



MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3226888 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 14/54 (2006.01.01)

- A61P 1/04 (2006.01.01)
- A61P 3/06 (2006.01.01)
- A61P 7/00 (2006.01.01)
- A61P 9/00 (2006.01.01)
- A61P 13/12 (2006.01.01)
- A61K 38/00 (2006.01.01)
- A61P 1/00 (2006.01.01)
- A61P 19/10 (2006.01.01)
- A61P 19/02 (2006.01.01)
- A61P 9/10 (2006.01.01)
- A61P 17/06 (2006.01.01)
- A61P 27/02 (2006.01.01)
- A61P 43/00 (2006.01.01)
- A61P 27/00 (2006.01.01)
- A61P 29/00 (2006.01.01)
- A61P 31/04 (2006.01.01)
- A61P 35/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2017 0156  (22) Data de depozit: 2015.12.01  (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 15832692.6, 2015.12.01  (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3226888, 2017.10.11  (31) Numărul cererii prioritare: 201462086054 P  (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2014.12.01  (33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 08/2021, 2021.08.31  (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 16/2021, 2021.04.21  (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2017, 2017.12.31</p>
<p>(71) Solicitant: FERRING B.V., NL  (72) Inventatori: COTTINGHAM Ian, CH; PETRI Niclas Axel, DK  (73) Titular: FERRING B.V., NL  (74) Mandatar autorizat: CORCODEL Angela</p>	

(54) Administrarea unui inhibitor de trans-semnalizare a IL-6 selectiv

(57) Rezumat:

1  
Un inhibitor selectiv de semnalizare IL-6-trans poate fi utilizat pentru a trata o varietate de afecțiuni mediate de IL-6, inclusiv boli inflamatorii și cancer. Inhibitorul poate fi administrat în siguranță la oameni la o varietate de doze. Mai mult, inhibitorul reduce efectele dăunătoare asociate cu alți inhibitori

2  
IL-6, cum ar fi scăderea numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și a nivelurilor de proteine C-reactive.

Secvențe: 2  
Revendicări: 15  
Figuri: 8

MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

**(54) Administration of a selective il-6-trans-signalling inhibitor****(57) Abstract:**

1  
A selective IL-6-trans-signalling inhibitor can be used to treat a variety of IL-6-mediated conditions, including inflammatory diseases and cancer. The inhibitor can safely be administered to humans at a variety of doses. Moreover, the inhibitor lessens

2  
deleterious effects associated with other IL-6 inhibitors such as lowering neutrophil counts, platelet counts and levels of C-reactive protein.

Sequences: 2

Claims: 15

Fig.: 8

**Descriere:****(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

## REFERINȚĂ LA CERERILE DE BREVET DE INVENȚIE ASOCIATE

5 Această cerere revendică dreptul de prioritate al cererii de brevet de invenție provizorii U.S. Nr. 62/086054, înregistrată pe 1 decembrie, 2014, al cărui conținut este încorporat în conținut în întregime.

## STADIUL TEHNICII

10 IL-6 este o citokină pleiotropă produsă de celule hematopoietice și non-hematopoietice, de exemplu ca răspuns la infecție și leziuni tisulare. IL-6 își exercită multiplele activități biologice prin două căi principale de semnalizare, așa-numita cale clasică a receptorului ligandului prin IL-6R legat de membrană prezent în principal pe hepatocite și anumite leucocite și o cale de *trans*-semnalizare prin sIL-6R circulant provenind din clivajul proteolitic al IL-6R legat de membrană sau din îmbinarea alternativă.

15 În calea clasică, IL-6 se leagă direct de IL-6R legat de membrană pe suprafața unei game limitate de tipuri de celule. Complexul IL-6/IL-6R se asociază cu un dimer pre-format al proteinei receptorului gp130 care transduce semnalul, provocând modificări sterice în homodimerul gp130 și inițiind astfel o cascadă de semnalizare intracelulară. Semnalizarea clasică este responsabilă pentru mecanismele inflamatorii acute de apărare și funcțiile fiziologice cruciale ale IL-6, cum ar fi creșterea și semnalele regenerative pentru celulele epiteliale intestinale.

20 Domeniile extracelulare ale IL-6R și gp130 pot fi generate fără domeniile de ancorare a membranei prin traducerea ARNm imbinat alternativ, rezultând variante sIL-6R și sgp130. În plus, domeniul extracelular al IL-6R poate fi eliminat de proteazele legate de membrană ale familiei dezintegrină A și metaloprotează (ADAM) (la om, ADAM17) pentru a genera sIL-6R. În procesul de *trans*-semnalizare, sIL-6R se leagă de IL-6, formând un complex agonistic care se leagă de dimerii *trans*-membranari gp130 prezenți pe o multitudine de tipuri de celule care nu exprimă IL-6R legat de membrană; Semnalizarea IL-6 de către traductorii de semnal și activatorii de transcripție (STAT) este apoi indusă în celule care în mod normal nu răspund la IL-6. Activitatea complexului IL-6/sIL-6R este controlată în mod normal de nivelurile de sgp130 prezente în circulație care concurează efectiv cu gp130 legat de membrană. *Trans*-semnalizarea este implicată în principal în inflamația cronică și s-a demonstrat că împiedică populația de celule T mucozale care promovează boala să intre în apoptoză.

35 Ar fi de dorit să existe o moleculă care să imite inhibitorul natural de *trans*-semnalizare sgp130, dar cu o afinitate de legare mai mare și, în consecință, o activitate inhibitoare mai puternică. Mai mult, ar fi de dorit să existe o moleculă care să poată fi administrată oamenilor cu toxicitate minimă și potențial imunogen.

## EXPUNEREA PE SCURT A INVENȚIEI

40 În prezent s-a constatat că un inhibitor de *trans*-semnalizare a IL-6 selectiv poate fi administrat la oameni fără efecte dăunătoare semnificative într-un interval mare de dozare. Mai mult, s-a constatat în mod surprinzător că timpul de înjumătățire terminală al inhibitorului permite dozarea pe o perioadă de o săptămână, o dată la două săptămâni (adică fiecare altă săptămână), lunar sau chiar mai frecvent.

45 În anumite realizări, invenția include un inhibitor (de exemplu, un dimer polipeptidic așa cum este dezvăluit în conținut) pentru tratamentul unei boli inflamatorii sau a unei afecțiuni mediate de IL-6, în care polipeptida este administrată la o doză de 0,5 mg până la 5 g. Invenția include, de asemenea, o metodă de tratare a bolilor inflamatorii prin administrarea inhibitorului (de exemplu, un dimer polipeptidic așa cum este dezvăluit în conținut), în care doza de inhibitor este de la 0,5 mg până la 5 g. Invenția include în plus utilizarea unui astfel de inhibitor la fabricarea unui medicament pentru tratarea unei boli inflamatorii la doza indicată. De preferință, este tratat un om.

50 În alte realizări, invenția include un dimer polipeptidic așa cum este dezvăluit în conținut pentru tratarea unei afecțiuni mediate de IL-6 fără scăderea semnificativă a numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și/sau a nivelurilor de proteină C- reactivă sau fără a reduce numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C- reactivă sub un interval normal la subiecții sănătoși sau la pacienții care suferă de o afecțiune mediată de IL-6. Invenția include, de asemenea, utilizarea dimerului polipeptidic într-o metodă de tratare a unei afecțiuni mediate de IL-6 prin administrarea unui dimer polipeptidic așa cum este dezvăluit în conținut, în care metoda nu scade semnificativ numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau

nivelurile de proteina C-reactivă. Invenția include în plus utilizarea unui astfel de dimer polipeptidic la fabricarea unui medicament pentru tratarea unei afecțiuni mediate de IL-6 fără a reduce semnificativ numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C-reactivă. De preferință, este tratat un om.

#### 5 DESCRIEREA PE SCURT A FIGURILOR

10 FIG. 1 prezintă calea de trans-semnalizare a IL-6. sIL-6R generat din ARNm imbinat alternativ sau clivaj proteolitic este capabil să se lege de IL-6 pentru a forma un complex IL-6/sIL-6 care se leagă de gp130 prezent pe marea majoritate a tipurilor de celule ale corpului și induce o cascadă de semnalizare intracelulară.

FIG. 2 prezintă faptul că un dimer polipeptidic cuprinzând doi monomeri din SECV ID NR: 1 nu interferează cu legarea IL-6 de IL-6R legat de membrană (semnalizare clasică), ci se leagă selectiv de complexul IL-6/sIL-6R și previne trans-semnalizarea.

15 FIG. 3 prezintă profiluri după perfuzie i.v. de Peptidă 1 (panoul din stânga) la 0,75 mg, 7,5 mg, 75 mg, 150 mg, 300 mg, 600 mg și 750 mg și injecție s.c. (panoul din dreapta) la 60 mg (2 x 2mL).

FIG. 4 prezintă profiluri după administrarea intravenoasă la 75 mg, 300 mg și 750 mg la subiecți sănătoși (panoul din stânga) și pacienții cu CD în remisie clinică (panoul din dreapta).

FIG. 5 prezintă profiluri după administrarea intravenoasă la 75 mg, 300 mg și 750 mg o dată pe săptămână timp de 4 săptămâni la subiecți sănătoși.

20 FIG. 6 prezintă predicțiile modelului utilizând un model PK structural cu 2 compartimente (linie continuă) și date observate (cercuri) în testul 000115.

FIG. 7 prezintă secvența de nucleotide și aminoacizi ai subunității gp130-Fc unice.

FIG. 8 prezintă elemente de secvență de nucleotide ale plasmidei de expresie pFER02.

#### 25 DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Inhibitorii preferați ai invenției includ un dimer de doi monomeri gp130-Fc de fuziune (de exemplu, doi monomeri din SECV ID NR: 1). În forma sa activă, polipeptida din SECV ID NR: 1 există ca un dimer legat de două legături disulfură la Cys623 și Cys626 (FIG. 2). SECV ID NR: 2 corespunde secvenței de aminoacizi a unui monomer de fuziune gp130-Fc având peptida semnal endogenă. Peptida semnal este îndepărtată în timpul sintezei proteinei, cu rezultat în producerea polipeptidului din SECV ID NR: 1.

35 Dimerii polipeptidici descriși în conținut inhibă selectiv trans-semnalizarea excesivă (FIG. 1) și induc apoptoza celulelor T dăunătoare implicate în boli inflamatorii multiple. Dimerul polipeptidic țintește și neutralizează complexe IL-6/sIL-6R și, prin urmare, este de așteptat să inhibe doar *trans*-semnalizarea IL-6 în concentrații terapeutice dorite, lăsând intacte semnalizarea clasică și numeroasele sale funcții fiziologice, precum și mecanismele sale inflamatorii acute de apărare (FIG. 2). Se teoretizează faptul că dimerul polipeptidic nu poate interfera cu semnalizarea clasică a IL-6 din cauza împiedicării sterice; porțiunea Fc nu poate fi introdusă într-o membrană celulară, făcând porțiunea gp130 indisponibilă pentru legarea la complexul IL-6/sIL-6R legat de membrană. Astfel, dimerul polipeptidic este de așteptat să aibă o eficacitate similară cu blocarea globală a IL-6 (de exemplu, tocilizumab, sirukumab), dar cu mai puține efecte secundare.

40 Dimerii polipeptidici descriși în conținut conțin de preferință monomeri gp130-Fc având secvența corespunzătoare din SECV ID NR: 1. În anumite realizări, monomerii au secvența corespunzătoare din SECV ID NR: 2. În anumite realizări, dimerii polipeptidici descriși în conținut conțin polipeptide având cel puțin 90%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 99,5% identitate de secvență față de SECV ID NR: 1 sau SECV ID NR: 2. De preferință, polipeptida cuprinde domeniul gp130 D6 (în special aminoacizii TFTTPKFAQGE: pozițiile aminoacizilor 585-595 din SECV ID NR: 1), AEGA în regiunea balama a domeniului Fc (pozițiile aminoacizilor 609-612 din SECV ID NR: 1) și nu cuprinde un linker între porțiunea gp130 și domeniul Fc. Într-un exemplu de realizare preferat, dezvoltarea furnizează un dimer polipeptidic cuprinzând doi monomeri având o secvență de aminoacizi de cel puțin 90% identitate de secvență față de SECV ID NR: 1, în care secvența de aminoacizi cuprinde domeniul gp130 D6, AEGA în regiunea balama a domeniului Fc, și nu există nici un linker prezent între porțiunea gp130 și domeniul Fc. Într-o realizare preferată, dezvoltarea furnizează un dimer polipeptidic cuprinzând doi monomeri având o secvență de aminoacizi de cel puțin 90% identitate de secvență față de SECV ID NR: 2, în care secvența de aminoacizi cuprinde domeniul gp130 D6, AEGA în regiunea balama a domeniului Fc, și nu există nici un linker prezent între porțiunea gp130 și domeniul Fc.

60 Este de dorit ca polipeptidele să fie substanțial lipsite de fragmente de galactoză-alfa-1,3-galactoză, deoarece acestea sunt asociate cu un răspuns imunogen. S-a constatat în mod surprinzător că dimerii invenției au niveluri scăzute de astfel de porțiuni. În realizări preferate, dimerul polipeptidic conține nu mai mult de 6% galactoză-alfa-1,3-galactoză per mol polipeptidă.

De preferință, dimerul polipeptidic nu conține mai mult de 4 moli %, 3 moli %, 2 moli %, 1 mol %, 0,5 mol %, 0,2 mol %, 0,1 mol % sau chiar un nivel nedetectabil de galactoză-alfa-1,3-galactoză (de exemplu, măsurat prin WAX-HPLC, NP-HPLC sau WAX, de preferință așa cum este determinat prin WAX-HPLC). În alte realizări, dimerul polipeptidic conține mai puțin de 6%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2% sau chiar 0,1% de galactoză-alfa-1,3-galactoză, în raport cu cantitatea totală de glican, fie pe bază masică, fie molară.

De asemenea, este de dorit ca o polipeptidă conform invenției să fie sialilată. Aceasta are avantajul de a crește timpul de înjumătățire al polipeptidelor conform invenției. Fiecare lanț al dimerului polipeptidic conține 10 site-uri de N-glicozilare; nouă site-uri de N-glicozilare sunt situate în porțiunea gp130 și un situs de N-glicozilare este localizat în porțiunea Fc. Prin urmare, polipeptida conține un total de 20 de site-uri de glicozilare. În anumite exemple de realizare, o medie de cel puțin 52% sau cel puțin 54% de glican pe polipeptidă include un reziduu de acid sialic, cum ar fi o medie de la 52-65% (de exemplu, măsurată prin WAX-HPLC, NP-HPLC sau WAX, preferabil determinat prin WAX-HPLC). De preferință, polipeptida conform invenției are o greutate moleculară aproximativă de 220 kDa; fiecare 93 kDa având o greutate moleculară suplimentară de ~ 20 kDa derivată din 10 lanțuri de N-glicozilare.

Este, de asemenea, de dorit să se minimizeze măsura în care polipeptidele formează agregate, care este denumită în conținut oligomerizare, ceea ce are ca rezultat agregate oligomerice. "Agregatele oligomerice", așa cum sunt utilizate în conținut, nu se referă la peptida dimerizată activă. În schimb, termenul se referă la cel puțin un dimer de dimeri activi. S-a constatat în mod surprinzător faptul că dimerii peptidici conform invenției prezintă niveluri reduse de agregare. În anumite realizări, mai puțin de 5%, mai puțin de 4%, mai puțin de 3%, mai puțin de 2%, mai puțin de 1,5% sau chiar mai puțin de 1,0% din polipeptidă este prezentă ca un oligomer. Conținutul de oligomer poate fi măsurat, de exemplu, prin cromatografie de excludere a dimensiunii - dispersare a luminii cu unghi multiplu (SEC-MALS) sau SEC-UV.

De preferință, dimerul polipeptidic este prezent în forma sa de lungime completă (de exemplu, include doi monomeri de lungime completă, de exemplu, din SECV ID NR: 1). Cu toate acestea, cultura celulară poate produce o variantă trunchiată menționată în conținut ca forma gp130 unică (SGF). SGF este o moleculă cu două lanțuri legată covalent, un lanț cuprinzând un monomer gp130-Fc de lungime completă (de exemplu, din SECV ID NR: 1) și un al doilea lanț cuprinzând un monomer gp130-Fc trunchiat (de exemplu, o trunchiere a SEC ID NR: 1), al cărui al doilea lanț include domeniul Fc și lipsește cea mai mare parte sau totalitatea domeniului gp130 (de exemplu, terminat înainte de secvența linker către regiunea Fc). Studiile efectuate până în prezent demonstrează că SGF nu are un amino-terminal eterogen. SGF poate fi formată la niveluri consistente într-un bioreactor și, odată formată, nivelurile SGF nu sunt ușor modificate în timpul purificării, procesării sau condițiilor de depozitare accelerată. Nivelurile SGF pot fi dificil de îndepărtat în timpul purificării datorită proprietăților fizico-chimice similare formei de lungime completă a dimerului polipeptidic; astfel, eforturile de eliminare a SGF pot duce la o reducere semnificativă a randamentului. S-a constatat în mod surprinzător că dimerii polipeptidici conform invenției sunt aproape întotdeauna de lungime întreagă. În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde dimeri polipeptidici care conțin nu mai mult de 4,0% în greutate, 3,0% în greutate, 2,0% în greutate sau chiar 1,5% în greutate de polipeptide care sunt o variație trunchiată a polipeptidei din SECV ID NR.: 1 în ceea ce privește polipeptidele din SECV ID NR.: 1. În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde nu mai mult de 4,0% în greutate, 3,0% în greutate, 2,0% în greutate sau chiar 1,5% în greutate de polipeptide care sunt o variație trunchiată a polipeptidei din SECV ID NR: 2 în raport cu polipeptidele din SECV ID NR: 2.

#### *Dozare*

Dozele descrise în conținut reprezintă un interval de doze despre care se teoretizează faptul că sunt sigure și tolerabile, pe baza datelor de fază I. Alți compuși care țintesc IL-6R sau IL-6 au prezentat adesea, în studiile clinice timpurii, scăderea numărului de neutrofile și trombocite și niveluri mai scăzute de proteina C-reactivă (CRP) atât la subiecții sănătoși, cât și la pacienții cu RA. Cu toate acestea, nivelurile observate ale numărului de neutrofile și trombocite la subiecții sănătoși dozați cu polipeptida conform invenției au fost încă în intervalul normal. Se pare, din rezultatele programului de fază I, că polipeptida conform invenției nu prezintă aceleași efecte asupra biomarkerilor precum compușii care țintesc IL-6R sau IL-6.

În cele două studii cu dimerii polipeptidici cuprinzând monomeri cu SECV ID NR: 1, un test de măsurare *ex vivo* a nivelului de activare a STAT 3 prin stimularea probelor de sange integral de la subiecții cu hiper-IL-6 a fost utilizat ca o evaluare a activității medicamentului. Nivelurile de concentrație ale polipeptidei cuprinzând monomeri de SECV ID NR: 1 peste 1 μg/mL sunt considerate a fi legate de semnalul suprimat la linia de bază în testul mesagerului

secundar (STAT3). Nivelul de concentrație al dimerilor polipeptidici cuprinzând monomeri cu SECV ID NR: 1 ar corespunde nivelurilor maxime ale dozei de 7,5 mg. O doză de 75 mg administrată sub formă de i.v. a demonstrat că perfuzia are o concentrație de peste 1 µg/ml la starea de echilibru pentru un interval de dozare de o săptămână. Doza corespunzătoare administrată la fiecare două săptămâni este de 300 mg. Se teoretizează faptul că 60 mg administrate ca injecție subcutanată se consideră că vor avea aceeași stare de echilibru pentru dozare în fiecare săptămână.

În anumite realizări, doza este de la 0,5 mg până la 5 g dimer polipeptidic. De exemplu, doza poate fi de la 5 mg până la 3 g, 10 mg până la 2 g, 60 mg până la 1 g sau preferabil de la 60 mg până la 750 mg.

Dimerii polipeptidici pot fi administrați la o frecvență adecvată pentru starea dorită. În anumite realizări, dimerul polipeptidic este dozat o dată la 7-60 de zile. De exemplu, dimerii polipeptidici pot fi dozați o dată la 7-30 zile sau 7-20 zile. În realizările preferate, doza apare săptămânal (o dată la 7 zile) sau bisăptămânal (o dată la 14 zile). Dozele pot avea loc, de asemenea, zilnic sau de două sau trei ori pe săptămână. O doză se referă la un singur episod de dozare, indiferent dacă doza este o formă de dozare unitară sau mai multe forme de dozare unitare luate împreună (de exemplu, ingestia a două sau mai multe pastile, primirea a două sau mai multe injecții). După cum s-a discutat mai jos, această frecvență a dozei nu a putut fi anticipată din studiile pe animale. Studiile clinice la om au constatat un timp de înjumătățire mediu de 4,6 zile până la 5,5 zile. În schimb, maimuțele cynomolgus au avut un timp de înjumătățire de numai 0,7 zile când li s-au administrat dimerii polipeptidici intravenos și 1,4-1,5 zile subcutanat.

Dimerul polipeptidic conform invenției este administrat în mod tipic parenteral, cum ar fi intravenos sau subcutanat. Administrarea poate avea loc conform uneia dintre frecvențele de dozare descrise în conținut.

În anumite realizări, dimerul polipeptidic este administrat intravenos, dozat o dată la 7-60 de zile cu o doză de la 60 mg până la 1 g.

În anumite astfel de realizări, dimerul polipeptidic este administrat intravenos, dozat o dată la 7-30 zile cu o doză de la 60 mg până la 1 g.

Intr-o realizare, dimerul polipeptidic este administrat intravenos, dozat săptămânal cu o doză de la 60 mg până la 1 g.

Intr-o altă realizare, dimerul polipeptidic este administrat intravenos, dozat bisăptămânal cu o doză de la 60 mg până la 1 g.

În anumite realizări, dimerul polipeptidic este administrat subcutanat, dozat o dată la 7-60 zile cu o doză de la 60 mg până la 600 g.

În anumite realizări, dimerul polipeptidic este administrat subcutanat, dozat o dată la 7-30 de zile cu o doză de la 60 mg până la 600 g.

Intr-o realizare, dimerul polipeptidic este administrat subcutanat, dozat o dată pe săptămână cu o doză de la 60 mg până la 600 g.

Intr-o altă realizare, dimerul polipeptidic este administrat subcutanat, dozat o dată la două săptămâni cu o doză de la 60 mg până la 600 g.

#### *Siguranță*

Dimerul polipeptidic cuprinzând monomeri cu SECV ID NR: 1 a fost administrat până la 750 mg ca doză unică și 600 mg o dată pe săptămână timp de 4 săptămâni. Profilul de siguranță al polipeptidei a fost favorabil, cu puține evenimente adverse care au apărut în toate grupurile de tratament, inclusiv în grupul placebo, toate fiind ușoare sau moderate. Nu au fost observate tendințe aparente legate de doză în ceea ce privește incidența sau frecvența evenimentelor adverse. Nu au existat tendințe aparente legate de doză sau modificări legate de tratament în semnele vitale, ECG sau parametrii de chimie clinică. Au apărut trei evenimente de reacții la perfuzie, toate au fost ușoare/moderate, cu simptome cutanate, cum ar fi urticarie și umflături, și s-au rezolvat rapid fără sechele.

În general, dimerul polipeptidic cuprinzând monomeri cu SECV ID NR: 1 a fost sigur și bine tolerat atunci când a fost administrat i.v. până la 600 mg o dată pe săptămână timp de 4 săptămâni și până la 750 mg ca doză unică.

Riscul potențial al polipeptidei cuprinzând monomeri cu SECV ID NR: 1 la om poate fi, de asemenea, abordat indirect prin analiza studiilor clinice care investighează compuși similari care țintesc IL-6R sau IL-6. Până în prezent, nu există un compus aprobat care să blocheze aceeași cale de semnalizare precum acest dimer polipeptidic, adică să țintească și să neutralizeze complexul IL-6/sIL-6R pentru a inhiba calea de trans-semnalizare, fără nici o interacțiune cu IL-6 sau IL-6R individual. Cu toate acestea, există experiențe cu compuși care țintesc receptorii IL-6. Unul dintre acești compuși este tocilizumab, care a fost aprobat în Europa și Statele Unite.

Tocilizumab se leagă în mod specific atât la receptorii IL-6 solubili, cât și la cei legați de membrană și s-a demonstrat că inhibă semnalizarea mediată de sIL-6R și mL-6R.

Cele mai frecvente reacții adverse raportate la pacienții cu RA tratați cu tocilizumab (care au apărut la  $\geq 5\%$ ) au fost infecții ale tractului respirator superior, nazofaringită, cefalee, hipertensiune și ALT crescută. Cele mai grave reacții adverse la medicament au fost infecții grave, complicații ale diverticulitelor și reacții de hipersensibilitate. În urma tratamentului cu tocilizumab au apărut scăderi ale numărului de neutrofile și trombocite. Scăderea numărului de neutrofile sub  $10^9/L$  a apărut la 3,4% dintre pacienții tratați cu tocilizumab 8 mg/kg plus medicamente antireumatice modificatoare de boală (DMARD). Aproximativ jumătate dintre pacienții care au dezvoltat un ANC  $< 10^9/L$  au prezentat acest lucru în decurs de 8 săptămâni de la începerea terapiei. Scăderi sub  $5 \times 10^8/L$  au fost raportate la 0,3% pacienți cărora li s-a administrat tocilizumab 8 mg/kg și DMARD. Neutropenia severă poate fi asociată cu un risc crescut de infecții grave, deși nu a existat o asociere clară între scăderea neutrofilelor și apariția infecțiilor grave în studiile clinice cu tocilizumab până în prezent. Evenimentele raportate în timpul perfuziei au fost în primul rând episoade de hipertensiune; evenimentele raportate în decurs de 24 de ore de la terminarea perfuziei au fost dureri de cap și reacții cutanate (erupții cutanate, urticarie). Aceste evenimente nu au limitat tratamentul. Au fost raportate reacții de hipersensibilitate semnificative clinic asociate cu tocilizumab și care au necesitat întreruperea tratamentului la un total de 13 din 3.778 pacienți (0,3%) tratați cu tocilizumab în timpul studiilor clinice controlate și deschise. Aceste reacții au fost observate în general în timpul celei de-a doua până la a cincea perfuzii de tocilizumab. Perforațiile gastro-intestinale, în special la pacienții cu antecedente de diverticulită, au fost raportate ca evenimente rare, atât în studiile clinice cu tocilizumab, cât și după punerea pe piață. Etiologia este neclară, dar pacienții cu RA prezintă un risc în general crescut de perforații atât ale tractului gastrointestinal superior, cât și al celui inferior (indiferent de terapia DMARD); riscul este cel mai mare la pacienții cu RA cu tratament cu glucocorticoizi, AINS sau cu antecedente de diverticulită. Anafilaxia fatală a fost raportată după autorizarea introducerii pe piață în timpul tratamentului cu tocilizumab. Trebuie remarcat faptul că pacienții cu RA pot avea alte boli de fond ca factori de confuzie.

Deoarece dimerul polipeptidic cuprinzând monomeri din SECV ID NR: 1 este o proteină de fuziune de primă clasă, comparațiile cu diferiți produși de anticorpi monoclonali cu mecanisme de acțiune diferite au o valoare limitată. Spre deosebire de alte produse care blochează complet activitatea IL-6, se teoretizează faptul că acest dimer polipeptidic interferează doar cu complexul IL-6/sIL-6R, lăsând accesibilă calea IL-6 legată de membrană.

IL-6 are o implicare largă în răspunsurile imune și inflamatorii din organism. Când atât IL-6R solubil, cât și legat de membrană este blocat, există potențial un risc crescut de infecții și alte boli imuno-dependente, precum și un răspuns inflamator mai puțin proeminent. Deși nu dorește să fie legat de teorie, se teoretizează faptul că tratamentul cu dimerul polipeptidic cuprinzând monomeri din SECV ID NR: 1, care țintesc doar complexul IL-6/sIL-6R, ar preveni perpetuarea inflamației intestinale cronice în IBD și păstrează răspunsul inflamator în fază acută activat de semnalizarea clasică a IL-6, reducând astfel riscul de infecții oportuniste. Cu toate acestea, nu s-a putut anticipa dacă există o concentrație de dimer polipeptidic conform invenției, peste care semnalizarea clasică a IL-6 ar fi afectată. Astfel, datele din prezenta demonstrează în mod surprinzător că există un impact mai mic asupra semnalizării clasice a IL-6 în raport cu alte tratamente care țintesc activitatea IL-6.

Pe baza datelor prezentate în conținut, un avantaj al dimerului polipeptidic al invenției este că acesta poate avea un efect mai mic asupra numărului de neutrofile, numărului de trombocite și/sau nivelurilor de proteină C-reactivă decât alți compuși care inhibă IL-6. În anumite realizări, dimerul polipeptidic al invenției nu scade semnificativ numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C-reactivă sau fără scăderea numărului de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteine C-reactive sub un interval normal la subiecți sănătoși sau pacienți care suferă de o afecțiune mediată de IL-6. De exemplu, administrarea dimerului polipeptidic la o cantitate de doză descrisă în conținut menține numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C-reactivă într-un interval fiziologic normal. În anumite realizări, numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C-reactivă sunt cu mai mult de 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10% sau 5% mai mici decât limita inferioară a valorii intervalului fiziologic normal. Măsurarea numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și/sau a nivelurilor de proteina C-reactivă poate avea loc imediat după tratament, la o zi după, trei zile după tratament, o săptămână după tratament, două săptămâni după tratament, o lună după tratament, trei luni după tratament, șase luni după tratament sau la un an după tratament.

Determinarea numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și a nivelurilor de proteină C-reactivă poate fi efectuată prin orice număr de analize bine cunoscute în domeniu.

Numărul de neutrofile, denumit și numărul absolut de neutrofile (ANC) este o măsură a numărului de granulocite neutrofile prezente în sange (a se vedea, de exemplu, Al-Gwaiz LA, Babay HH (2007). "The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections". Med Princ Pract 16 (5): 344-7). Valorile fiziologice normale pentru proteina C-reactivă la bărbați și femei adulte sunt de 0-5,00 mg/L (de exemplu, prin turbidimetrie). Valorile fiziologice normale pentru neutrofile la femei adulte sunt de  $1,61-6,45 \times 10^9$  per L (valoare absolută, de exemplu, prin citometrie cu flux laser) sau 37,9-70,5% (calculat); la bărbații adulți, valorile corespunzătoare sunt  $1,46-5,85 \times 10^9$  per L și 38,2-71,5%. Valorile fiziologice normale pentru trombocite la femei adulte sunt de  $173-369 \times 10^9$  per L (de exemplu, prin măsurarea impedanței de înaltă frecvență); la bărbații adulți, valorile corespunzătoare sunt  $155-342 \times 10^9$  per L.

Dimerul polipeptidic al invenției, de preferință, nu induce în mod semnificativ formarea de anticorpi (de exemplu, anticorpi împotriva dimerului polipeptidic) la om. Chiar mai preferabil, anticorpii nu sunt anticorpi neutralizanți. În anumite realizări, anticorpii împotriva dimerului polipeptidic conform invenției sunt detectabili la mai puțin de 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% sau 0,01% dintre subiecții sau pacienții tratați. De obicei, limita de detecție este de aproximativ 9 ng/ml ser.

#### Indicații

În inflamația acută, s-a demonstrat că IL-6 induce răspunsul de fază acută în ficat ducând la eliberarea cascadei de proteine de fază acută, în special CRP. Prin formarea unui complex cu sIL-6R format de neutrofile apoptotice la locul inflamației și legarea complexului de *trans*-semnalizare a IL-6/sIL-6R rezultat la traductorul de semnal gp130 de pe celulele endoteliale, IL-6 induce expresia chemokinelor precum proteina chimiotactică monocitară (MCP) -1 și atrage celulele mononucleare. Acest lucru duce la rezolvarea inflamației acute și la inițierea unui răspuns imun adaptiv. Astfel, în inflamația acută, complexul IL-6/sIL-6R este suport pentru tranziția între stadiul precoce predominant neutrofil al inflamației și influxul celular mononuclear mai susținut care duce în cele din urmă și la rezolvarea inflamației.

Inflamația cronică, cum ar fi boala Crohn (CD), colita ulcerativă (UC), artrita reumatoidă (RA) sau psoriazisul, este asociată histologic cu prezența celulelor mononucleare, cum ar fi macrofagele și limfocitele, persistând în țesut după ce au fost dobândite pentru rezolvarea fazei inflamatorii acute. În modelele de boli inflamatorii cronice, IL-6 pare să aibă un rol dăunător favorizând acumularea de celule mononucleare la locul leziunii, prin inducerea secreției continue de MCP-1, angio-proliferație și funcții anti-apoptotice pe celulele T.

Boala inflamatorie intestinală (IBD), și anume CD sau UC, este o inflamație cronică care apare în intestinul indivizilor sensibili, despre care se teoretizează faptul că este independentă de un agent patogen specific. Modificările barierei epiteliale ale mucoasei cu permeabilitate intestinală crescută duc la o expunere sporită a sistemului imunitar al mucoasei la antigenele luminale, ceea ce determină o activare inadecvată a sistemului imunitar intestinal la pacienți. Activarea necontrolată a limfocitelor T CD4 + mucozale cu eliberarea consecutivă excesivă de citokine proinflamatorii induce inflamații gastrointestinale patogene și leziuni tisulare. Există un consens că principalele celule imune activate implicate în patogeneza IBD sunt celulele T intestinale și macrofagele.

IL-6 se dovedește a fi o citokină centrală în IBD la om. Pacienții cu CD și UC s-au dovedit a produce niveluri crescute de IL-6 în comparație cu martorii, nivelurile de IL-6 fiind corelate cu activitatea clinică. De asemenea, s-a constatat că pacienții cu CD au niveluri crescute de sIL-6R și, în consecință, complex IL-6/sIL-6R în ser. Celulele mononucleare ale laminei proprii obținute din probe de colon chirurgicale de la pacienți cu CD și UC au arătat că atât celulele T CD4 + cât și macrofagele au produs cantități crescute de IL-6 în comparație cu martorii. S-a descoperit că sIL-6R a fost eliberat prin eliminarea de pe suprafața macrofagelor și a celulelor mononucleare cu producție crescută asociată cu niveluri crescute de IL-6. La pacienții cu CD, celulele T mucozale au prezentat dovezi puternice pentru *trans*-semnalizare a IL-6 cu activarea STAT3, bcl-2 și bcl-x1. Blocarea *trans*-semnalizării IL-6 a provocat apoptoza celulelor T, indicând faptul că sistemul IL-6/sIL-6R mediază rezistența celulelor T la apoptoză în CD.

Astfel, la pacienții cu IBD, acumularea acumulată de celule T CD4 + care promovează boala în lamina propria ducând la perpetuarea inflamației este dependentă în mod critic de *trans*-semnalizarea IL-6/sIL-6R anti-apoptotică. Se teoretizează faptul că, acționând asupra complexului IL-6/sIL-6R, dimerul polipeptidic dezvoltat în conținut este util în tratarea CD și a altor boli inflamatorii.

Astfel, dimerul polipeptidic conform invenției poate trata afecțiunile mediate de IL-6. Stările mediate de IL-6 includ boli inflamatorii sau un cancer. În acest sens, polipeptidele și

compozițiile descrise în conținut pot fi administrate unui subiect care are o boală inflamatorie, cum ar fi artrita idiopatică juvenilă, boala Crohn, colita (de exemplu, colita care nu este asociată cu IBD, inclusiv colita radiațională, colita diverticulară, colita ischemică, colită infecțioasă, boală celiacă, colită autoimună sau colită rezultată din alergiile care afectează colonul), dermatită, psoriazis, uveită, diverticulită, hepatită, sindromul intestinului iritabil (IBS), lupus eritematos, nefrită, boala Parkinson, colită ulcerativă, scleroză multiplă (MS), boala Alzheimer, artrita, poliartrita reumatoidă, astmul și diverse boli cardiovasculare, cum ar fi ateroscleroza și vasculita. În anumite realizări, boala inflamatorie este selectată din grupul format din: diabet, gută, sindrom periodic asociat criopirinei și tulburare pulmonară obstructivă cronică.

De preferință, boala inflamatorie sau afecțiunea mediată de IL-6 este boala inflamatorie intestinală, preferabil în care tratamentul induce remisia bolii inflamatorii intestinale. De preferință, boala inflamatorie intestinală este boala Crohn sau colita ulcerativă, preferabil în care tratamentul menține remisiunea bolii inflamatorii intestinale. De preferință, boala inflamatorie sau afecțiunea mediată de IL-6 este artrita reumatoidă, psoriazisul, uveita sau ateroscleroza. De preferință, boala inflamatorie sau afecțiunea mediată de IL-6 este colita care nu este asociată cu boala inflamatorie intestinală, de preferință în care colita este colită radiațională, colită diverticulară, colită ischemică, colită infecțioasă, boală celiacă, colită autoimună sau colită care rezultă din alergii care afectează colonul.

Pentru bolile inflamatorii, cum ar fi bolile inflamatorii intestinale, tratamentul poate include remisiunea afecțiunii, menținerea remisiunii afecțiunii sau ambele.

Alte realizări furnizează o metodă de tratare, reducere a severității sau prevenirea unui cancer, incluzând, dar fără a se limita la mielom multiplu, leucemie cu celule plasmactice, carcinom cu celule renale, sarcomul Kaposi, cancer colorectal, cancer gastric, melanom, leucemie, limfom, gliom, glioblastom multiform, cancer pulmonar (incluzând, dar nelimitat la cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC; atât adenocarcinom cât și carcinom cu celule scuamoase)), limfom non-Hodgkin, boala Hodgkin, plasmocitom, sarcom, thiomom, cancer de sân, cancer de prostată, carcinom hepatocelular, cancer al vezicii urinare, cancer uterin, cancer pancreatic, cancer esofagian, cancer cerebral, de cap și gât, cancer ovarian, col uterin, cancer testicular, gastric, cancer esofagian, hepatom, leucemie limfoblastică acută (ALL), T-ALL, leucemie mielogenă acută (LMA), leucemie mielogenă cronică (LMC) și leucemie limfocitară cronică (LLC), carcinoame salivare sau alte tipuri de cancer.

Alte realizări ale prezentei dezvoltării furnizează o metodă de tratare, reducere a severității sau prevenirea unei boli selectate din grupul constând din sepsis, resorbție osoasă (osteoporoză), cașexie, oboseală legată de cancer, psoriazis, artrită idiopatică juvenilă cu debut sistemic, lupus eritematos sistemic (LES), glomerulonefrita proliferativă mezangială, hipergamaglobulinemie, boala Castleman, gammopatie IgM, mixom cardiac și diabet autoimun insulino-dependent.

Așa cum este utilizat în conținut, termenii "tratament", "a trata" și "tratare" se referă la inversarea, ameliorarea, întârzierea debutului sau inhibarea progresului unei boli sau tulburări, sau a unuia sau mai multor simptome ale acesteia, așa cum este descris în conținut. În unele realizări, tratamentul poate fi administrat după ce unul sau mai multe simptome s-au dezvoltat. În alte realizări, tratamentul poate fi administrat în absența simptomelor. De exemplu, tratamentul poate fi administrat unei persoane susceptibile înainte de apariția simptomelor (de exemplu, în lumina unui istoric de simptome și/sau în lumina factorilor genetici sau alți factori de susceptibilitate). Tratamentul poate fi continuat și după ce simptomele au dispărut, de exemplu pentru a preveni sau a întârzia reapariția acestora.

Dimerul polipeptidic conform invenției poate fi administrat împreună cu un al doilea agent activ. Al doilea agent activ poate fi unul sau mai mulți dintre acidul 5-aminosalicilic, azatioprina, 5-mercaptopurina și un corticosteroid. Regimurile de dozare pentru administrarea acidului 5-aminosalicilic, azatioprinei, 5-mercaptopurinei și corticosteroidelor sunt binecunoscute unui specialist în domeniu.

Dimerii polipeptidici pot fi produși, de exemplu, prin exprimarea monomerilor, de exemplu monomeri cuprinzând SECV ID NR: 1, în celule. Într-un exemplu de realizare, un vector cuprinzând un acid nucleic care codifică SECV ID NR: 1 sau SECV ID NR: 2 este transfectat în celule. Proiectarea vectorului de expresie, inclusiv selectarea secvențelor de reglare, poate depinde de factori precum alegerea celulei gazdă care urmează să fie transformată, nivelul de exprimare a proteinei dorite și așa mai departe. Secvențele de reglare pentru expresia celulelor gazdă de mamifere includ elemente virale care direcționează niveluri ridicate de exprimare a proteinelor în celule de mamifere, cum ar fi promotorii și/sau potențatorii derivați din LTR retrovirale, citomegalovirus (CMV) (cum ar fi promotorul/amplificatorul CMV), virusul Simian 40 (SV40) (cum ar fi promotorul/amplificatorul SV40), adenovirusul (de exemplu, promotorul tardiv major al adenovirusului (AdMLP)), polioma și promotorii puternici de mamifere, cum ar fi imunoglobulina

nativă și promotorii de actină. Celula gazdă poate fi o celulă de mamifer, insectă, plantă, bacteriană sau de drojdie, de preferință celula este o celulă de mamifer, cum ar fi o celulă CHO.

- 5 Celulele transfectate sunt cultivate pentru a permite celulelor să exprime proteina dorită. Celulele și mediile de cultură sunt apoi colectate și dimerii polipeptidici sunt purificați, de exemplu, prin etape de coloană de cromatografie (de exemplu, MAbSelect Sure, SP Sepharose, Capto Q). Dimerul poate fi, de asemenea, concentrat și/sau tratat cu etape de reducere/inactivare virală. Dimerii rezultați pot fi apoi utilizați pentru a prepara compoziții, preferabil compoziții farmaceutice utile pentru terapie.

## 10 EXEMPLIFICARE

### Exemplul 1

#### Studii pe Animale

#### Exemplul 1a

#### Farmacocinetică Șoareci

- 15 Patru grupuri cu 54 de șoareci (27 masculi și 27 femele) cu greutatea de 25 - 38 g au primit o singură doză de polipeptidă din SECV ID NR: 1 în forma sa dimerizată activă ("Peptida 1"), fie prin i.v. (3 mg/animal) sau s.c. (0,3, 3 și 30 mg/animal) injecție.

- 20 Biodisponibilitatea a fost de aproximativ 60%, iar linearitatea aparentă a dozei a fost observată pentru ASC, ASC și  $C_{max}$ .  $T_{max}$  de 8-24 ore a fost așa cum era de așteptat pentru o proteină. Peptida 1 a fost eliminată lent din circulația sistemică cu un clearance de 142 ml/zi/kg. Volumele de distribuție estimate prin faza de eliminare ( $V_z$ ) și curba primului moment ( $V_{ss}$ ) au fost 397 ml/kg și respectiv 284 ml/kg, indicând faptul că Peptida 1 a fost distribuită în afara patului vascular. Timpul de înjumătățire plasmatică a variat între 1,3 și 2,3 zile.

#### Exemplul 1b

- 25 Farmacocinetică Șobolani

#### Administrare doză unică

- 30 PK doză unică de Peptidă 1 a fost investigată după administrare i.v. și s.c. în două tulpini diferite de șobolani, Sprague Dawley (8 șobolani/grup) și Wistar (24 șobolani/grup), prezentând rezultate oarecum diferite. Clearance-ul (57 și 93 ml/kg/zi, respectiv) și volumul de distribuție par să fie mai mici la șobolanul Sprague Dawley, cu o biodisponibilitate de 2 ori mai mare, cu 60%, comparativ cu aproximativ 30% pentru șobolanul Wistar.  $T_{max}$  a fost observat la 0,5 - 1,5 zile după administrare s.c., iar timpul de înjumătățire plasmatică terminal a fost de aproximativ 2 zile, variind între 1,7 - 2,7 zile, cu diferențe mici între cele două căi de administrare.

#### Administrare doze repetate

- 35 Administrare intravenoasă

- 40 Șobolanii (n = 18) au primit doze i.v. în bolus de 10, 30 și 100 mg/kg/ocazie de două ori pe săptămână timp de 2 săptămâni. Creșterea  $C_{max}$  și ASC după prima administrare păreau să fie aproximativ liniare după doză. Cu toate acestea, expunerea pare a fi constant mai mare la masculi decât la femele la toate nivelurile de doză. Grupul de 100 mg/kg/ocazie a atins niveluri  $C_{max}$  de 2100 μg/mL pentru șobolani masculi și 1740 μg/mL pentru șobolani femele. Valorile AUCt au fost 942 și 642 zile × μg/ml.

- 45 După două săptămâni, expunerea sistemică la Peptida 1 la șobolani a scăzut pentru grupurile de doză de 10 mg/kg și 30 mg/kg. Deoarece răspunsurile anticorpilor anti-medicamente (ADA) au fost confirmate la toate animalele până în săptămâna 8 a studiului, scăderea expunerii așteptate în timp poate fi atribuită clearance-ului mediat de ADA al Peptidei 1.

#### Administrare subcutanată

- 50 În studii de doză repetată s.c de 2 și 4 săptămâni,  $C_{max}$  și ASC după prima administrare păreau să crească aproximativ doză liniar. Cu toate acestea, la ultima doză, s-a observat o expunere la medicamente mai mică, posibil datorită formării de anticorpi; toate animalele testate au prezentat anticorpi împotriva Peptidei 1.

#### Exemplul 1c

#### Farmacocinetică Maimuțe Cynomolgus

#### Administrare doză unică

- 55 PK administrării unice a Peptidei 1 a fost investigat la maimuțele cynomolgus masculi și femele în doze de 0,1 - 100 mg/kg s.c. (n = 4) și 1,0 mg/kg i.v (n = 4). Biodisponibilitatea a fost de aproximativ 60% după administrare s.c. cu un  $t_{max}$  de 6 - 24 de ore. Clearance-ul a fost de 98 ml/zi/kg, iar volumul de distribuție de aproximativ 70-90 ml/kg. Timpul de înjumătățire stabilit după administrarea i.v a fost de 0,68 zile și aproximativ 1,5 zile după administrare s.c..

#### Administrare doze repetate

- 60 Maimuțelor Cynomolgus li s-a administrat s.c. cu 2 (n = 4), 10 (n = 4), 50 (n = 2) sau 100 (n = 2) mg/kg Peptidă 1 de două ori pe săptămână timp de 2 săptămâni și cu 10 (n = 4), 30 (n = 4)

sau 100 (n = 4) mg/kg Peptidă 1 de două ori pe săptămână timp de 4 săptămâni. Expunerea prin intermediul C<sub>max</sub> și ASC au crescut aproximativ doza liniar, iar expunerea similară și concentrația maximă între prima și ultima doză la dozele mai mari au fost observate după 2 săptămâni. Cu toate acestea, după 4 săptămâni, ultima doză administrată a arătat o expunere mai mică la medicament comparativ cu prima administrare, posibil datorită formării de anticorpi. Timpul mediu de înjumătățire plasmatică al Peptidei 1 a variat între 1,0 și 1,8 zile pentru prima administrare în diferitele grupuri de tratament cu un timp de înjumătățire mai scurt după ultima administrare.

#### Exemplul 2

##### 10 Studiu Clinic 000067 (Doză Unică)

###### *Proiectare*

Acesta a fost un studiu cu doză unică, controlat cu placebo, mono orb, randomizat în cadrul dozei, studiu paralel în grup, cu creștere a dozei. Studiul a fost realizat în două părți, în care Partea 1 a inclus subiecți sănătoși, iar Partea 2 a inclus pacienți cu CD în remisie clinică. Obiectivul a fost de a examina siguranța și tolerabilitatea și, dacă este posibil, de a obține semne de efecte farmacologice, după doze unice de Peptidă 1.

15 In Partea 1, au fost incluși 64 de subiecți, dintre care 48 (44 bărbați, 4 femei) au primit tratament activ și 16 (toți bărbații) au primit placebo. Șapte doze au fost investigate și administrate ca perfuzie i.v. timp de 30 de minute (0,75 mg, 7,5 mg, 75 mg) sau 1 oră (150 mg, 300 mg, 600 mg și 750 mg). În plus, 6 subiecți au primit un doza s.c. de 60 mg Peptida 1 și 2 subiecți au primit un doza s.c. de placebo. Peptida 1 a fost administrată la 15 mg/ml în 25 mM histidină, 200 mM zaharoză și 0,1 mg/mL polisorbit 20.

20 In Partea 2, au fost incluși 24 de pacienți, dintre care 18 (11 bărbați, 7 femei), au primit tratament activ (75 mg, 300 mg și 750 mg) și 6 (4 bărbați, 2 femei) au primit placebo, toți administrați prin i.v.

###### *Rezultate*

25 Evaluarea PK după administrările i.v. de Peptidă 1 au arătat proporționalitatea dozei atât pentru ASC cat și pentru C<sub>max</sub> în intervalul 0,75 mg până la 750 mg, concentrațiile C<sub>max</sub> în plasmă variind de la 0,2 până la 170 μg/mL (FIG. 3). Clearance-ul a fost de aproximativ 0,13 L/h, timpul mediu de înjumătățire plasmatică aproximativ 4,5 zile, iar volumul de distribuție aproximativ 20 L, acesta din urmă indicând o anumită distribuție extravasculară. Administrarea s.c a 60 mg de Peptidă 1 a arătat o C<sub>max</sub> de 1,1 μg/ml la 2,3 zile și un timp de înjumătățire de 5,0 zile. Biodisponibilitatea după administrarea s.c a Peptidei 1 a fost calculată ca fiind de aproximativ 50%. Nu a existat nici o indicație privind eliminarea medicamentului mediat de țintă.

30 Administrarea i.v. a 75, 300 și 750 mg la pacienții cu CD în remisie a prezentat rezultate foarte similare cu cele pentru subiecții sănătoși (FIG. 4). ASC și C<sub>max</sub> au fost proporționale cu doza cu concentrațiile C<sub>max</sub> de 16, 76 și 186 μg/ml (16, 77 și 161 μg/mL pentru subiecții sănătoși). Clearance-ul a fost de aproximativ 0,13 L/h, timpul mediu de înjumătățire plasmatică aproximativ 4,6 zile, iar volumul de distribuție aproximativ 22 L.

35 Profilul de siguranță al Peptidei 1 a fost favorabil, cu puține evenimente adverse care au apărut în toate grupurile de tratament, inclusiv în grupul placebo, toate fiind ușoare sau moderate. Nu au fost observate tendințe aparente legate de doză în ceea ce privește incidența sau frecvența evenimentelor adverse. Perfuziile au fost întrerupte la doi subiecți, unul datorat reacțiilor la perfuzie ușoare (Partea 1, grup de 300 mg) și unul datorat reacțiilor la perfuzie moderate (Partea 2, grup de 75 mg).

40 Nu au existat tendințe aparente legate de doză sau modificări legate de tratament în semnele vitale, ECG sau parametrii de chimie clinică (inclusiv numărul de neutrofile, numărul de trombocite sau nivelurile de proteină C-reactivă).

45 Un subiect sănătos din grupul de 300 mg a prezentat anticorpi anti-Peptida 1 emergenți tratamentul non-neutralizare la vizita de urmărire la 5-6 săptămâni după administrare.

50 In general, Peptida 1 a fost sigură și bine tolerată atunci când a fost administrată intravenos până la 750 mg sub formă de doză i.v., și la 60 mg ca o singură doză s.c..

#### Exemplul 3

##### 55 Studiu Clinic 000115 (Doză Crescătoare Multiplă)

###### *Proiectare*

60 Acesta a fost un studiu placebo controlat, dublu-orb, în grupul de doză randomizat, paralel, cu obiectivul de a investiga siguranța, tolerabilitatea și farmacocinetica dozelor crescătoare multiple de Peptidă 1. Dozele investigate au fost de 75, 300 și 600 mg Peptida 1 administrate o dată pe săptămână, timp de 4 săptămâni, de perfuzie i.v. timp de 30 de minute (75 mg) sau 1 oră (300 mg și 600 mg).

Au fost incluși 24 de subiecți sănătoși, dintre care 18 (11 bărbați și 7 femei) au primit tratament activ și 6 (2 bărbați și 4 femei) au primit placebo.

#### Rezultate

5 Evaluarea PK a arătat caracteristici foarte apropiate în prima și ultima zi de tratament și similare cu rezultatele studiului cu doză unică. ASC și C<sub>max</sub> au fost proporționale cu doza după prima și a patra doză cu concentrații de C<sub>max</sub> de 19, 78 și 148 μg/mL după prima doză și 19, 79 și 142 μg/mL după a patra doză (16, 77 și 161 μg/ml pentru doză unică la subiecți sănătoși; FIG. 5). Valorile minime corespunzătoare au fost 0,66, 2,68, 4,56 μg/mL și 0,98, 3,95 și 7,67 μg/mL pentru cele trei niveluri de doză. Timpul mediu de înjumătățire plasmatică calculat după ultima doză a fost de aproximativ 5,5 zile.

10 Profilul de siguranță al Peptidei 1 a fost favorabil, cu puține evenimente adverse care au apărut în toate grupurile de tratament, inclusiv în grupul placebo, toate fiind ușoare sau moderate. Nu au fost observate tendințe aparente legate de doză în ceea ce privește incidența sau frecvența evenimentelor adverse. Un subiect (grup de 600 mg) a fost retras din cauza reacțiilor ușoare la perfuzie.

15 Nu au existat tendințe aparente legate de doză sau modificări legate de tratament în semnele vitale, ECG sau parametrii de chimie clinică (inclusiv numărul de neutrofile, numărul de trombocite sau nivelurile de proteină C-reactivă).

Nu a fost detectat nici un anticorp anti-Peptidă 1 la nici unul dintre subiecți.

20 În general, Peptida 1 a fost sigură și bine tolerată când a fost administrată i.v. până la 600 mg o dată pe săptămână timp de 4 săptămâni.

#### Exemplul 4

##### Modelarea Datelor Farmacocinetice

25 Datele PK din studiul 000115 pot fi descrise în mod adecvat utilizând un model structural cu 2 compartimente. Profilurile prezise de 75, 300 și 600 mg de Peptidă 1 și datele observate sunt prezentate în FIG. 6 și parametrii PK medii estimați sunt enumerați în Tabelul 1.

30 Tabelul 1 Estimări ale Modelului pentru Peptida 1 Utilizând Modelul Farmacocinetic Structural cu 2 compartimente

Parametru	Estimare	SE	CV%
V	1,7 L	0,08	4,8
V <sub>2</sub>	8,8 L	0,32	3,6
CL	3,2 L/zi	0,06	1,8
CL <sub>2</sub>	16,4 L/zi	0,24	14,4

35 Peptida 1 are o afinitate de legare la om de 130 pM față de complexul IL-6/sIL-6R. La doze de 75-600 mg, nivelul de ocupare este mai mare de 90% la nivelurile estimate de starea de echilibru ale Peptidei 1 utilizând afinitatea de legare (K<sub>D</sub>; 130 pM) și nivelurile IL-6/sIL-6R (C<sub>țintă</sub>; 2,0 nM bazat pe sIL-6R).

#### Exemplul 5

##### Prepararea Peptidei 1

##### Clonarea și Exprimarea Peptidei 1 în Celule CHO/dhfr

40 Celulele CHO /dhfr au fost obținute din colecția europeană de culturi celulare (ECACC, nr. 9406067). Celulele CHO /dhfr aderente sunt deficitare în dihidrofolat reductază (DHFR), o enzimă care catalizează reducerea folatului în dihidrofolat și apoi în tetrahidrofolat. Celulele CHO/dhfr prezintă astfel sensibilitate la medicamentul antifolat, metotrexatul (MTX).

45 Linia celulară CHO/dhfr este bine caracterizată și testată. Siguranța liniei celulare parentale CHO/dhfr ca substrat celular pentru producerea de produse biofarmaceutice de uz uman a fost confirmată de ECACC (Porton Down, Marea Britanie) pentru sterilitate microbiană, micoplasmă și virusuri adventive conform 21 CFR.

##### Selecția și Construcția Secvenței ADNc

50 Secvența ADNc a unui monomer al Peptidei 1 (secvența polipeptidică din SECV ID NR: 1) a fost sintetizată ca un singur fragment de ADN prin GeneArt AG (Regensburg, Germania) folosind secvența pentru domeniul extracelular al gp130 (IL6ST, NCBI Gene ID 3572, varianta transcript 1 (NP\_002175), aminoacizii 23-617) și domeniul Fc al IgG1 umane (IGHG1, NCBI Gene ID 3500, aminoacizii 221-447 conform numerotării UE Kabat). Secvența a fost optimizată

pentru utilizarea optimă a codonilor în celulele CHO. Trei mutații punctuale bine caracterizate au fost introduse în regiunea inferioară balama a porțiunii Fc.

5 Secvența ADNc a fost modificată în continuare prin înlocuirea peptidei semnal gp130 originale cu o peptidă semnal IgG de șoarece cu lanț greu de eficacitate cunoscută în sistemele de expresie a celulelor CHO. Peptida semnal este scindată în timpul sintezei proteinelor. Prezența secvenței IgG1 Cys-Pro-Pro-Cys în regiunea Fc are ca rezultat dimerizarea a două subunități identice gp130-Fc prin resturile de sulfhidril din regiunea Fc, care împreună formează Peptida 1.

FIG. 7 prezintă secvența de nucleotide și aminoacizi a subunității gp130-Fc utilizate pentru formarea Peptidei 1.

10 *Construcția Plasmidei de Expresie pentru Selecția Master Cell Bank (MCB)*

ADNc monomer a fost clonat într-un vector de expresie pANTVhG1 (Antitope) care conține gena *dhfr* pentru selecția transfectantului cu MTX după cum urmează: Mai întâi, vectorul de expresie a fost digerat cu enzime de restricție MluI și EagI pentru a permite inserția ADNc Peptida 1. În al doilea rând, regiunea de codificare a monomerului a fost amplificată prin PCR utilizând primerii OL1425 și OL1426 (Tabelul 2) și digerat cu enzime de restricție MluI și EagI. În al treilea rând, fragmentele digerate au fost purificate cu gel și legate împreună pentru a genera vectorul de expresie pFER02. ADNc monomer a fost inserat sub controlul promotorului citomegalovirusului (CMV).

20 Tabelul 3 prezintă funcția elementelor de expresie pFER02. FIG. 8 prezintă secvențele nucleotidice ale elementelor de expresie pFER02.

Tabelul 2 Secvențe de Oligonucleotide Utilizate pentru Amplificarea Regiunii de Codificare a Monomerilor pentru Clonare în pANTVhG1

Primer	Secvență (5'-3') *
OL1425	ctgttgctacgctgtccactccGAGCTGCTGGATCCTTGCGGC
OL1426	gcggggcttgccggcctggcactcaCTTGCCAGGAGACAGAGACAG

\* Secvențele specifice monomerului 1 sunt prezentate cu majuscule, secvențele specifice vectorului sunt prezentate cu litere mici și site-urile de restricție sunt subliniate

25

Tabelul 3 Elemente de Expresie pFER02

Caracteristică	Funcție
Promotor CMV	Promotor/potențator imediat-timpuriu. Permite o expresie eficientă, la nivel înalt, a proteinei recombinante
polyA hIgG1	Secvență de poliadenilare IgG umană
Gena de rezistență la ampicilină (β-lactamază)	Selecția vectorului în <i>E. coli</i>
Promotor timpuriu SV40 și origine	Permite expresia eficientă, la nivel înalt, a genei de rezistență la neomicină și replicarea episomală în celulele care exprimă antigenul T SV40 larg
DHFR	Selectarea transfectanților stabili în celulele CHO <i>dhfr</i>
Semnal de poliadenilare SV40	Terminarea eficientă a transcripției și poliadenilarea ARNm

*Procesul de Selecție a Liniei Celulare care Conduce la Clona Producătoare a Peptidei 1 Finale*

30 Vectorul pFER02 a fost linearizat cu enzima de restricție terminal SspI, care are un singur situs de recunoaștere situat în gena beta-lactamazei. Plasmida linearizată a fost transfectată în 5 x 10<sup>6</sup> celule *CHO/dhfr* folosind transfecția mediată de lipide. La douăzeci și patru de ore după transfecție, celulele transfectate au fost selectate în mediu suplimentat cu 5% ser de vițel fetal dializat (FCS) și 100 nM metotrexat (MTX). Celulele transfectate au fost diluate în acest mediu la diferite densități și distribuite în plăci de cultură tisulară cu 96 de godeuri, cu fund plat. Celulele au fost apoi incubate într-o atmosferă umidificată la 5% CO<sub>2</sub> și 37 °C. S-a adăugat mediu de selecție MTX proaspăt la intervale regulate în timpul incubăției pentru a se asigura că nivelurile MTX și nivelurile de nutrienți au rămas constante.

35

*Selecția Inițială a Liniei Celulare cu Selecția MTX*

Timp de câteva săptămâni după transfecție, plăcile de cultură tisulară au fost examinate folosind un dispozitiv Genetix CloneSelect® Imager și s-a observat că > 2.000 de godeuri au colonii în creștere activă. Supernatanții din aceste godeuri au fost eșantionați și testați pentru titrul Peptidei 1 prin ELISA. Pe baza rezultatelor acestui test, un total de 105 dintre cele mai bune godeuri de exprimare au fost extinse în plăci cu 48 de godeuri. Un total de 83 de linii celulare au fost selectate pentru expansiune în plăci cu 6 godeuri sau baloane T-25; supernatanțul din fiecare dintre liniile celulare a fost prelevat și testat pentru titrul Peptidei 1 (ELISA). Pe baza acestor rezultate, 54 dintre cele mai bune linii celulare de expresie cu caracteristici de creștere optime au fost selectate pentru expansiune în baloane T-75 sau T-175; supernatanții din baloanele confluențe au fost prelevați și titrurile Peptidei 1 au fost cuantificate (ELISA). Compararea nivelurilor de expresie între liniile celulare a permis identificarea celor mai bune 38 de linii celulare care au fost selectate pentru analiza productivității. Productivitatea a fost evaluată după cum urmează:

$$\text{Productivitate (pg/celulă/zi)} = ((Th - Ti) / ((Vh + Vi) / 2)) / \text{timp}$$

15

Unde:

Th este titrul de recoltare [ $\mu\text{g/mL}$ ]Ti este titrul inițial [ $\mu\text{g/mL}$ ]Vh este numărul de celule viabile la recoltare [ $\times 10^6$  celule/ml]20 Vi este numărul inițial de celule viabile [ $\times 10^6$  celule/ml]

Timp este timpul scurs (zile) între Ti și Th

Pe baza rezultatelor productivității (pg/celulă/zi), au fost selectate 13 linii celulare pentru amplificarea genei.

*Amplificare Genetică Conduasă de MTX pentru Selecția Liniei Celulare a Peptidei 1*

25 Cele 13 linii celulare selectate au fost alese pentru prima rundă de amplificare genetică prin presiune selectivă sub concentrații crescânde de MTX (0,1-50 M). După 7-10 zile, supernatanțul din fiecare godeu din fiecare dintre cele 13 linii celulare a fost prelevat și testat pentru titrul Peptidei 1 (ELISA). Godeuri din fiecare linie celulară cu niveluri ridicate de expresie a Peptidei 1 au fost evaluate pentru productivitate (pg/celulă/zi). A doua rundă de amplificare a genei a fost inițiată cu un total de 16 godeuri din linii celulare care au arătat creșteri semnificative ale productivității.

35 A doua rundă de amplificare a genei a fost efectuată în prezența concentrațiilor crescute de MTX; supernatanții din fiecare cultură au fost testați pentru titrul Peptidei 1 (ELISA). Godeurile selectate din fiecare linie celulară au fost extinse și s-a evaluat productivitatea (pg/celulă/zi); au fost identificate cinci linii celulare cu productivitate crescută ca răspuns la presiunea crescută de selecție MTX. Aceste cinci linii celulare au fost progresate la o a treia rundă de amplificare a genei utilizând presiunea de selecție sub concentrație crescută de MTX; supernatanții din fiecare godeu au fost testați pentru titrul Peptidei 1 (ELISA). Godeurile selectate pentru fiecare linie celulară au fost extinse și s-a evaluat productivitatea (pg/celulă/zi); au fost selectate cinci linii celulare care demonstrează o expresie ridicată a Peptidei 1.

40

*Limitarea Diluției Clonelor*

Limitarea clonării prin diluție a fost efectuată pe cele cinci linii celulare care demonstrează expresia Peptidei 1. După o săptămână de incubație, plăcile au fost examinate folosind un Genetix CloneSelect® Imager și s-au identificat colonii unice. Ratele de creștere a două linii celulare în timpul clonării prin diluție au fost observate ca fiind deosebit de lente și astfel aceste linii celulare au fost întrerupte. În total, din cele trei linii celulare rămase, 58 de colonii clonale au fost selectate pentru expansiune, mai întâi în plăci cu 48 de godeuri și apoi extinse succesiv prin plăci cu 12 godeuri, baloane T-25 și baloane T-75 în absența MTX. Fiecare dintre cele 58 de clone selectate a fost apoi evaluată pentru productivitate (pg/celulă/zi); 16 clone au fost selectate pentru adaptarea suspensiei și adaptarea la creștere într-un mediu definit chimic.

50

*Adaptarea Liniilor Celulare la Cultura de Suspensie într-un Mediu Definit Chimic*

55 Cele 16 linii celulare au fost adaptate la cultura de suspensie într-un mediu definit chimic după cum urmează: liniile celulare selectate din cultura aderentă au fost adaptate mai întâi la suspensie atârnat în mediu de creștere a suspensiei CHO (glucoză DMEM ridicată, inclusiv L-glutamină și piruvat de sodiu, 5% FCS dializat, 20 mg/L L-prolină, 1 x penicilină/streptomicină, 1% F68 pluronic) și apoi în mediu de creștere a suspensiei definit chimic (CD Opti-CHO® de la Life Technologies Ltd. (Paisley, Marea Britanie), 2,5% dializat FCS, 0,1 x penicilină/streptomicină, 8 mM Glutamax®).

60 Odată adaptate la cultura de suspensie, liniile celulare au fost stopate, în etape, într-un mediu de creștere a suspensiei definite chimic fără ser (CD Opti-CHO®, 0,1 x penicilină/streptomicină, 8 mM Glutamax®). MTX a fost omis din toate culturile de suspensie.

Liniile adaptate au fost extinse și au fost pregătite băncile de celule de însămânțare. Pe scurt, celulele au fost extinse la 300 ml volum total și recoltate când densitatea celulară a depășit  $0,85 \times 10^6$  celule/ml și viabilitatea a fost  $> 90\%$ . Încă  $3 \times 10^7$  celule au fost însămânțate într-un balon proaspăt conținând 70 ml mediu de creștere a suspensiei pentru creșterea și analiza productivității.

5 Celulele rămase au fost recoltate prin centrifugare și resuspendate într-un volum adecvat de mediu de congelare pentru a produce o suspensie celulară la  $1 \times 10^7$  celule/ml. Flacoanele au fost înghețate până la  $-80^\circ\text{C}$ . Banca de celule a fost apoi transferată în azot lichid pentru depozitare pe termen lung.

10 Cele 16 linii celulare au fost în continuare rafinate până la 5 clone după adaptarea fără ser. Cele 5 clone au fost evaluate pentru creștere (densitate celulară și timp de dublare a celei) și productivitate (pg/celulă/zi), după care au fost selectate 3 clone. O clonă a fost selectată pentru a crea o bancă de celule master.

15 Pregătirea băncii de celule master (MCB) și a băncii de celule de lucru (WCB) a fost efectuată. Un flacon din stocul pre-semințe a fost utilizat pentru prepararea unui MCB de 200 flacoane și un flacon de MCB a fost utilizat pentru a prepara un WCB de 200 flacoane. În fiecare caz, un flacon a fost dezghețat și mediul de crioconservare îndepărtat prin centrifugare. Celulele au fost resuspendate și propagate în volum în mediu de creștere (CD OptiCHO®/4 mM L-glutamină). Patru pasaje au fost efectuate în timpul creării MCB și șase pasaje au fost efectuate în timpul creării WCB.

20 Când s-au obținut suficiente celule, celulele au fost alicotate în mediu de crioconservare (92,5% CD OptiCHO®/7,5% DMSO) în flacoane din polipropilenă (fiecare conținând aproximativ  $1,5 \times 10^7$  celule viabile) și crioconservate prin reducerea temperaturii la  $-100^\circ\text{C}$  pe o perioadă de cel puțin 60 de minute într-un proces de congelare treptată. Flacoanele sunt depozitate într-un recipient de umplere automată cu azot lichid în fază de vapori într-o zonă controlată de GMP.

25 *Descrierea Procesului de Fabricație a Substanței Medicamentoase (DS)*

O scurtă descriere a procesului de fabricație a Peptidei 1 DS este după cum urmează. Celulele dintr-un flacon WCB sunt reactivitate și extinse progresiv folosind mediu fără proteine înainte de inoculare într-un bioreactor de producție. La finalizarea culturii celulare, celulele și resturile celulare sunt îndepărtate prin filtrarea culturii.

30 Purificarea constă din trei etape de coloană cromatografică (MABSelect Sure, SP Sepharose, Capto Q sau Sartobind Phenyl), o etapă de concentrație și diafiltrare și include două etape specifice de reducere/inactivare virală; Tratatamentul cu Triton X-100 (inactivarea virusurilor cu anvelopă) și o etapă de nanofiltrare (eliminarea virusurilor cu anvelopă și fără anvelopă).

35 După concentrare și diafiltrare, se adaugă excipienți pentru formularea DS. Peptida 1 formulată este filtrată  $0,22 \mu\text{m}$  în recipiente.

*Descrierea și Compoziția Produsului Medicamentos (DP)*

40 DP este o soluție sterilă care trebuie administrată prin infuzie i.v. DP constă din Peptida 1 la o concentrație de 15 mg/ml într-o soluție izotonică conținând 25 mM L-histidină, 200 mM zaharoza și 0,1 mg polisorbitat 20/mL la pH 7,6. Flacoanele sunt acoperite cu azot pentru protecție împotriva oxidării. Produsul este destinat unei singure utilizări și depozitare la  $-20^\circ\text{C}$  până la decongelare pentru administrare clinică.

*Compoziția și Formula lotului*

Formula lotului pentru produsul medicamentos este prezentată în Tabelul 4.

45 Tabelul 4 Compoziția Lotului DP

Componenta	Cantitate	Standard calitate
Peptida 1	720 g	Specificație Ferring
L-Histidină	186,18 g	Ph.Eur./USP*
Zaharoza	3286,08 g	Ph.Eur./USP*
Polisorbitat	4,8 g	Ph.Eur./USP*
WFI	ad 49536 g	Ph.Eur./USP*
Hidroxid de sodiu	Cantitate suficientă	Ph.Eur./USP*
Azot	Cantitate suficientă	Ph.Eur./USP*
* Ed. curentă		

## LISTA DE SECVENȚE

## SECVID NR.: 1

Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser Pro Glu Ser Pro Val Val  
 1 5 10 15  
  
 Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys Val Leu Lys Glu Lys Cys  
 20 25 30  
  
 Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr Ile Val Trp Lys Thr Asn  
 35 40 45  
  
 His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr Ile Ile Asn Arg Thr Ala  
 50 55 60  
  
 Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser Leu Asn Ile Gln Leu Thr  
 65 70 75 80  
  
 Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn Val Tyr Gly Ile  
 85 90 95  
  
 Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys Pro Lys Asn Leu Ser Cys  
 100 105 110  
  
 Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys Glu Trp Asp Gly Gly Arg  
 115 120 125  
  
 Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu Lys Ser Glu Trp Ala Thr  
 130 135 140  
  
 His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg Asp Thr Pro Thr Ser Cys  
 145 150 155 160  
  
 Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val Asn Ile Glu Val Trp Val  
 165 170 175  
  
 Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr Ser Asp His Ile Asn Phe

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

17

180	185	190
Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro Pro His Asn Leu Ser Val 195 200 205		
Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu Lys Leu Thr Trp Thr Asn 210 215 220		
Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg 225 230 235 240		
Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile Pro Pro Glu Asp Thr Ala 245 250 255		
Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp Leu Lys Pro Phe Thr Glu 260 265 270		
Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu Asp Gly Lys Gly Tyr Trp 275 280 285		
Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Asp Arg Pro 290 295 300		
Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile Asp Pro Ser His Thr Gln 305 310 315 320		
Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys Thr Leu Pro Pro Phe Glu 325 330 335		
Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val Thr Leu Thr Arg Trp Lys 340 345 350		
Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala Thr Lys Leu Thr Val Asn 355 360 365		
Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Thr Val Arg Asn Leu Val 370 375 380		
Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile Pro Ala Cys Asp Phe Gln		

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

18

385		390	
Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala Phe Pro Lys Asp Asn Met			
	405		410 415
Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu Ser Val Lys Lys Tyr Ile			
	420	425	430
Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala Pro Cys Ile Thr Asp Trp			
	435	440	445
Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr Tyr Leu Arg Gly Asn Leu			
	450	455	460
Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val Thr Pro Val Tyr Ala Asp			
	465	470	475 480
Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Pro			
	485	490	495
Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys Lys Val Gly Lys Asn Glu			
	500	505	510
Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val Asp Val Gln Asn Gly Phe			
	515	520	525
Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr Ile Ile Gly Asn Glu Thr			
	530	535	540
Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu Tyr Thr Leu Ser Ser Leu			
	545	550	555 560
Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met Ala Ala Tyr Thr Asp Glu			
	565	570	575
Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe Thr Thr Pro Lys Phe Ala			
	580	585	590
Gln Gly Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu			

# MD/EP 322688 T2 2021.08.31

19

595	600	605
Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp 610	615	620
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp 625	630	635 640
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly 645	650	655
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn 660	665	670
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp 675	680	685
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro 690	695	700
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu 705	710	715 720
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 725	730	735
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 740	745	750
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 755	760	765
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 770	775	780
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 785	790	795 800
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 805	810	815
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 820		

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

20

## SECVID NR.: 2

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu  
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser  
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys  
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr  
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr  
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser  
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu  
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys  
115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys  
130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu  
145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg  
165 170 175

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

21

Asp	Thr	Pro	Thr	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Thr	Val	Tyr	Phe	Val
			180					185					190		
Asn	Ile	Glu	Val	Trp	Val	Glu	Ala	Glu	Asn	Ala	Leu	Gly	Lys	Val	Thr
		195					200					205			
Ser	Asp	His	Ile	Asn	Phe	Asp	Pro	Val	Tyr	Lys	Val	Lys	Pro	Asn	Pro
	210					215					220				
Pro	His	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Asn	Ser	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu
	225				230					235					240
Lys	Leu	Thr	Trp	Thr	Asn	Pro	Ser	Ile	Lys	Ser	Val	Ile	Ile	Leu	Lys
				245					250					255	
Tyr	Asn	Ile	Gln	Tyr	Arg	Thr	Lys	Asp	Ala	Ser	Thr	Trp	Ser	Gln	Ile
			260					265					270		
Pro	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser	Phe	Thr	Val	Gln	Asp
		275					280					285			
Leu	Lys	Pro	Phe	Thr	Glu	Tyr	Val	Phe	Arg	Ile	Arg	Cys	Met	Lys	Glu
	290					295					300				
Asp	Gly	Lys	Gly	Tyr	Trp	Ser	Asp	Trp	Ser	Glu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ile
	305				310					315					320
Thr	Tyr	Glu	Asp	Arg	Pro	Ser	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Trp	Tyr	Lys	Ile
				325					330					335	
Asp	Pro	Ser	His	Thr	Gln	Gly	Tyr	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Trp	Lys
			340					345					350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Phe	Glu	Ala	Asn	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Tyr	Glu	Val
		355					360					365			
Thr	Leu	Thr	Arg	Trp	Lys	Ser	His	Leu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Val	Asn	Ala
	370					375					380				
Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Asn	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu
	385				390					395					400

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

22

Thr	Val	Arg	Asn	Leu	Val	Gly	Lys	Ser	Asp	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Ile
				405					410					415	
Pro	Ala	Cys	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	His	Pro	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Ala
			420					425					430		
Phe	Pro	Lys	Asp	Asn	Met	Leu	Trp	Val	Glu	Trp	Thr	Thr	Pro	Arg	Glu
		435					440					445			
Ser	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Glu	Trp	Cys	Val	Leu	Ser	Asp	Lys	Ala
	450					455					460				
Pro	Cys	Ile	Thr	Asp	Trp	Gln	Gln	Glu	Asp	Gly	Thr	Val	His	Arg	Thr
465					470					475					480
Tyr	Leu	Arg	Gly	Asn	Leu	Ala	Glu	Ser	Lys	Cys	Tyr	Leu	Ile	Thr	Val
				485					490					495	
Thr	Pro	Val	Tyr	Ala	Asp	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Ser	Ile	Lys	Ala
			500					505					510		
Tyr	Leu	Lys	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Lys	Gly	Pro	Thr	Val	Arg	Thr	Lys
		515					520					525			
Lys	Val	Gly	Lys	Asn	Glu	Ala	Val	Leu	Glu	Trp	Asp	Gln	Leu	Pro	Val
	530					535					540				
Asp	Val	Gln	Asn	Gly	Phe	Ile	Arg	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Tyr	Arg	Thr
545					550					555					560
Ile	Ile	Gly	Asn	Glu	Thr	Ala	Val	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	His	Thr	Glu
				565					570					575	
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Tyr	Met	Val	Arg	Met
			580					585					590		
Ala	Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe
		595					600					605			

# MD/EP 3226888 T2 2021.08.31

23

Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
610						615					620				
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
625					630					635					640
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				645					650					655	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
			660					665					670		
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
		675					680					685			
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
	690					695					700				
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
705					710					715					720
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				725					730					735	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
			740					745						750	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
		755					760					765			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
	770					775					780				
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
785					790					795					800
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				805					810					815	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
			820					825					830		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		835					840								

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- GEORG H WAETZIG ET AL: "Hitting a complex target: an update on interleukin-6 trans-signalling", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, vol. 16, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 225-236, XP055266191, UK ISSN: 1472-8222, DOI: 10.1517/14728222.2012.660307
- EP-A1- 1 148 065
- TENHUMBERG STEPHANIE ET AL: "Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 283, no. 40, October 2008 (2008-10), pages 27200-27207, XP002756654, ISSN: 0021-9258
- J. SOMMER ET AL: "Alternative Intronic Polyadenylation Generates the Interleukin-6 Trans-signaling Inhibitor sgp130-E10", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, no. 32, 8 August 2014 (2014-08-08), pages 22140-22150, XP055265169, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M114.560938
- Uma Thanarajasingam ET AL: "Sirukumab: a novel therapy for lupus nephritis?", Expert Opinion on Investigational Drugs, vol. 23, no. 10, 5 September 2014 (2014-09-05), pages 1449-1455, XP55610024, UK ISSN: 1354-3784, DOI: 10.1517/13543784.2014.950837
- Tom W J Huizinga ET AL: "Sarilumab, a fully human monoclonal antibody against IL-6R[alpha] in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: efficacy and safety results from the randomised SARIL-RA-MOBILITY Part A trial", Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 73, no. 9, 2 December 2013 (2013-12-02), pages 1626-1634, XP055348613, GB ISSN: 0003-4967, DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204405

**(57) Revendicări:**

1. Dimer polipeptidic cuprinzand doi monomeri, fiecare monomer avand cel puțin 90% identitate de secvență față de SECV ID NR: 1, în care monomerii cuprind domeniul gp130 D6 corespunzător aminoacizilor de la pozițiile 585-595 din SECV ID NR: 1, o regiune balama a domeniului Fc cuprinzand aminoacizii de la pozițiile 609-612 din SECV ID NR: 1, și monomerii nu cuprind un linker între porțiunea gp130 și domeniul Fc, pentru utilizare în tratamentul unei boli inflamatorii sau a unei stări mediată de IL-6 la un om, în care dimerul polipeptidic este administrat într-o doză de 60 mg până la 1 g.

2. Dimer polipeptidic cuprinzand doi monomeri, fiecare monomer avand cel puțin 90% identitate de secvență față de SECV ID NR: 1, în care monomerii cuprind domeniul gp130 D6 corespunzător aminoacizilor de la pozițiile 585-595 din SECV ID NR: 1, o regiune balama a domeniului Fc cuprinzand aminoacizii de la pozițiile 609-612 din SECV ID NR: 1, și monomerii nu cuprind un linker între porțiunea gp130 și Fc, pentru utilizare în tratarea unei stări mediată de IL-6 de la un om fără scăderea semnificativă a numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și/sau a nivelurilor de proteină C- reactivă sau fără scăderea numărului de neutrofile, a numărului de trombocite și/sau a nivelurilor de proteină C- reactivă sub un interval normal la subiecții sănătoși sau la pacienții care suferă de o stare mediată de IL-6, în care dimerul polipeptidic este administrat la fiecare 7-20 de zile, preferabil în care dimerul polipeptidic este administrat într-o doză de 60 mg până la 1 g.

3. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 1 sau 2 în care monomerii au SECV ID NR: 1.

4. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care doza este de 60 mg până la 600 mg.

5. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 1, în care dimerul polipeptidic este administrat la fiecare 7-60 de zile, preferabil la fiecare 7-30 de zile.

6. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 5, în care dimerul polipeptidic este administrat la fiecare 7-20 de zile.

7. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 1 sau 2, în care dimerul polipeptidic este administrat la fiecare 7 zile sau la fiecare 14 zile.
8. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care dimerul polipeptidic este administrat parenteral, de preferință intravenos sau subcutanat.
9. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda oricăreia dintre revendicările precedente, în care boala inflamatorie sau starea mediată de IL-6 este boala inflamatorie intestinală, preferabil în care boala inflamatorie intestinală este boala Crohn sau colita ulcerativă.
10. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 9, în care tratamentul induce sau menține remisiunea bolii inflamatorii intestinale.
11. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform oricăreia dintre revendicările 1-8, în care boala inflamatorie sau starea mediată de IL-6 este artrita reumatoidă, psoriazisul, uveita sau ateroscleroza.
12. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 9, în care boala inflamatorie sau afecțiunea IL-6- mediată de este colita care nu este asociată cu boala inflamatorie intestinală.
13. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform revendicării 12, în care colita este colită radiațională, colită diverticulară, colită ischemică, colită infecțioasă, boală celiacă, colită autoimună sau colită care rezultă din alergiile care afectează colonul.
14. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care numărul de neutrofile, numărul de trombocite și/sau nivelurile de proteină C-reactivă sunt menținute într-un interval fiziologic normal după administrarea dimerului polipeptidic.
15. Dimerul polipeptidic pentru utilizare în metoda conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care tratamentul cuprinde suplimentar administrarea unui al doilea agent activ, preferabil în care cel de al doilea agent activ este acidul 5-aminosalicilic, azatioprina, 5-mercaptopurina sau un corticosteroid.

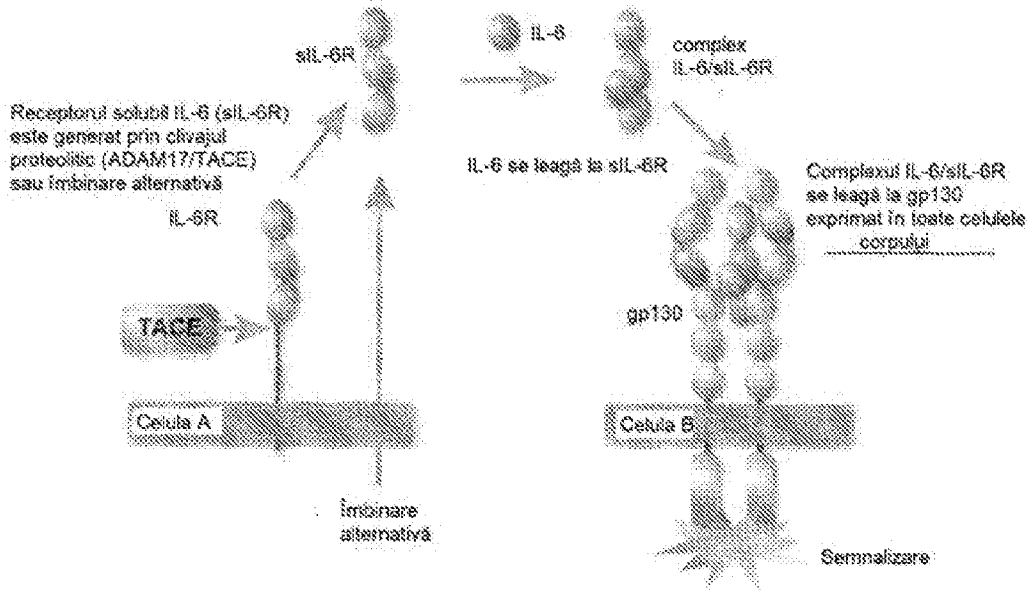


FIG. 1

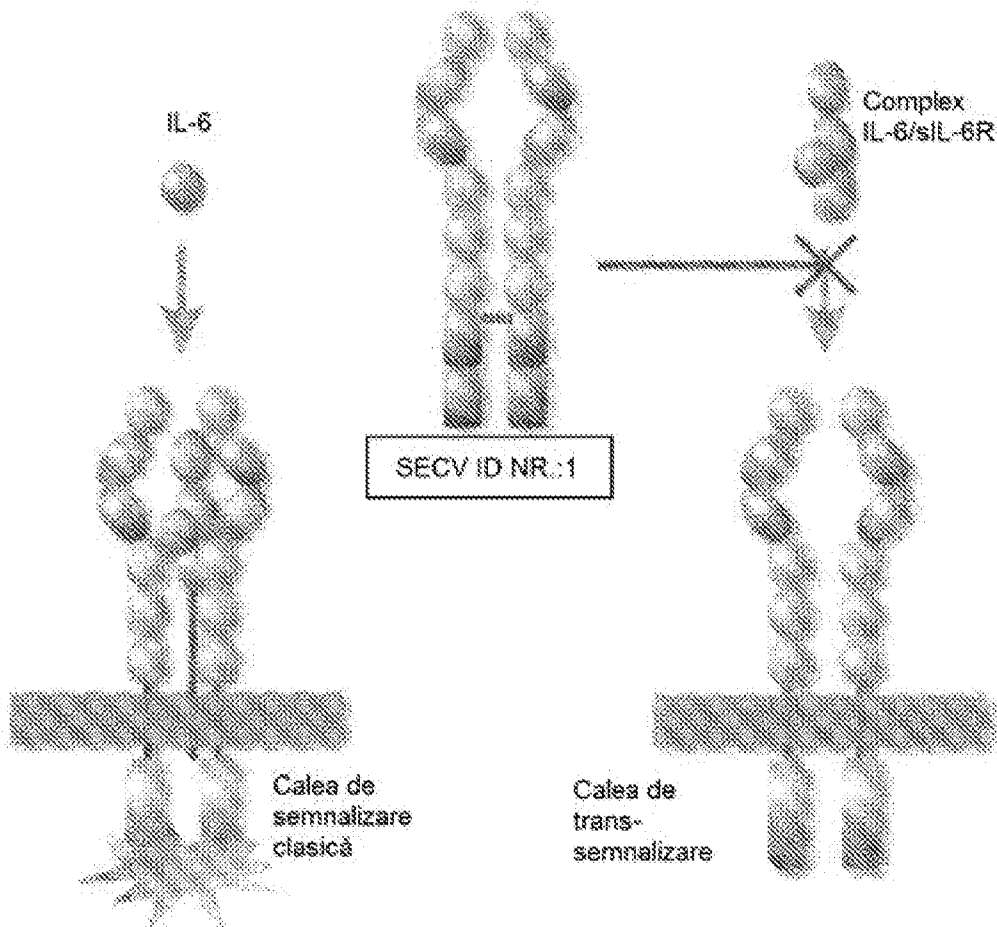


FIG. 2

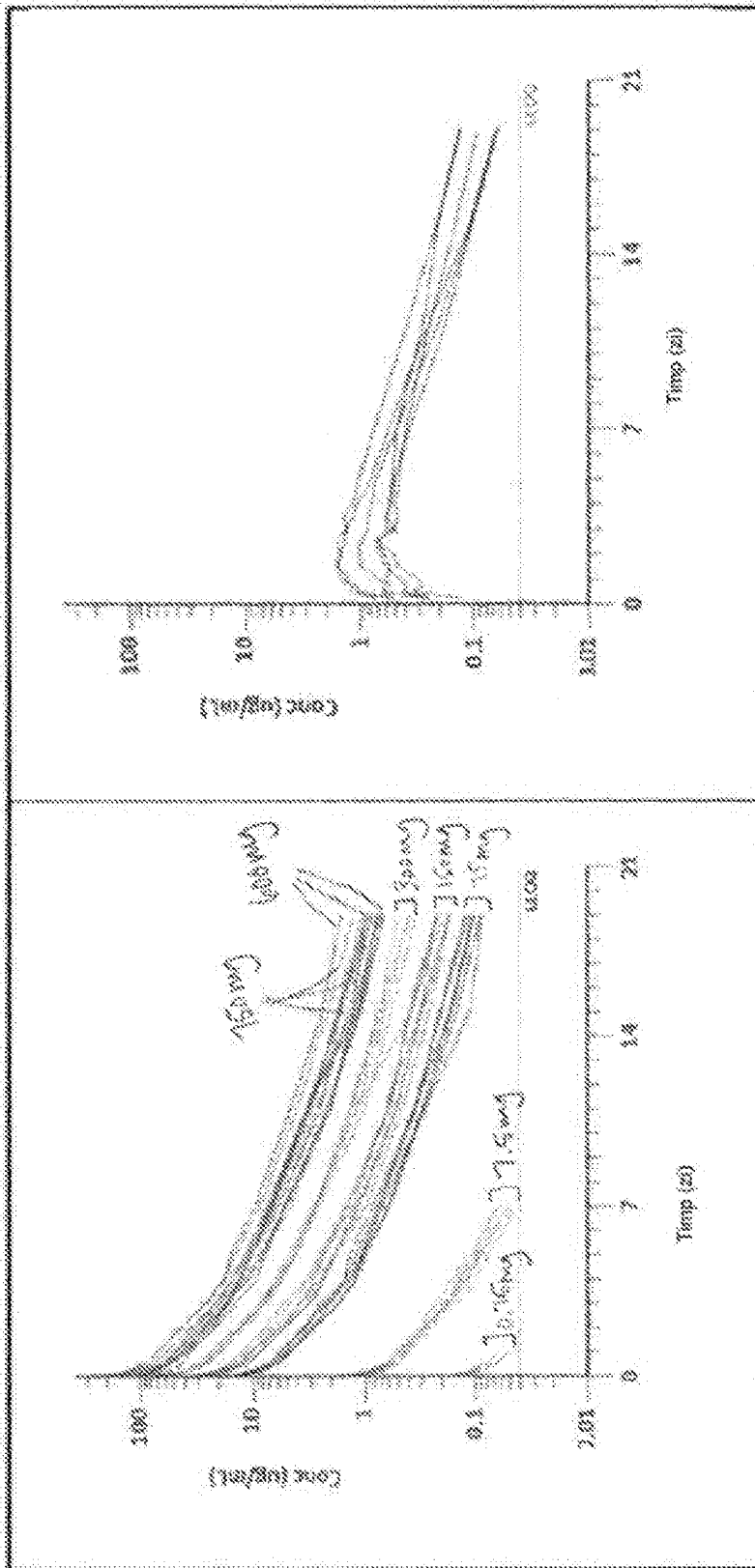


FIG.3

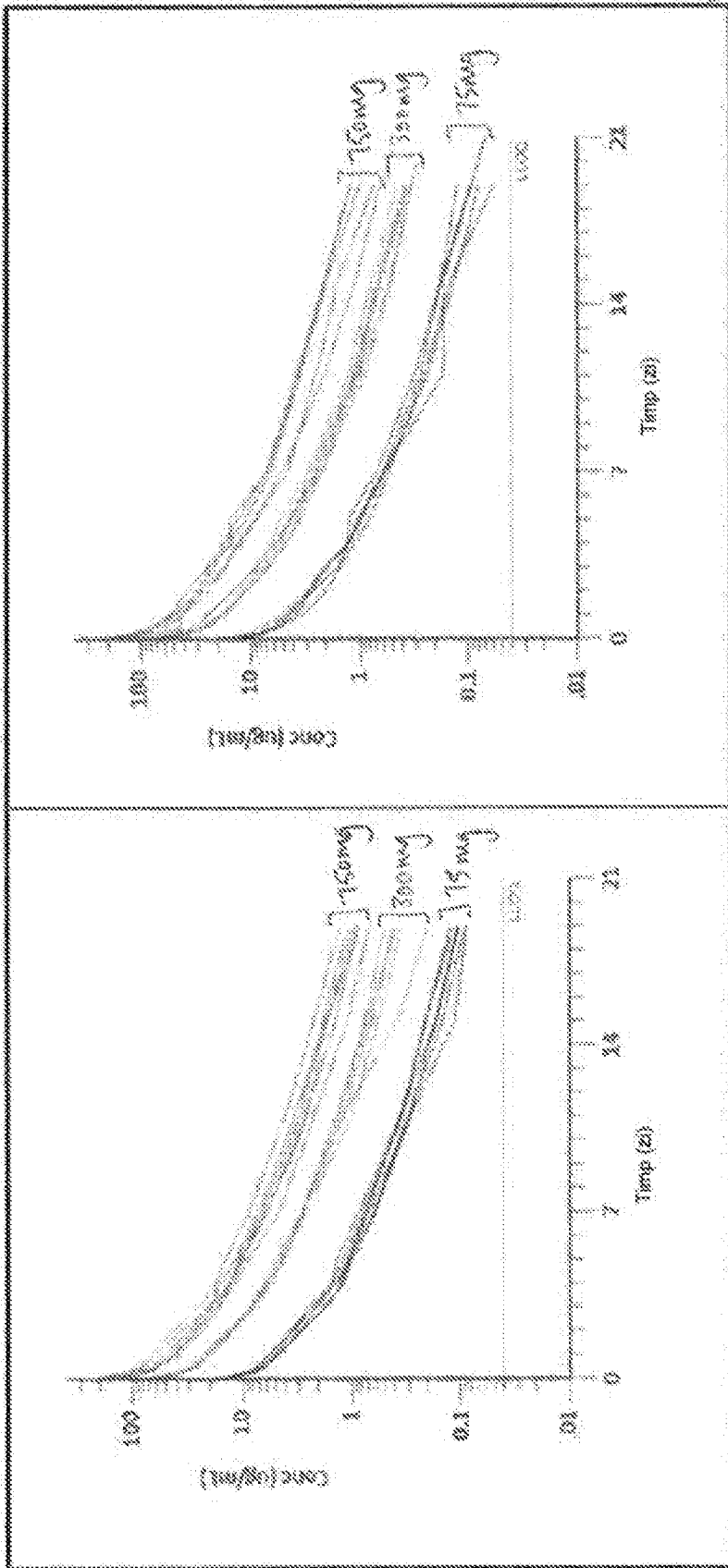


FIG. 4

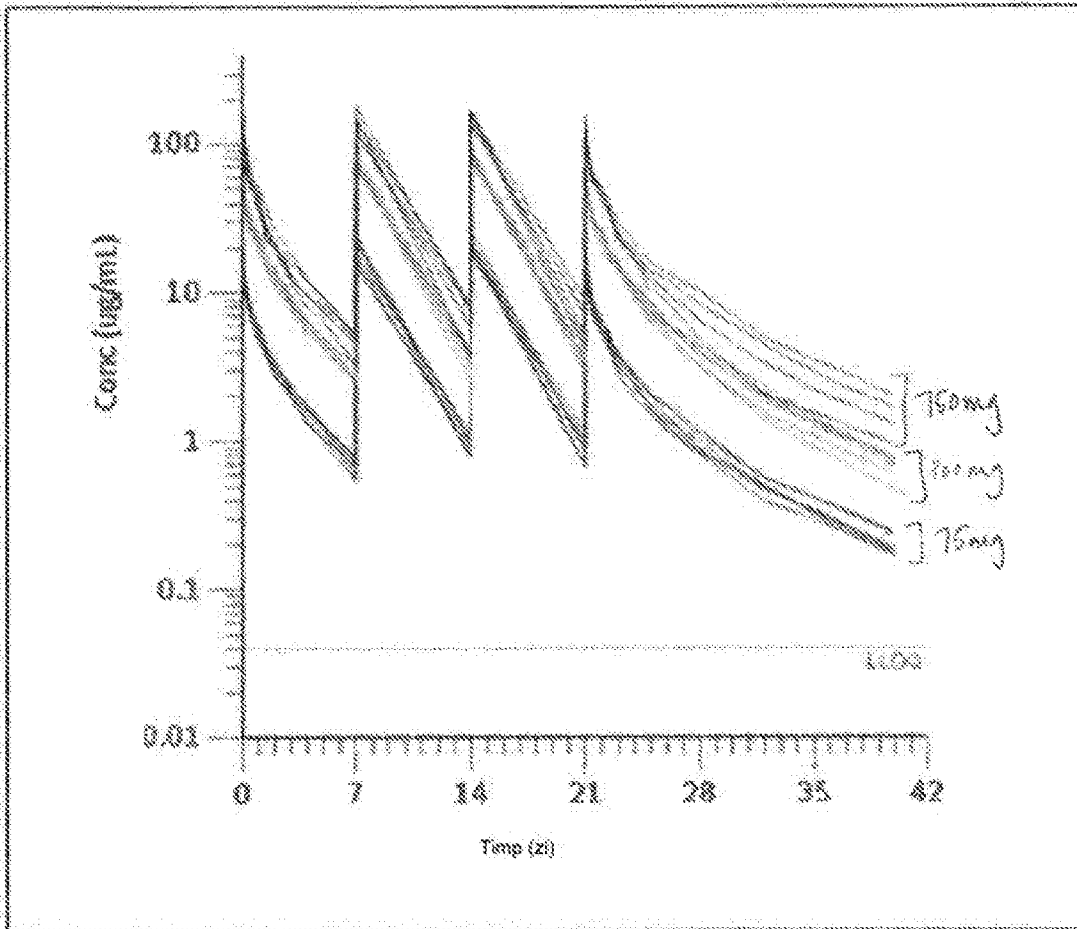


FIG.5

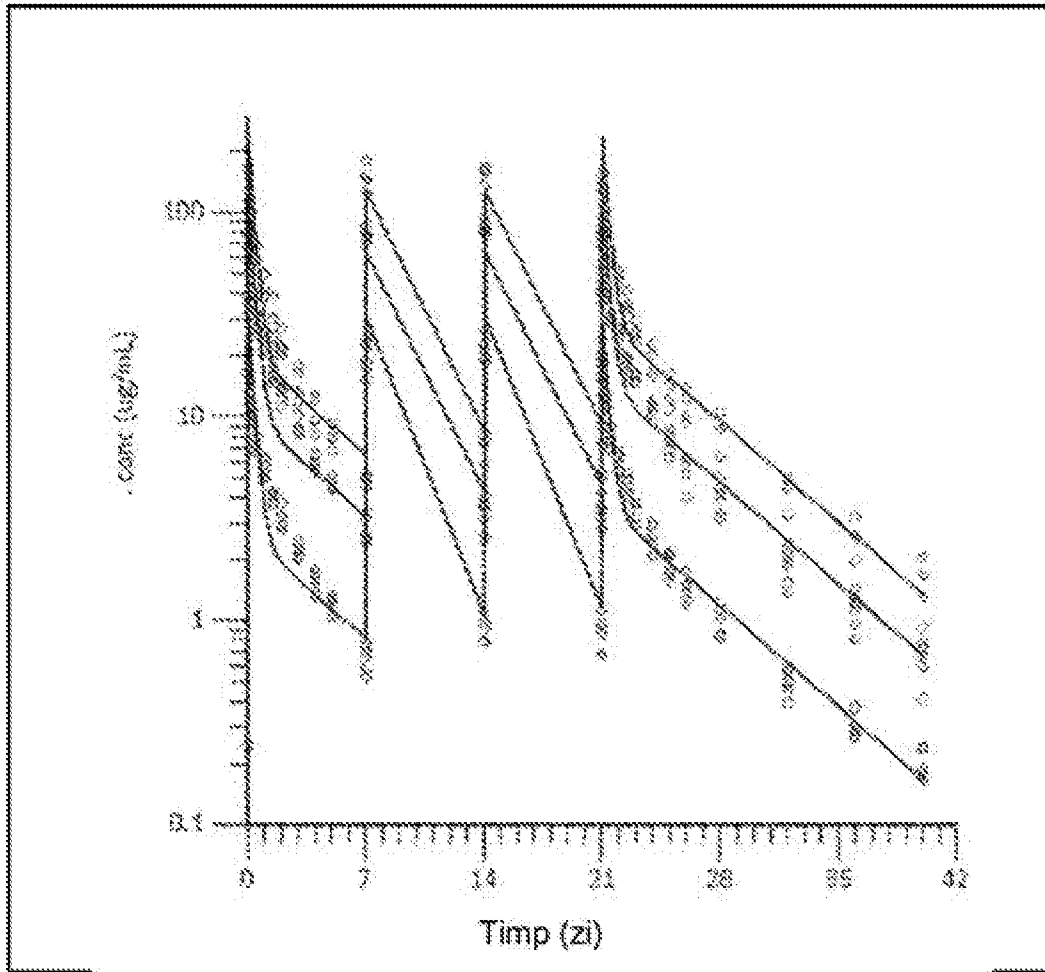


FIG. 6







Fragment: Promotor CMV IE  
 Sursă: Cytomegalovirus  
 Locație Plasmidă: 37-620  
 Funcțiune: promotor expresie de mamifer  
 Secvență

ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTACATAACTTA  
 CGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGGCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGGTATGTF  
 CCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA  
 CTTGGCAGTACAACAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATAATGACGGTAAATGGC  
 CCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTAATTAG  
 TCATCGCTATTAACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCAC  
 GGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCATAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGAC  
 TTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGT  
 CTATATAAGCAGAGCTGGTTTACTGGAACCGTCAGATC

Fragment: Poly A Igh uman  
 Sursă: Uman  
 Locație Plasmidă: 3211-3537  
 Funcțiune: Secvență de posesionare  
 Secvență

GTGCCACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTFGGCACGAGGATGCTTGGCACGTACCC  
 CGTCTACATACTTCCCAGGCAECCAGCATGGAAATAAAGCACCCACCCTGCCCTGGGCCCTTGGGAG  
 ACTGTGATGGTTCTTCCACGGGTCAAGCCCGAGTCTGAGCCCTGAGTGGCATGAGGGAGGCAGAGTGG  
 GTCCCAGTGTCCCACACTGGCCCAAGGCTGTGCAAGTGTGCCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCAGCC  
 AGGGGCTGCCCTGGCCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAG

Fragment: Gena Amp (bla)  
 Sursă: Sursă originală din *Salmonella paratyphi*  
 Locație Plasmidă: 4362-5222 (catena complementară)  
 Funcțiune: Rezistență la bacterii  
 Secvență

TTACCAATGGCTTAATCAGTGAAGCACCTATCTCAGCGATCTGTCATTTTCGTTCATCCATAGTTGCCCTG  
 ACTCCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATAC  
 CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAAGGGCCGAGCG  
 CAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCCGGAAGCTAGAGTAAG  
 TAGTTCCGCCAGTTAAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTC  
 GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTG  
 CAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCCGCAGTGTATCACT  
 CATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTCAATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG  
 TGAGTACTCAAACAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGGGCGGACCGAGTTGCTTTGCCCGGGTCAA  
 TADGGGATAAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTTGGAAAAACGTTCTTCGGGG  
 CGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTG  
 ATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA  
 AAAAGGGAATAAGGCGGACACGGAAATGTTGAATACTCAT

FIG. 8

Fragment: Promotor SV40  
 Sursă: Virusul Simian 40  
 Locație Plasmidă: 5406-5781  
 Funcțiune: Promotor de expresie mamifer  
 Secvență:

CACGAGGCCCTATTGATTATTGACTAGCTAGTGTGGAAATGTTGTCACTTAGGGTGTGGAAAAGTCCCC  
 AGGCTCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAAG  
 TCCCCAGGCCTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC  
 TCCCCTAAC TCCGCCATCCCGCCCTAACTCCCGCCAGTTCGCCCATTCTCCGCCCATGGCTGACT  
 AATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAACTAGTGAGGAG  
 GCTTTTTTGGAGGCCT

Fragment: Secvența de Codare Dihidrofolat Reductază  
 Sursă: Cytomegalovirus  
 Locație Plasmidă: 5794-6357  
 Funcțiune: Selecție în celule CHO embr.  
 Secvență:

ATGGTTCGAACTTGAAC TGCATCGTCGCCGTGTCCAAAAATATGGGGATTGGCAAGAACGGAGACCG  
 ACCCTGGCTTCCCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAAGAA TGACCACAACCCTCTTCAGTGGAAAG  
 GTAAACAGAAATCTGGTGAATTATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCCTGAGAAGAA TCGAUCTTTA  
 AAGGACAGAAATTAATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACCACACGAGGAGCTCATTTTCTTGC  
 CAAAAGTTTGGATGATGCC TTAAGACTTAATGAAACAACCGGAATTTGCCAAGTAAAGTAGACATGGTTT  
 GGATAGTCCGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAGACTCTTTGTG  
 ACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACT  
 TCTCCAGAA TACCAGGCGTCTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAG  
 TCTACGAGAAGAAAGACTAA

Fragment: Poly SV40  
 Sursă: Virus Simian 40  
 Locație Plasmidă: 8358-8880  
 Funcțiune: Secvență de poliadeninare  
 Secvență:

CAGGAAGATGCTTCAAGTTCCTGCTCCCTCC TAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTT  
 TGCTGGCTTTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGT TTTAAAAAACCTCCCA  
 CACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGT TTTATGCAAGCTTCT  
 AATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTTCTAGT  
 TGTTGGTTTTCAAAACATCAATGTATCTTATCATGTCGGATCGG

FIG. 8 (continuare)