensione a legarsi con le superfici cellulari anioniche e con lo spazio interstiziale (ad esempio, l'acido ialuronico). Un punto isoelettrico più elevato porta anche a una clearance più rapida degli anticorpi monoclonali. Una tendenza simile è stata osservata per gli anticorpi monoclonali studiati in questo studio (Figura 3.3). Questa correlazione può essere utilizzata per predire la clearance linfatica tronco-linfonodale sulla base del punto isoelettrico noto degli anticorpi monoclonali. La clearance linfatica può essere quindi utilizzata nel modello farmacocinetico fisiologico minimo per predire la farmacocinetica sottocutanea degli anticorpi monoclonali.

L'analisi di sensitività dei parametri del modello indica che il sistema linfatico iniziale determina la velocità dell'assorbimento degli anticorpi monoclonali per via sottocutanea. Principalmente, il flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutanea, il volume nel sito di iniezione sottocutaneo, il flusso linfatico afferente, il flusso linfatico efferente e il volume linfatico tronco-linfonodale influenzano il T_{max} , dopo la loro alterazione da 0.1 a 100 volte del valore originale. Tuttavia, il flusso linfatico del dotto toracico non ha avuto alcun effetto sul T_{max} dopo una variazione da 0.1 a 100 volte del suo valore. Pertanto, l'alterazione dei flussi del dotto linfatico toracico dovuta alla condizione della malattia potrebbe non alterare la farmacocinetica complessiva degli anticorpi monoclonali. Tuttavia, i parametri associati al sistema linfatico iniziale sono importanti per regolare l'assorbimento degli anticorpi monoclonali e il cambiamento di tali parametri, dovuto alle condizioni della malattia, può alterare significativamente la farmacocinetica sottocutanea degli anticorpi monoclonali.

È stato riportato in precedenza che la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali è soggetta a un'elevata variabilità tra i soggetti. Fattori come il peso corporeo, l'età, il sesso, l'etnia, le condizioni della malattia, lo stato immunitario sono responsabili delle variazioni della farmacocinetica [31]. Tuttavia, sono necessarie ulteriori ricerche per valutare la loro influenza sui parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico. Il modello farmacocinetico fisiologico minimo può essere utilizzato per la predizione della biodisponibilità di anticorpi monoclonali utilizzando i dati di proteolisi linfatica in vitro e per valutare l'impatto dei cambiamenti nei flussi linfatici sulla farmacocinetica. Inoltre, il modello può essere utilizzato per svolgere esperimenti in vitro per la previsione meccanicistica della biodisponibilità. Questo studio ha spiegato vari parametri fisiologici relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico, responsabili della regolazione della farmacocinetica degli anticorpi monoclonali.

Ricapitolando, la clearance linfatica tronco-linfonodale è stata stimata utilizzando il modello farmacocinetico fisiologico minimo. I parametri fisiologici relativi al tessuto sottocutaneo e al sistema linfatico sono stati utilizzati insieme ai parametri endovenosi a 2 compartimenti per costruire il modello, che può fungere da piattaforma per utilizzare i dati di clearance in vitro del tessuto sottocutaneo e del sistema linfatico per prevedere la farmacocinetica sottocutanea degli anticorpi monoclonali. I linfonodi sono i principali responsabili della proteolisi degli anticorpi monoclonali e della loro ridotta biodisponibilità. Pertanto, la sospensione cellulare dei linfonodi può essere utilizzata per generare input per il modello farmacocinetico fisiologico. Tuttavia, gli studi in vitro andavano

oltre lo scopo del lavoro dello studio [14]. Inoltre, questo studio ha identificato il flusso linfatico nel sito di iniezione sottocutanea, il flusso linfatico afferente, il flusso linfatico efferente, i volumi associati al sito di iniezione sottocutanea e la clearance linfatica tronco-linfonodale come i parametri responsabili dell'assorbimento degli anticorpi monoclonali. La clearance linfatica tronco-linfonodale aumenta con l'aumento del punto isoelettrico degli anticorpi monoclonali. Pertanto, il punto isoelettrico degli anticorpi monoclonali può essere utilizzato per calcolare la clearance linfatica. Nel complesso, il modello è utile per comprendere la disposizione degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea.

4.2 Modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo

In questo caso, viene presentato un modello farmacocinetico basato sulla fisiologia dell'intero organismo con l'obiettivo di predire la farmacocinetica clinica degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea nell'uomo. Il modello incorpora due parametri specifici degli anticorpi monoclonali per rappresentare le differenze nella velocità di pinocitosi e nelle velocità del trasporto diffusivo/convettivo tra gli anticorpi monoclonali. Nel sito di somministrazione sottocutanea vengono utilizzati due parametri aggiuntivi per rappresentare le differenze nell'assorbimento capillare linfatico e nella clearance tra gli anticorpi monoclonali. Il modello risultante è in grado di predire in modo affidabile la biodisponibilità e il T_{max} , nonché il profilo temporale della concentrazione plasmatica complessiva, di ciascuno dei 12 anticorpi monoclonali sottocutanei studiati. Ulteriori indagini basate sul modello hanno evidenziato che le differenze specifiche dell'anticorpo monoclonale nella pinocitosi nei vari organi/tessuti, così come la clearance capillare linfatica sottocutanea, potrebbero essere spiegate, in parte, sulla base della carica locale delle CDR dell'anticorpo monoclonale, ma non sulla base del punto isoelettrico dell'anticorpo. La capacità predittiva del modello composito è stata valutata attraverso simulazioni Monte Carlo (metodo numerico basato su procedimenti probabilistici) della farmacocinetica sottocutanea di altri quattro anticorpi monoclonali non utilizzati nello sviluppo del modello. Nel complesso, questo studio fornisce un modello farmacocinetico fisiologico, cioè una piattaforma per caratterizzare e prevedere la cinetica degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea.

Dopo una somministrazione sottocutanea, gli anticorpi monoclonali attraversano la matrice extracellulare per raggiungere i capillari linfatici o i capillari sanguigni prima dell'assorbimento. Nel modello, la matrice extracellulare dello spazio sottocutaneo è rappresentata da un unico compartimento interstiziale omogeneo, con il trasporto e il successivo assorbimento linfatico dell'anticorpo monoclonale espressi da un unico termine che rappresentava la velocità di trasporto specifica dell'anticorpo monoclonale dall'interstizio al capillare linfatico $S_{LymUpt}^{SC} \cdot L^{SC}$. Prove precedenti suggeriscono che l'assorbimento di IgG dal deposito dopo la sua somministrazione sottocutanea è di primo ordine [32], supportando ulteriormente le ipotesi fatte a livello di tessuto utilizzate nel modello sottocutaneo. Studi precedenti hanno studiato anche la degradazione pre-sistemica delle proteine terapeutiche [22,33], tuttavia mancano informazioni quantitative sul catabolismo/degradazione tissutale locale. Pertanto, nel modello, la clearance complessiva degli anticorpi monoclonali dovuta al catabolismo/degradazione nel sito sottocutaneo e/o nei sistemi linfatici drenanti è stata rappresentata come una clearance netta dallo spazio capillare linfatico locale CL_{LymCap}^{SC} . Nonostante queste ipotesi semplificative, il modello presentato è qualitativamente coerente con altri studi riportati in letteratura. Ad esempio, è stato dimostrato che l'aumento del flusso

linfatico mediante massaggio o calore nel sito di iniezione aiuta l'assorbimento di proteine terapeutiche [34,35], il che è coerente con i risultati dell'analisi di sensitività del modello in Figura 3.10. Inoltre, la previsione del modello dimostra il ruolo dominante del sistema linfatico nell'assorbimento sottocutaneo (oltre il 90%), in linea con i risultati sperimentali negli ovini [26]. Le previsioni del modello sono anche coerenti con il ruolo centrale del trasporto della matrice extracellulare e dell'assorbimento linfatico nel determinare la velocità di assorbimento degli anticorpi monoclonali, come riportato in studi preclinici e clinici che utilizzano la ialuronidasi per migliorare l'assorbimento sottocutaneo [36,37]. Inoltre, l'entità dell'assorbimento sottocutaneo è in gran parte determinata dalla degradazione pre-sistemica CL_{LymCap}^{SC} , come identificato dall'analisi di correlazione. Ciò suggerisce che l'inibizione dell'eliminazione pre-sistemica può aumentare la biodisponibilità sottocutanea, che può essere ottenuta mediante la co-somministrazione di inibitori della proteasi o tramite una strategia di saturazione della dose.

Sono state considerate diverse proprietà biofisiche degli anticorpi monoclonali nel tentativo di spiegare le differenze sostanziali nel comportamento farmacocinetico osservate. Poiché la carica netta di un anticorpo monoclonale in vivo influenza la sua interazione con componenti tissutali e/o bersagli, il punto isoelettrico dell'anticorpo è stato studiato come determinante della sua farmacocinetica. È stato scoperto, tuttavia, che sono necessarie differenze nel valore del punto isoelettrico di più di un'unità per produrre un cambiamento rilevabile nella clearance sistemica di un anticorpo e nella distribuzione tissutale [38]. In questo studio, i valori calcolati del punto isoelettrico dei 12 anticorpi monoclonali esaminati vanno da 6.36 a 7.37. Dato questo intervallo ristretto, non abbiamo trovato una relazione significativa tra il valore del punto isoelettrico dell'anticorpo monoclonale e i quattro parametri specifici per l'anticorpo monoclonale del modello.

È stato recentemente riportato che la carica locale delle CDR (complementarity determining region) di un anticorpo monoclonale può influire sul bilancio di carica e sulla clearance di queste grandi molecole [39]. Poiché la CDR di un anticorpo monoclonale entra in contatto direttamente con l'antigene e media il suo legame, è stato studiato se la vicinanza della carica positiva della CDR dell'anticorpo monoclonale (metrica PPC) potesse spiegare alcune delle differenze osservate nei quattro parametri specifici dell'anticorpo monoclonale, e quindi la variabilità nel comportamento farmacocinetico degli anticorpi monoclonali studiati. Inoltre, è stato scoperto che la PPC potrebbe spiegare alcune delle differenze degli anticorpi monoclonali in S_{pino} e CL_{LymCap}^{SC} , ma non in $S_{diff-conv}$ o S_{LymUpt}^{SC} . Tuttavia, per valutare più completamente questi risultati sono necessarie ulteriori indagini con anticorpi monoclonali aggiuntivi su un intervallo di valori PPC.

La correlazione positiva trovata tra la PPC dell'anticorpo monoclonale e S_{pino} e tra PPC e CL_{LymCap}^{SC} può essere intesa come segue. L'aumento della vicinanza tra la carica positiva della CDR può portare a una maggiore interazione tra anticorpi monoclonali e membrane cellulari, che consistono in componenti caricati negativamente come eparina e acido sialico. Questo legame più forte facilita quindi l'ingresso dell'anticorpo monoclonale nelle cellule endoteliali attraverso la pinocitosi, che è rappresentata nel modello dal fattore di scala S_{pino} specifico dell'anticorpo monoclonale, che altera la clearance della pinocitosi. Questo risultato è coerente con lo studio di Datta-Mannan et al [39], in cui gli autori hanno scoperto che bilanciare la carica nella CDR degli anticorpi monoclonali umanizzati senza modificare il punto isoelettrico può ridurre il legame dell'anticorpo monoclonale alle cellule, e quindi diminuire la clearance dell'anticorpo monoclonale.

La metrica PPC è risultata anche positivamente correlata con la clearance dell'anticorpo monoclonale del sito sottocutaneo pre-sistemico CL_{LymCap}^{SC} . La degradazione presistemica degli anticorpi

monoclonali può essere mediata dalle proteasi, così come dai recettori solubili e di membrana. Con una carica positiva più elevata nelle vicinanze della CDR, è più probabile che gli anticorpi monoclonali siano esposti a bersagli solubili o a bersagli presenti sulla superficie cellulare con carica negativa, il che può portare all'assorbimento e alla degradazione mediati dai recettori oppure alla formazione di complessi immunitari che saranno eliminati. In uno studio sulle scimmie (macaco cinomolgo) [40], è stato riportato che l'aumento della carica positiva degli anticorpi monoclonali può portare a una maggiore clearance nel sito di somministrazione e a una minore biodisponibilità, in linea con i nostri risultati. In un altro rapporto, Sharma et al hanno scoperto che cariche di dominio estremamente variabili potrebbero comportare una clearance degli anticorpi monoclonali più rapida [41].

Ci si aspettava inoltre che le differenze specifiche dell'anticorpo monoclonale nel tasso di assorbimento dallo spazio interstiziale sottocutaneo ai capillari linfatici, rappresentate nel modello dal fattore di scala S_{LymUpt}^{SC} , fossero correlate con la PPC, ma non è questo il caso. È noto che il trasporto di anticorpi monoclonali attraverso la matrice extracellulare è influenzato dalle interazioni elettrostatiche e dall'esclusione sterica; l'esclusione sterica rende la velocità di diffusione più lenta con un maggiore contenuto di acido ialuronico nella matrice extracellulare e un maggiore peso molecolare del farmaco, con la possibile influenza della forma molecolare. Pertanto, ci si aspetterebbe che gli anticorpi monoclonali più carichi positivamente vengano trasportati all'interno della matrice extracellulare più lentamente a causa della loro maggiore interazione con i componenti del tessuto. Tuttavia, le differenze in alcuni fattori esterni e interni (ad es. esclusione sterica, formulazione, livello di attività fisica, sede dell'iniezione sottocutanea, anestesia) possono limitare questa relazione. Di conseguenza, qualsiasi influenza della carica positiva della CDR in prossimità degli anticorpi monoclonali potrebbe non essere rilevabile utilizzando il modello.

Sulla base della nostra modellizzazione e degli anticorpi monoclonali analizzati, possiamo affermare che la metrica PPC non è correlata alle differenze stimate nel parametro specifico del modello per l'anticorpo monoclonale legato al trasporto diffusivo/convettivo ($S_{diff-conv}$), suggerendo che altri fattori, non basati sulla carica, potrebbero essere responsabili di queste differenze. Inoltre, le differenze in $S_{diff-conv}$ sono superiori a quelle dovute alle differenze nel peso molecolare dell'anticorpo monoclonale, poiché il modello incorpora la teoria dei due pori basata proprio sul peso molecolare. Altri fattori non considerati possono influenzare il trasporto convettivo, che dipende dalla differenza tra il gradiente di pressione idrostatica e il gradiente di pressione osmotica, come la struttura della parete capillare (es. diametro dei pori paracellulari) e le condizioni fisiologiche dei soggetti.

Nello sviluppo del modello presentato in questo rapporto, sono stati utilizzati gruppi di profili medi di concentrazione plasmatica degli anticorpi monoclonali ottenuti da più di 30 rapporti di letteratura. Pertanto, le differenze in questi studi dovute, ad esempio, all'età, al sesso, al peso, allo stato fisiologico del soggetto, nonché alla formulazione dell'anticorpo monoclonale e al sito di somministrazione non possono essere incorporate come covariate esplicative. Invece, gli effetti di queste differenze sono rappresentati come variabilità nei quattro parametri specifici stimati del modello per l'anticorpo monoclonale, risultando così in una sovrastima della variabilità di queste proprietà. Data la disponibilità di sole concentrazioni plasmatiche di anticorpi monoclonali, gli autori non sono stati in grado di valutare la capacità del modello di predire la farmacocinetica di organi/tessuti.

In sintesi, è stato formulato un modello farmacocinetico fisiologico basato sull'intero organismo per predire la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali dopo la somministrazione sottocutanea per supportare gli studi traslazionali. Data la sua base fisiologica, il modello sviluppato ci consente di: (1) ottenere approfondimenti meccanicistici sugli eventi che determinano l'assorbimento sottocutaneo

di anticorpi monoclonali e facilitare un'ulteriore ottimizzazione della somministrazione sottocutanea, (2) spiegare l'influenza sulla farmacocinetica sistemica mediante l'alternanza della regione variabile dell'anticorpo, (3) supportare gli studi traslazionali nell'uomo per la somministrazione sottocutanea di anticorpi monoclonali. Questo modello fornisce anche il potenziale per prevedere la concentrazione degli anticorpi monoclonali nei tessuti periferici, mettendo le basi per la progettazione di intervalli di dosaggio efficaci e per strategie nel processo di sviluppo degli anticorpi monoclonali.

4.3 Considerazioni finali

Nel primo modello sono stati utilizzati il punto isoelettrico, la clearance, la proteolisi e vari parametri relativi al sito di iniezione sottocutanea e al sistema linfatico per valutare la biodisponibilità e l'assorbimento degli anticorpi monoclonali. Successivamente sono stati fatti studi per mettere in relazione anche punto isoelettrico e clearance tra di loro.

Nel secondo modello sono stati messi in correlazione la carica locale delle CDR (complementary determining region) e il punto isoelettrico con i parametri relativi alla pinocitosi, al trasporto diffusivo/convettivo e alla clearance.

Nei modelli sono state utilizzate delle ipotesi semplificative per quanto riguarda la clearance, trovando in entrambi i casi risultati coerenti con altri studi riportati in letteratura. Un altro aspetto comune tra i due modelli è stato quello di non considerare l'elevata variabilità tra i soggetti, e quindi l'influenza di fattori come il peso, l'età, il sesso sui parametri fisiologici.

Invece, una differenza sostanziale tra i due studi riguarda il punto isoelettrico. Nel primo modello, infatti, viene utilizzato per calcolare la clearance; nel secondo, invece, è stato scoperto che sono necessarie differenze nel suo valore di più di un'unità per produrre un cambiamento rilevante nella clearance, ma i 12 anticorpi avevano un intervallo troppo ristretto per trovare una relazione significativa.

In conclusione, dopo questa analisi, si possono fare delle considerazioni sui modelli. Entrambi sono in grado di stimare i parametri riguardanti la farmacocinetica degli anticorpi monoclonali dopo una somministrazione sottocutanea; tuttavia, il modello basato sull'intero organismo è in grado di fare lo stesso anche nel caso di una somministrazione endovenosa e viene anche utilizzato per fare simulazioni su questi parametri. Con il modello minimo, invece, si ottengono dei buoni risultati usando un approccio più elementare grazie alle semplificazioni, ma proprio a causa di queste si ha una descrizione meno dettagliata dei valori fisiologici relativi ai distretti periferici.

Bibliografia

- [1] Manis JP. Overview of therapeutic monoclonal antibodies. <https://www.uptodate.com/contents/search>
- [2] Monoclonal antibodies. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/monoclonal-antibodies>
- [3] Zhao L, Ji P, Li Z, Roy P, Sahajwalla CG. (2013) The antibody drug absorption following subcutaneous or intramuscular administration and its mathematical description by coupling physiologically based absorption process with the conventional compartment pharmacokinetic model.
- [4] Charman SA, Segrave AM, Edwards GA, Porter CJ. (2000) Systemic availability and lymphatic transport of human growth hormone administered by subcutaneous injection.
- [5] Covell DG, Barbet J, Holton OD, et al. (1986) Pharmacokinetics of monoclonal immunoglobulin G1
- [6] Baxter LT, Zhu H, Jain RK, et al. (1995) Biodistribution of Monoclonal Antibodies: Scale-up from Mouse to Human Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model
- [7] Ferl GZ, Wu AM, DiStefano JJ (2005) A predictive model of therapeutic monoclonal antibody dynamics and regulation by the neonatal Fc receptor (FcRn)
- [8] Zhao L, Ji P, Li Z, et al. (2013) The antibody drug absorption following subcutaneous or intramuscular administration and its mathematical description by coupling physiologically based absorption process with the conventional compartment pharmacokinetic model
- [9] Gill KL, Gardner I, Li L, Jamei M (2016) A Bottom-Up Whole-Body Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Mechanistically Predict Tissue Distribution and the Rate of Subcutaneous Absorption of Therapeutic Proteins
- [10] Offman E, Phipps C, Edginton AN (2016) Population physiologically based pharmacokinetic model incorporating lymphatic uptake for a subcutaneously administered pegylated peptide
- [11] Glassman PM, Balthasar JP (2016) Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict the clinical pharmacokinetics of monoclonal antibodies
- [12] Li T, Balthasar JP (2019) Development and Evaluation of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Predicting the Effects of Anti-FcRn Therapy on the Disposition of Endogenous IgG in Humans
- [13] Aldo Rescigno (2003) Foundations of Pharmacokinetics
- [14] Ninad Varkhede, M. Laird Forrest (2018) Understanding the Monoclonal Antibody Disposition after Subcutaneous Administration using a Minimal Physiologically based Pharmacokinetic Model
- [15] Margaris K, Black RA. (2012) Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities
- [16] Ying M, Pang B. (2009) Three-dimensional ultrasound measurement of cervical lymph node volume. *Br J Radiol.*

- [17] Shihao Hu, David Z. D'Argenio (2020) Predicting monoclonal antibody pharmacokinetics following subcutaneous administration via whole-body physiologically based modeling
- [18] D'Argenio David Z, Schumitzky Alan WX (2009) ADAPT 5 User's Guide: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Systems Analysis Software
- [19] Li Z, Shah DK (2019) Two-pore physiologically based pharmacokinetic model with de novo derived parameters for predicting plasma PK of different size protein therapeutics
- [20] Mellor RH, Stanton AWB, Azarbod P, et al. (2000) Enhanced Cutaneous Lymphatic Network in the Forearms of Women with Postmastectomy Oedema
- [21] Kim H, Fariss RN, Zhang C, et al. (2008) Mapping of the Neonatal Fc Receptor in the Rodent Eye
- [22] Richter WF, Jacobsen B. Subcutaneous Absorption of Biotherapeutics: Knowns and Unknowns
- [23] Liu S, Xie B, Wei W, Hui M, Su Z. Design and preparation of chimeric hyaluronidase as a chaperone for the subcutaneous administration of biopharmaceuticals
- [24] Ryman JT, Meibohm B (2017) Pharmacokinetics of monoclonal antibodies
- [25] Raybould MIJ, Marks C, Krawczyk K, et al. (2019) Five computational developability guidelines for therapeutic antibody profiling
- [26] McLennan DN, Porter CJH, Charman SA (2005) Subcutaneous drug delivery and the role of the lymphatics
- [27] Wang W, Chen N, Shen X, Cunningham P, Fauty S, Michel K, Wang B, Hong X, Adreani C, Nunes CN. Lymphatic transport and catabolism of therapeutic proteins after subcutaneous administration to rats and dogs
- [28] Okumura K, Komada F, Hori R. Fate of porcine and human insulin at the subcutaneous injection site. I. degradation and absorption of insulins in the rat
- [29] Cai WW, Fiscella M, Chen C, Zhong ZJ, Freimuth WW, Subich DC. Bioavailability, pharmacokinetics, and safety of belimumab administered subcutaneously in healthy subjects
- [30] Xu Z, Wang Q, Zhuang Y, Frederick B, Yan H, Bouman-Thio E, Marini JC, Keen M, Snead D, Davis HM. Subcutaneous bioavailability of golimumab at 3 different injection sites in healthy subjects
- [31] Gill KL, Machavaram KK, Rose RH, Chetty M. Potential sources of inter-subject variability in monoclonal antibody pharmacokinetics
- [32] Stanton AWB, Modi S, Mellor RH, et al. (2006) A quantitative lymphoscintigraphic evaluation of lymphatic function in the swollen hands of women with lymphoedema following breast cancer treatment
- [33] Watanabe RM, Volund A, Bergman RN (1991) Intravenous insulin infusion to simulate subcutaneous absorption. Bioavailability and metabolic sequelae
- [34] Trubetsky VS, Whiteman KR, Torchilin VP, Wolf GL (1998) Massage-induced release of subcutaneously injected liposome-encapsulated drugs to the blood

- [35] Freckmann G, Pleus S, Westhoff A, et al. (2012) Clinical Performance of a Device That Applies Local Heat to the Insulin Infusion Site: A Crossover Study
- [36] Thomas JR, Yocum RC, Haller MF, Flament J (2009) The INFUSE-Morphine IIB Study: Use of Recombinant Human Hyaluronidase (rHuPH20) to Enhance the Absorption of Subcutaneous Morphine in Healthy Volunteers
- [37] Shpilberg O, Jackisch C (2013) Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase
- [38] Boswell CA, Tesar DB, Mukhyala K, et al. (2010) Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics
- [39] Datta-Mannan A, Thangaraju A, Leung D, et al. (2015) Balancing charge in the complementarity-determining regions of humanized mAbs without affecting pI reduces non-specific binding and improves the pharmacokinetics
- [40] Bumbaca Yadav D, Sharma VK, Andrew Boswell C, et al. (2015) Evaluating the Use of Antibody Variable Region (Fv) Charge as a Risk Assessment Tool for Predicting Typical Cynomolgus Monkey Pharmacokinetics
- [41] Sharma VK, Patapoff TW, Kabakoff B, et al. (2014) In silico selection of therapeutic antibodies for development: Viscosity, clearance, and chemical stability
- [42] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server