

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191424** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2021.08.24**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.11.19**

(51) Int. Cl. **C07K 14/765** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

**(54) АНАЛОГИ GDF15 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ МАССЫ ТЕЛА И/ИЛИ СНИЖЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ ПИЩИ**

(31) **62/769,675**

(32) **2018.11.20**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2019/059945**

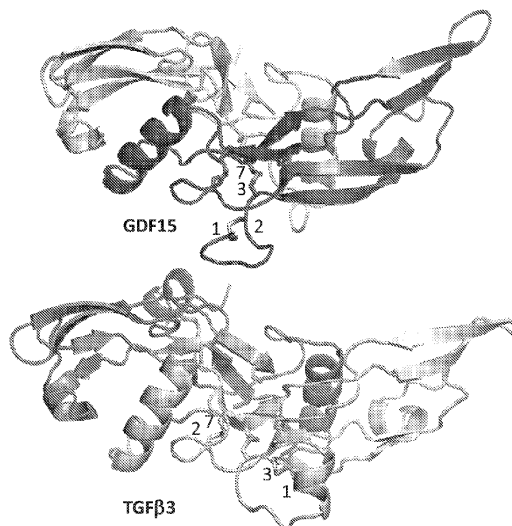
(87) **WO 2020/104948 2020.05.28**

(71) Заявитель:  
**ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)**

(72) Изобретатель:  
**Кимко Холли (US), Херманн Роберт (CH), Фаббрини Элиза, Стоянович-Сузулик Ведрана, Ротенберг Пол, Чжэн Сунмао (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к гибридным белкам, содержащим продлевающий период полужизни белок, линкер и белок GDF15, которые функционируют как агонисты GDF15. Эти агонисты GDF15 могут использоваться для лечения ожирения, снижения веса, уменьшения потребления пищи или снижения аппетита.



**A1**

**202191424**

**202191424**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568758EA/042

### АНАЛОГИ GDF15 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ МАССЫ ТЕЛА И/ИЛИ СНИЖЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ ПИЩИ

**[0001]** Аналоги GDF15 и способы применения для уменьшения массы тела и/или снижения потребления пищи.

#### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0002]** Изобретение относится к гибридным белкам GDF15. В частности, изобретение относится к гибриднему белку, содержащему белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок GDF15, нуклеиновым кислотам и экспрессионным векторам, кодирующим гибридные белки, рекомбинантным клеткам с ними, а также фармацевтическим композициям, содержащим гибридные белки. Предложены способы применения гибридных белков для уменьшения массы тела и/или снижения потребления пищи.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** Белок GDF15, член семейства TGF $\beta$ , - это секретируемый белок, который циркулирует в плазме в виде гомодимера с молекулярной массой 25 кДа. У большинства субъектов уровни белка GDF15 в плазме варьируют в интервале 150-1150 пг/мл (Tsai et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012, 3: 239-243). Высокие уровни белка GDF15 в плазме связаны со снижением веса вследствие анорексии и кахексии при онкологическом заболевании, а также при почечной и сердечной недостаточности. В одном клиническом исследовании уровни GDF15 использовались в качестве независимого прогностического фактора резистентности к инсулину у субъектов, страдающих ожирением, но не больных диабетом (Kempf et al., *Eur. J. Endo.* 2012, 167: 671-678). Исследование с участием близнецов показало, что различия в уровнях GDF15 в парах близнецов коррелировали с различиями в индексах массы тела (ИМТ) в этих парах, что свидетельствует о том, что GDF15 является долгосрочным регулятором энергетического гомеостаза (Tsai et al., *PLoS One*. 2015, 10 (7): e0133362).

**[0004]** В многочисленных работах продемонстрировано улучшение толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину в мышечных моделях после введения белка GDF15. Две независимых линии трансгенных мышей со сверхэкспрессией GDF15 имели уменьшенную массу тела и массу жировой ткани, а также улучшенную толерантность к глюкозе (Johnen et al., *Nat. Med.* 2007, 13, 1333-1340; Macia et al., *PLoS One*. 2012, 7: e34868; Chrysovergis et al., *Int. J. Obesity*. 2014, 38: 1555-1564). Сообщалось об увеличении общего расхода энергии организмом и окислительного метаболизма у трансгенных мышей с GDF15 (Chrysovergis et al., 2014, *Id.*). Это сопровождалось усилением экспрессии термогенных генов в бурой жировой ткани и усилением экспрессии липолитических генов в белой жировой ткани. Мыши, у которых отсутствовал ген GDF15, имели более высокую массу тела и массу жировой ткани (Tsai et al., *PLoS One*. 2013, 8 (2): e55174). Было показано, что Fc-содержащий гибридный белок с GDF15 вызывает уменьшение массы тела, а также

улучшение толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину в модели яванских макаков, страдающих ожирением, после еженедельного введения в течение периода шесть недель (WO 2013/113008).

**[0005]** Предполагается, что влияния GDF15 на массу тела достигаются за счет снижения потребления пищи и, возможно, увеличения расхода энергии. GDF15 может улучшать регуляцию гликемии посредством зависящих и, возможно, независимых от массы тела механизмов.

**[0006]** На основании вместе взятых наблюдений можно предполагать, что повышение уровней GDF15 может быть полезно для терапии метаболических заболеваний. В данной области существует потребность в композициях на основе GDF15, которые можно использовать для лечения или профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний.

**[0007]** Современные методы лечения ожирения включают в себя коррекцию питания и поведения, фармакотерапию и бариатрическую хирургию. Коррекция образа жизни, включая диету и повышенную физическую активность, является основой для любых методов снижения веса и может быть эффективна для достижения снижения веса в краткосрочной перспективе (от 3 до 6 месяцев). Однако в большинстве случаев снижение веса, достигаемое за счет коррекции образа жизни, не сохраняется в долгосрочной перспективе, и только 5-10% субъектов способны поддерживать значительное снижение веса с течением времени (Fisher BL and Schauer P., *Am J Surg.* 2002; 184:9S-16S, Rueda-Claussen CF et al., *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35:475-516). Фармакотерапия рекомендована в качестве терапии второй линии, когда изменения образа жизни неэффективны с точки зрения достижения значительного снижения веса. Лекарственные средства, одобренные в США и ЕС для хронического контроля веса, включают орлистат (ингибитор желудочно-кишечной липазы), налтрексон/бупропион (комбинация опиоидного антагониста и дофамина и ингибитора обратного захвата норэпинефрина) и лираглутид (агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1); в США также доступны лоркасерин (селективный агонист рецептора 5-HT<sub>2C</sub>) и фентермин/топирамат (комбинация симпатомиметического амина и противоэпилептического средства). Кроме того, в США для краткосрочного использования (до 12 недель) зарегистрирован фентермин, а также некоторые другие анорексигенные агенты (включая диэтилпропион, бензфетамин и фендиметразин). В комбинации с коррекцией поведения эти фармакологические агенты обладают различной эффективностью, что приводит к дополнительному снижению веса в диапазоне от 2% до 10% от исходной массы тела. Кроме того, использование фармакологических агентов может ограничиваться побочными эффектами, включая желудочно-кишечные эффекты (т. е. тошнота, рвота, вздутие живота, диарея), нервно-психические эффекты (т. е. нарушение когнитивных функций, нарушение сна) и повышение частоты сердечных сокращений (в зависимости от конкретного агента). В связи с этими присущими доступным фармакологическим подходам ограничениями (ограниченная эффективность, профиль безопасности и доля не ответивших на лечение

пациентов в диапазоне 30-65%) все еще существует очевидная неудовлетворенная медицинская потребность в более эффективных, хорошо переносимых и безопасных фармакологических методах терапии ожирения, которые также могут положительно повлиять на связанные с ожирением сопутствующие заболевания, такие как сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет 2 типа и гипертензия. Хотя методы бариатрической хирургии (бандажирование желудка, рукавная гастрэктомия и шунтирование желудка с гастроеюноанастомозом по Ру) могут приводить к более выраженному и устойчивому снижению веса, чем лекарственная терапия, в диапазоне приблизительно от 15% до 30% снижения через 10 лет и могут вызывать заметное улучшение состояния здоровья и снижать смертность у пациентов с выраженным ожирением, могут возникать периоперационные (например, венозная тромбоэмболия) и послеоперационные (например, тошнота, демпинг-синдром, мальабсорбция жирорастворимых витаминов) осложнения. Кроме того, учитывая ограничения, связанные как со стоимостью, так и с возможностями хирургических отделений в большинстве систем здравоохранения, бариатрическая хирургия может охватывать лишь небольшую часть подходящих пациентов (Rueda-Claussen CF et al., *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35:475-516). Таким образом, существует потребность в более эффективных и хорошо переносимых способах хронического контроля веса, которые также могут положительно влиять на связанные с ожирением сопутствующие заболевания, такие как гипертензия, дислипидемия и сахарный диабет 2 типа.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0008]** Настоящее изобретение позволяет удовлетворить эту потребность, предлагая агонист GDF15 (FP2), который имеет новый механизм действия для снижения потребления пищи и достижения снижения веса. В доклинических фармакологических исследованиях и исследованиях безопасности было показано, что FP2 оказывает благоприятный фармакологический эффект и имеет перспективные характеристики безопасности, позволяющие расценивать его в качестве кандидата для проведения клинической разработки.

**[0009]** В одном аспекте в изобретении предложен способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от около 0,8 мг до около 90 мг, и при этом вес пациента составляет около 80 кг или более. В одном аспекте изобретения субъект страдает от избыточного веса. В одном аспекте изобретения ИМТ субъекта составляет около 25 кг/м<sup>2</sup> или более. В одном аспекте изобретения ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,8 мг, около 2,5 мг, около 7,5 мг, около 15 мг, около 30 мг, около 60 мг и около 90 мг. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в диапазоне доз от около 0,01 мг/кг до около 1,08 мг/кг. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из:



около 0,01 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,09 мг/кг, около 0,18 мг/кг, около 0,36 мг/кг, около 0,72 мг/кг и около 1,08 мг/кг.

**[0010]** В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[0100]** В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят субъекту один раз в неделю.

**[0011]** В одном аспекте в изобретении предложен способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от около 0,8 мг до около 90 мг, и при этом вес пациента составляет 80 кг или более. В одном аспекте изобретения субъект страдает от избыточного веса. В одном аспекте изобретения ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более. В одном аспекте изобретения ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,8 мг, около 2,5 мг, около 7,5 мг, около 15 мг, около 30 мг, около 60 мг и около 90 мг. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в диапазоне доз от около 0,01 мг/кг до около 1,08 мг/кг. В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,01 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,09 мг/кг, около 0,18 мг/кг, около 0,36 мг/кг, около 0,72 мг/кг и около 1,08 мг/кг.

**[0012]** В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[0013]** В одном аспекте изобретения гибридный белок вводят субъекту один раз в неделю.

**[0014]** Другие аспекты, признаки и преимущества изобретения будут очевидны из представленного ниже описания, включающего подробное описание изобретения и его предпочтительных вариантов осуществления, и прилагаемой формулы изобретения.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0015]** Предшествующее краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми чертежами. Необходимо понимать, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

**[0016]** В графических материалах показано следующее.

**[0017]** На Фиг. 1A и 1B показана кристаллическая структура GDF15, в которой дисульфидные мостики между первым и вторым остатками цистеина (C1-C2) образуют петлю на N-конце белка.

**[0018]** На Фиг. 2 показано влияние подкожного введения гибридных белков в соответствии с вариантами осуществления изобретения, например, гибридных белков FP1 (SEQ ID NO: 60) и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистидиновой меткой (6xHis), присоединенной на N-конце), на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано

суммарное потребление пищи через 24 часа после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, обозначают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (PBS)  $\pm$  ст. ош. ср. (SEM); N=по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с N=9, получавшей FP1 в дозе 16 нмоль/кг. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0019]** На Фиг. 3 показано влияние подкожного введения FP1 и 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 с гексагистидиновой меткой (6xHis), присоединенной на N-конце) на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули; показано суммарное потребление пищи через 48 часов после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, обозначают проценты снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель (PBS)  $\pm$  ст. ош. ср. (SEM); N=по 8 животных в группе. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0020]** На Фиг. 4 показано изменение массы тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO) во время обработки FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (0-й день); N=по 8 животных в группе. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 1 нмоль/кг по сравнению с носителем; #  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 10 нмоль/кг по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0021]** На Фиг. 5A и 5B показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные в пероральном тесте на толерантность глюкозы (OGTT), проведенном через 14 дней, в течение которых дозу FP1 вводили каждые 3 дня (q3d), причем уровни выражены в виде площади под кривой (AUC). N=по 8 животных в группе. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 1 нмоль/кг по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0022]** На Фиг. 6 показаны уровни глюкозы в крови мышей DIO, измеренные после еды, во время обработки FP1. N=по 8 животных в группе. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0023]** На Фиг. 7 показана оценка резистентности к инсулину натошак на основе гомеостатической модели (HOMA-IR) у мышей DIO после 4 часов голодания, проведенная через 14 дней, в которые проводили обработку FP1. N=по 8 животных в группе. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0024]** На Фиг. 8 показано изменение массы тела у мышей *ob/ob* во время обработки FP1 каждые 3 дня (q3d). Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (0-й день); N=по 9 животных в группе. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 10 нмоль/кг по сравнению с носителем; #  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 1 нмоль/кг по сравнению с носителем;  $p$ -значения рассчитывали с помощью двухфакторного

дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0025]** На Фиг. 9 показаны уровни глюкозы в крови мышей *ob/ob* во время обработки FP1. Стрелки указывают время (дни) подкожного введения после введения начальной дозы (0-й день); N=по 9 животных в группе. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 10 нмоль/кг по сравнению с носителем; #  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 1 нмоль/кг по сравнению с носителем; р-значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0026]** На Фиг. 10 показан профиль зависимости от времени средней ( $\pm$  стандартное отклонение, СО) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57Bl/6.

**[0027]** На Фиг. 11 показан профиль зависимости от времени средней ( $\pm$  СО) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули.

**[0028]** На Фиг. 12 показан профиль зависимости от времени средней ( $\pm$  СО) концентрации лекарственного средства FP1 в сыворотке после в/в и п/к введения 1 мг/кг яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноанализа.

**[0029]** На Фиг. 13 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного в/в введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата (ИА) / жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХМС).

**[0030]** На Фиг. 14 показана зависимость от времени концентрации FP1 (нг/мл) в виде интактного димера в сыворотке после однократного п/к введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

**[0031]** На Фиг. 15 показана концентрация FP1, представленная в процентах (%) от исходной концентрации, через 0, 4, 24 и 48 часов после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих индивидов (суб.), в соответствии с определением методом иммуноанализа.

**[0032]** На Фиг. 16 показана средняя концентрация FP1 в виде интактного димера, представленная в процентах (%) от концентрации в момент времени 0, через 0, 4, 24 и 48 часов после инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих индивидов (суб.), в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС интактного вещества.

**[0033]** На Фиг. 17 показано разовое потребление пищи перед и после однократного введения тощим мышам-самцам линии C57BL6N белка GDF15 с различными вариантами N-концевой делеции (SEQ ID NO: 92, 111 и 112) по сравнению с диким типом гибрида без делеции (SEQ ID 26 с меткой 6xHis, присоединенной на N-конце). N=по 8 животных в группе; \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем; р-значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0034]** На Фиг. 18 показано влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; в частности, показано суммарное потребление пищи через 24 часа после введения. Цифры, показанные внутри столбцов, обозначают процентное значение снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее  $\pm$  SEM); N=по 8 животных в группе во всех группах, за исключением группы с N=6, получавшей 6xHis-FP1. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; p-значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Даннетта для множественных сравнений.

**[0035]** На Фиг. 19 показано суммарное потребление пищи, измеренное у крыс линии Спрег-Доули через 24 часа после введения однократной дозы FP2. Цифры, показанные внутри столбцов, обозначают процентное значение снижения по сравнению с контрольной группой, получавшей PBS (среднее  $\pm$  SEM); N=по 8 животных в группе. \*\*  $p < 0,01$ ; p-значения рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0036]** На Фиг. 20 показано процентное изменение массы тела мышей DIO во время обработки FP2 по схеме q3d (один раз в три дня). Стрелки указывают время подкожных инъекций FP2; N=по 6 животных в группе; \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0037]** На Фиг. 21А и 21В показана площадь под кривой (AUC) для уровней концентрации глюкозы в крови, измеренных в тесте OGTT через 14 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. \*  $p < 0,05$  с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, N=по 8 животных в группе.

**[0038]** На Фиг. 22А показаны уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. \*  $p < 0,05$ , носитель по сравнению с группами, получавшими FP2 (0,3 нмоль/кг); FP2 (10 нмоль/кг) и росиглитазон. #  $p < 0,05$ , по сравнению с группой, получавшей росиглитазон (10 мг/кг), с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений.

**[0039]** На Фиг. 22В показана AUC для уровней инсулина в плазме, измеренных в тесте OGTT через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем; #  $p < 0,05$ , по сравнению с группой, получавшей росиглитазон.

**[0040]** На Фиг. 23 показаны уровни глюкозы в крови, измеренные после еды, через 8 дней, в которые мышам DIO вводили FP2 по схеме q3d. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, N=по 8 животных в группе.

**[0041]** На Фиг. 24 показана оценка HOMA-IR натощак у мышей DIO после 5 часов голодания на 14-й день, проведенная через 14 дней, в которые вводили FP2 по схеме q3d. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем, с помощью однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

**[0042]** На Фиг. 25 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного

(в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг мышам линии C57Bl/6. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО (N=5 проб на момент времени).

**[0043]** На Фиг. 26 показаны концентрации FP2 в сыворотке после внутривенного (в/в) введения 2 мг/кг и подкожного (п/к) введения 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули. N=5 проб на момент времени.

**[0044]** На Фиг. 27 показаны концентрации FP2 в плазме у яванских макак, определяемые иммуноанализом. Значения представляют собой среднее  $\pm$  СО при N=3, за исключением N=2 при в/в введении, на 22-й день (через 528 часов). в/в - внутривенно, п/к - подкожно.

**[0045]** На Фиг. 28 показаны концентрации FP2 в виде интактного димера в плазме у яванских макак, анализируемые методом ЖХМС. Значения представляют собой среднее  $\pm$  SEM при N=3, за исключением N=2 при подкожном (п/к) введении через 168 часов, N=1 при п/к введении через 120 часов и 432 часа и N=1 при внутривенном (в/в) введении через 168 часов и 432 часа.

**[0046]** На Фиг. 29 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, определяемая иммуноанализом.

**[0047]** На Фиг. 30 показана стабильность *ex vivo* FP2 в человеческой плазме (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, определяемая методом ЖХ/МС интактного вещества.

**[0048]** На Фиг. 31 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP1. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 10 мг/кг по сравнению с носителем.

**[0049]** На Фиг. 32 показано изменение массы тела яванских макак в процентах перед и после введения однократной дозы FP1. \*  $p < 0,05$  для группы с FP1 в дозе 10 мг/кг по сравнению с носителем; #  $p < 0,05$  для дозы 3 мг/кг по сравнению с носителем, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

**[0050]** На Фиг. 33 показано суточное потребление пищи (г) яванскими макаками перед и после введения однократной дозы FP2. \*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

**[0051]** На Фиг. 34 показано изменение массы тела яванских макак в процентах перед и после введения однократной дозы FP2. \*  $p < 0,05$  для группы с FP2 в дозе 10 нмоль/кг по сравнению с носителем, #  $p < 0,05$  для FP2 в дозе 3 нмоль/кг по сравнению с носителем, &  $p < 0,05$  для FP2 в дозе 1 нмоль/кг по сравнению с носителем, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями и критерия Тьюки для множественных сравнений, для N=по 8 животных в группе.

**[0052]** На Фиг. 35 показано потребление пищи яванскими макаками, страдающими спонтанным ожирением, в течение 12-недельного периода подкожного введения FP2 один

раз в неделю, выраженное в процентах по отношению к значениям на исходном уровне и рассчитанное в виде среднего суточного потребления пищи в течение недели перед введением дозы. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM, а число животных N показано под графиком; планки погрешностей представляли собой диапазон  $\pm$  для N=2.

**[0053]** На Фиг. 36 показана масса тела (% изменения относительно исходного уровня) у страдающих спонтанным ожирением яванских макаков в течение 12-недельного периода подкожного введения FP2 один раз в неделю. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM, а число животных N показано под графиком; планки погрешностей представляли собой диапазон  $\pm$  для N=2.

**[0054]** На Фиг. 37 показана концентрация (нМ) FP2 в сыворотке, измеренная посредством иммуноанализа у страдающих спонтанным ожирением яванских макаков в течение 12-недельного периода подкожного введения FP2 один раз в неделю. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM, а число животных N показано под графиком с указанием поддающегося обнаружению уровня воздействия; планки погрешностей представляли собой диапазон  $\pm$  для N=2.

**[0055]** На Фиг. 38 показан схематический обзор исследования. DG обозначает группу дозирования.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0056]** В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий или т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

**[0057]** Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании. Все патенты, опубликованные заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в него путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе. Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

**[0058]** Изобретение относится к гибриднему белку, содержащему (a) белок, продлевающий период полужизни, (b) линкер и (c) белок GDF15, причем гибридный белок составлен от N-конца до C-конца в порядке (a)-(b)-(c).

**[0059]** Оказалось, что гибридный белок в соответствии с вариантом осуществления изобретения, содержащий белок, продлевающий период полужизни, линкер и белок

GDF15, продлевает период полужизни белка GDF15, причем гибридные белки изобретения показывают метаболические эффекты, которые демонстрируют их пригодность в качестве терапевтических средств для лечения и профилактики метаболических заболеваний, расстройств или состояний. Такие эффекты включают, без ограничений, уменьшение массы тела, улучшение толерантности к глюкозе и улучшение чувствительности к инсулину у животных, которым вводили гибридные белки.

**[0060]** В настоящем документе термин «гибридный белок» относится к белку, имеющему два или более участков, ковалентно связанных вместе, при этом каждый из участков происходит от разных белков.

**[0061]** Гибридные белки в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут включать любой белок GDF15. В настоящем документе термин «белок GDF15» относится к любому природному белку дикого типа из семейства ростового фактора дифференцировки 15 или любому его функциональному варианту. Белок GDF15 может происходить от любого млекопитающего, такого как человек или другое приемлемое млекопитающее, такое как мышь, кролик, крыса, свинья, собака или примат. В конкретных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой человеческий белок GDF15 или его функциональный вариант. В предпочтительных вариантах осуществления белок GDF15 представляет собой зрелый белок GDF15 или его функциональный вариант.

**[0062]** В настоящем документе термин «зрелый белок GDF15» относится к части пре-про-белка GDF15, которая отделяется от полноразмерного белка после внутриклеточного расщепления по сайту расщепления RXXR, подобному сайту расщепления фурина. Зрелые белки GDF15 секретируются как гомодимеры, связанные через дисульфидные мостики. В одном варианте осуществления изобретения зрелый белок GDF15, кратко называемый GDF15(197-308) (SEQ ID NO: 6), содержит аминокислоты 197-308 из полноразмерного человеческого белка GDF15.

**[0063]** В настоящем документе термин «функциональный вариант» относится к варианту родительского белка, имеющему существенную или значительную степень идентичности с родительским белком и сохраняющему по меньшей мере одну из биологических активностей родительского белка. Функциональный вариант родительского белка можно получать средствами, известными в данной области, в контексте настоящего описания. Функциональный вариант может включать одну или более модификаций аминокислотной последовательности родительского белка. Модификации могут изменять физико-химические свойства полипептида, например, улучшать термостабильность полипептида, изменять специфичность субстрата, изменять оптимум pH и т. п. Модификации также могут изменять биологические активности родительского белка при условии, что они не уничтожают или не подавляют все биологические активности родительского белка. Модификации также могут представлять собой делеции или вставки одной или более аминокислот.

**[0064]** В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения функциональный вариант родительского белка содержит делецию и/или вставку из одной

или более аминокислот в родительском белке. Например, функциональный вариант зрелого белка GDF15 может включать делецию и/или вставку из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот в зрелом белке GDF15, предпочтительно делецию от 1 до 30 аминокислот на N-конце зрелого белка GDF15.

**[0065]** В соответствии с вариантами осуществления изобретения гибридный белок изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого GDF15, такой как GDF15(197-308) (SEQ ID NO: 6); или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности зрелого GDF15, усеченной на N-конце, такой как GDF15(200-308) (SEQ ID NO: 7), GDF15(201-308) (SEQ ID NO: 8), GDF15(202-308) (SEQ ID NO: 9), GDF15(203-308) (SEQ ID NO: 10) или GDF15(211-308) (SEQ ID NO: 11). Белок GDF15 может иметь по меньшей мере одну из замен, вставок и делеций в SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11, при условии, что он сохраняет по меньшей мере одну из биологических активностей белка GDF15, таких как его влияние на потребление пищи, уровни глюкозы в крови, резистентность к инсулину, массу тела и т. д.

**[0066]** В конкретных вариантах осуществления гибридный белок изобретения содержит белок GDF15, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, включая, без ограничений, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11.

**[0067]** В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления изобретения можно применять любой приемлемый белок, продлевающий период полужизни. В настоящем документе термин «белок, продлевающий период полужизни» может означать любой белок или его фрагмент, о котором известно, что он продлевает период полужизни белков, с которыми его соединяют. Примеры таких белков, продлевающих период полужизни, включают, без ограничений, человеческий сывороточный альбумин (HSA), домен константной области (Fc) иммуноглобулина (Ig) или трансферрин (Tf). В вариантах осуществления изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант. В конкретных вариантах осуществления изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения белок, продлевающий период полужизни, содержит HSA или его функциональный вариант, в котором остаток цистеина в положении 34 молекулы HSA заменен на серин или аланин.

**[0068]** В конкретных вариантах осуществления гибридный белок изобретения содержит белок, продлевающий период полужизни, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-3.

**[0069]** В гибридных белках в соответствии с вариантами осуществления изобретения можно использовать любой приемлемый линкер. В настоящем документе термин «линкер» относится к линкерной функциональной группе, содержащей пептидный линкер.



Предпочтительно, чтобы линкер помогал обеспечивать правильную укладку, минимизировать стерическое затруднение и не нарушал существенным образом структуру каждого функционального компонента в гибридном белке. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептидный линкер содержит 2-120 аминокислот. Например, пептидный линкер содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 или 120 аминокислот.

**[0070]** В вариантах осуществления изобретения линкер повышает гибкость компонентов гибридного белка. В конкретных вариантах осуществления изобретения линкер может представлять собой гибкий линкер, содержащий последовательность (GGGGS)<sub>n</sub>, включая, без ограничений, GS-(GGGGS)<sub>n</sub> или AS-(GGGGS)<sub>n</sub>-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15.

**[0071]** В других вариантах осуществления изобретения линкер структурирован. В конкретных вариантах осуществления изобретения линкер может представлять собой структурированный линкер, содержащий последовательность (AP)<sub>n</sub> или (EAAAK)<sub>n</sub>, включая, без ограничений, AS-(AP)<sub>n</sub>-GT или AS-(EAAAK)<sub>n</sub>-GT, где n составляет от 2 до 20, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15. В других вариантах осуществления изобретения линкер содержит последовательности (GGGGA)<sub>n</sub>, (PGGGS)<sub>n</sub>, (AGGGS)<sub>n</sub> или GGS-(EGKSSGSGSESKST)<sub>n</sub>-GGS, где n составляет от 2 до 20.

**[0072]** В вариантах осуществления изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательностям с SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 или 64-75. В конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60 и 64-75. В более конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60 и 70. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления изобретения гибридный белок содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 26. Гибридный белок может также включать небольшое (-ие) удлинение (-я) на аминном или карбоксильном конце белка, такое как метка, упрощающая очистку, например, полигистидиновая метка, антигенный эпитоп или связывающий домен.

**[0073]** Описанный в настоящем документе гибридный белок можно характеризовать или оценивать по биологическим активностям GDF15, включая, без ограничений, влияние на потребление пищи, пероральные тесты на толерантность к глюкозе, измерения уровней глюкозы в крови, анализ на резистентность к инсулину, изменения массы тела, фармакокинетический анализ, токсикокинетический анализ, иммунологические методы и

масс-спектрометрический анализ уровня и стабильности полноразмерных гибридных белков, а также анализ стабильности *ex vivo* в плазме человеческой крови.

**[0074]** В изобретении также предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок изобретения. В вариантах осуществления изобретения выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5, 25-30, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60, 64-75 или 92. В конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-31, 36-37, 40, 48, 55-56, 59-60, 64-75 и 92. В более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты кодирует гибридный белок, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 25-30, 40, 55-56, 59-60, 70 и 92. В более конкретных вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO: 76-91, 95 и 110.

**[0075]** В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может представлять собой экспрессионный вектор. Экспрессионные векторы включают, без ограничений, векторы для экспрессии рекомбинантных белков и векторы для доставки нуклеиновых кислот субъекту, для экспрессии в ткани субъекта, например, вирусные векторы. Примеры вирусных векторов, приемлемых для использования с изобретением, включают, без ограничений, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы и т. д. Вектор также может представлять собой невирусный вектор. Примеры невирусных векторов включают, без ограничений, плазмиды, искусственные хромосомы бактерий, искусственные хромосомы дрожжей, бактериофаги и т. д. Вектор может включать любые элементы для выполнения обычной функции экспрессионного вектора, например, промотор, связывающий рибосомы элемент, терминатор, усилитель, селективный маркер или точку начала репликации.

**[0076]** В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая гибридный белок, может иметь оптимизированные кодоны с целью улучшения рекомбинантной экспрессии от желаемой клетки-хозяина, такой как человеческая эмбриональная клетка почек (НЕК) или клетка яичника китайского хомячка (СНО), с помощью известных в данной области способов в контексте настоящего описания.

**[0077]** В изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует гибридный белок изобретения. Клетки-хозяева включают, без ограничений, клетки-хозяева для экспрессии рекомбинантных белков и клетки-хозяева для доставки нуклеиновой кислоты субъекту для экспрессии в ткани субъекта. Примеры клеток-хозяев, приемлемых для использования в изобретении, включают, без ограничений, клетки НЕК или СНО.

**[0078]** В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу получения гибридного белка изобретения. В общем аспекте способ содержит этапы, на которых: (1) культивируют клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок, в условиях, при которых продуцируется гибридный белок, и (2) выделяют гибридный белок, продуцируемый клеткой-хозяином. Гибридный белок можно дополнительно очищать с помощью способов, известных в данной области.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления гибридный белок экспрессируют в клетках-хозяевах и выделяют из них с помощью комбинации одной или более стандартных методик очистки, включая, без ограничений, аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию и диализ. Предпочтительно, чтобы гибридный белок был полностью очищен от любых протеаз.

**[0080]** В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0081]** В изобретении дополнительно предложена композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный белок изобретения, могут содержать носитель для доставки для введения молекулы нуклеиновой кислоты в клетку с целью экспрессии гибридного белка. Примеры носителей для доставки нуклеиновых кислот включают липосомы, биосовместимые полимеры, включая природные полимеры и синтетические полимеры, липопотеины, полипептиды, полисахариды, липополисахариды, искусственные вирусные оболочки, металлические частицы, бактерии, вирусы, такие как бакуловирусы, аденовирусы и ретровирусы, бактериофаги, космиды, плазмиды, грибковые векторы и другие рекомбинантные носители, обычно используемые в данной области и описанные ранее для экспрессии в разных эукариотических хозяевах.

**[0082]** Изобретение также относится к наборам, содержащим фармацевтическую композицию изобретения. Наборы могут содержать первый контейнер, в котором имеется высушенный гибридный белок изобретения, и второй контейнер, в котором имеется водный раствор, предназначенный для смешивания с высушенным гибридным белком перед введением субъекту, либо только один контейнер, содержащий жидкую фармацевтическую композицию изобретения. Набор может содержать блок введения одной дозы или блок введения множества доз фармацевтической композиции изобретения. Набор может также включать один или более предварительно заполненных шприцев (например, шприцев с жидкостью и шприцев с лиофилом). Набор может также содержать инструкцию по его использованию. Инструкция может описывать использование и свойства материалов, поставляемых в наборе, и ее можно составлять в соответствии с точным метаболическим расстройством, подлежащим лечению.

**[0083]** Изобретение также относится к использованию описанных в настоящем документе фармацевтических композиций для лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния, такого как диабет 2 типа, повышенные уровни

глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит. В соответствии с вариантами осуществления изобретения способ лечения или профилактики метаболического заболевания, расстройства или состояния включает введение нуждающемуся в лечении субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества фармацевтической композиции изобретения. Любые из описанных в настоящем документе фармацевтических композиций можно использовать в способе изобретения, включая фармацевтические композиции, содержащие гибридный белок изобретения, или фармацевтические композиции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный белок.

**[0084]** В настоящем документе предложены способы уменьшения массы тела субъекта, включающие введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от около 0,8 мг до около 90 мг, и при этом вес пациента составляет 80 кг или более.

**[0085]** В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект страдает от избыточного веса. В определенных вариантах осуществления изобретения ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более, а в некоторых вариантах осуществления ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[0086]** В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,8 мг, около 2,5 мг, около 7,5 мг, около 15 мг, около 30 мг, около 60 мг и около 90 мг. В определенных вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,8 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 2,5 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 7,5 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 15 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 30 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 60 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 90 мг.

**[0087]** В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридный белок вводят в диапазоне доз от около 0,01 мг/кг до около 1,08 мг/кг. В определенных из таких вариантов осуществления гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,01 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,09 мг/кг, около 0,18 мг/кг, около 0,36 мг/кг, около 0,72 мг/кг и около 1,08 мг/кг. В определенных вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,01 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,03 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,09 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,18 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,36 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,72 мг/кг. В других вариантах осуществления

гибридный белок вводят в дозе около 1,08 мг/кг.

**[0088]** В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[0089]** В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок вводят субъекту один раз в неделю.

**[0090]** В настоящем документе предложены способы уменьшения потребления пищи субъектом, включающие введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанную композицию вводят в дозе в диапазоне от около 0,8 мг до около 90 мг, и при этом вес пациента составляет 80 кг или более.

**[0091]** В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект страдает от избыточного веса. В определенных вариантах осуществления изобретения ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более, а в некоторых вариантах осуществления ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[0092]** В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,8 мг, около 2,5 мг, около 7,5 мг, около 15 мг, около 30 мг, около 60 мг и около 90 мг. В определенных вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,8 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 2,5 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 7,5 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 15 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 30 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 60 мг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 90 мг.

**[0093]** В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридный белок вводят в диапазоне доз от около 0,01 мг/кг до около 1,08 мг/кг. В определенных из таких вариантов осуществления гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: около 0,01 мг/кг, около 0,03 мг/кг, около 0,09 мг/кг, около 0,18 мг/кг, около 0,36 мг/кг, около 0,72 мг/кг и около 1,08 мг/кг. В определенных вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,01 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,03 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,09 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,18 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,36 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 0,72 мг/кг. В других вариантах осуществления гибридный белок вводят в дозе около 1,08 мг/кг.

**[0094]** В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[0095]** В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения гибридный белок вводят субъекту один раз в неделю.

**[0096]** Термин «около», используемый в отношении числовых диапазонов, пороговых или конкретных значений, используется для обозначения того, что перечисленные значения могут варьировать вплоть до 10% от указанного значения. Таким образом, термин «около» используется для того, чтобы учитывать изменения  $\pm 10\%$  или менее, изменения  $\pm 5\%$  или менее, изменения  $\pm 1\%$  или менее, изменения  $\pm 0,5\%$  или менее, изменения  $\pm 5\%$  или менее или изменения  $\pm 0,1\%$  или менее от установленного значения.

**[0097]** В настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, конкретно млекопитающее, наиболее конкретно человека, которое будет или было подвергнуто лечению способом в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, приматов кроме человека (NHP), таких как низшие и высшие обезьяны, и т. д., более конкретно человека.

**[0098]** В настоящем документе термин «избыточный вес» относится к избыточной массе тела. Для определения того, имеет ли субъект избыточный вес по сравнению с эталонным здоровым субъектом, включая возраст, рост, пол и состояние здоровья субъекта, используются различные параметры. Например, субъекта можно считать имеющим избыточный вес или ожирение посредством оценки индекса массы тела (ИМТ) субъекта, который рассчитывают путем деления веса субъекта в килограммах на квадрат роста субъекта в метрах. Считается, что взрослый человек с ИМТ в диапазоне от 18,5 до 24,9 кг/м<sup>2</sup> имеет нормальный вес; взрослый человек с ИМТ в диапазоне от 25 до 29,9 кг/м<sup>2</sup> может считаться имеющим избыточный вес (предожирение); взрослый человек с ИМТ 30 кг/м<sup>2</sup> и выше может считаться страдающим ожирением. Повышенный аппетит часто способствует избыточному увеличению массы тела.

**[0099]** «Метаболическое заболевание, расстройство или состояние» означает любое расстройство, связанное с аномальным метаболизмом. Примеры метаболических заболеваний, расстройств или состояний, которые можно лечить в соответствии со способом изобретения, включают, без ограничений, диабет 2 типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, избыточный вес, дислипидемию, диабетическую нефропатию, ишемическое поражение миокарда, застойную сердечную недостаточность или ревматоидный артрит.

**[00100]** В настоящем документе термины «лечить» и «лечение» относятся к введению композиции субъекту для достижения желаемого терапевтического или клинического результата у субъекта. В одном варианте осуществления термины «лечить» и «лечение» относятся к введению фармацевтической композиции изобретения для снижения, ослабления или замедления прогрессирования или развития метаболического расстройства, такого как диабет 2 типа, повышенные уровни глюкозы, повышенные уровни инсулина, ожирение, дислипидемия, диабетическая нефропатия, ишемическое поражение миокарда, застойная сердечная недостаточность или ревматоидный артрит.

**[00101]** В соответствии с вариантами осуществления изобретения

фармацевтическую композицию изобретения можно вводить субъекту любым способом, известным специалистам в данной области в контексте настоящего описания, например, посредством внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного, кожного, интрамукозального (например, в слизистую кишечника), интраназального или внутрибрюшинного способа введения. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическую композицию изобретения вводят субъекту посредством внутривенной инъекции или подкожной инъекции.

**[00102]** В настоящем документе введение «один раз в неделю» выполняют в течение одного дня. Предпочтительно введение «один раз в неделю» выполняют за одну стадию, например в виде одной инъекции.

**[00103]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клинически подтвержденная безопасная и клинически подтвержденная эффективная доза гибридного белка GDF15, имеющего последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92, для использования в способе уменьшения массы тела у субъекта, причем указанная клинически подтвержденная безопасная и клинически подтвержденная эффективная доза представляет собой однократную подкожную (п/к) инъекцию, которую вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг субъекту весом 80 кг или более.

**[00104]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена клинически подтвержденная безопасная и клинически подтвержденная эффективная доза гибридного белка GDF15, имеющего последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92, для использования в способе уменьшения потребления пищи субъектом, причем указанная клинически подтвержденная безопасная и клинически подтвержденная эффективная доза представляет собой однократную подкожную (п/к) инъекцию, которую вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг субъекту весом 80 кг или более.

**[00105]** В соответствии с изобретением, как определено в настоящем документе, термин «клинически подтвержденный безопасный» применительно к дозе или лечению гибридным белком GDF15, имеющим последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92, относится к благоприятному отношению риск : польза с относительно низкой или сниженной частотой и/или низкой или сниженной тяжестью нежелательных явлений, включая неблагоприятные основные показатели жизнедеятельности (частота сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление, температура тела), неблагоприятные стандартные клинические лабораторные исследования (гематологические, биохимические, анализ мочи, липиды, коагуляция), аллергические реакции/гиперчувствительность, нежелательные местные реакции в участке инъекции или неблагоприятную ЭКГ.

**[00106]** В соответствии с изобретением, как определено в настоящем документе, термины «клинически подтвержденный эффективный» или «клинически подтвержденная эффективность», если они относятся к таким терминам, как доза, режим дозирования или лечение гибридным белком GDF15, имеющим последовательность, содержащую SEQ ID NO: 92, относятся к уменьшению потребления пищи, снижению показателей аппетита,

снижению вкусовой привлекательности пищи, оцениваемых с помощью анкет, или уменьшению массы тела.

**[00107]** В настоящем документе уменьшение массы тела представляет собой уменьшение по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20% или на любое число в диапазоне между этими значениями.

**[00108]** В настоящем документе уменьшение потребления пищи представляет собой уменьшение по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 11%, по меньшей мере на 12%, по меньшей мере на 13%, по меньшей мере на 14%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 16%, по меньшей мере на 17%, по меньшей мере на 18%, по меньшей мере на 19%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 21%, по меньшей мере на 22%, по меньшей мере на 23%, по меньшей мере на 24%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 26%, по меньшей мере на 27%, по меньшей мере на 28%, по меньшей мере на 29%, по меньшей мере на 30% или на любое число в диапазоне между этими значениями. Потребление пищи можно измерять посредством измерения потребленных калорий на основании потребленного количества каждого продукта питания в граммах и его пищевой ценности.

**[00109]** В настоящем документе, если не указано иное, термин «клинически доказанный» (используемый независимо или для модификации терминов «безопасный» и/или «эффективный») означает, что доказательство было получено в клиническом исследовании фазы III, причем клиническое исследование соответствовало стандартам Управления по надзору за качеством продуктов питания и лекарственных средств США, Европейского агентства лекарственных средств (EMA) или соответствующего национального регулирующего органа. Например, клиническое исследование может представлять собой рандомизированное двойное слепое исследование соответствующего масштаба, используемое для клинического подтверждения эффектов лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления термин «клинически подтвержденный» указывает на подтверждение посредством клинического исследования, соответствующего стандартам Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США, Европейского агентства лекарственных средств (EMA) или соответствующего национального регулирующего органа для клинического исследования фазы I.

## **ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[00110]** 1. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный



гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

**[00111]** 2. Способ по варианту осуществления 1, в котором субъект имеет избыточный вес.

**[00112]** 3. Способ по варианту осуществления 2, в котором ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

**[00113]** 4. Способ по варианту осуществления 3, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[00114]** 5. Способ по варианту осуществления 1, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

**[00115]** 6. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

**[00116]** 7. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

**[00117]** 8. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

**[00118]** 9. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

**[00119]** 10. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

**[00120]** 11. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

**[00121]** 12. Способ по варианту осуществления 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

**[00122]** 13. Способ по варианту осуществления 1, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00123]** 14. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

**[00124]** 15. Способ по варианту осуществления 14, в котором указанный гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

**[00125]** 16. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,01 мг/кг.

**[00126]** 17. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,03 мг/кг.

**[00127]** 18. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,09 мг/кг.

**[00128]** 19. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,18 мг/кг.

**[00129]** 20. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,36 мг/кг.

**[00130]** 21. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,72 мг/кг.

**[00131]** 22. Способ по варианту осуществления 15, в котором гибридный белок вводят в дозе 1,08 мг/кг.

**[00132]** 23. Способ по варианту осуществления 14, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00133]** 24. Способ по варианту осуществления 14, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

**[00134]** 25. Способ по варианту осуществления 1, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

**[00135]** 1A. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

**[00136]** 2A. Способ по варианту осуществления 1A, в котором субъект имеет избыточный вес.

**[00137]** 3A. Способ по варианту осуществления 2A, в котором ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

**[00138]** 4A. Способ по варианту осуществления 3A, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[00139]** 5A. Способ по варианту осуществления 1A, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

**[00140]** 6A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

**[00141]** 7A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

**[00142]** 8A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

**[00143]** 9A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

**[00144]** 10A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

**[00145]** 11A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

**[00146]** 12A. Способ по варианту осуществления 5A, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

**[00147]** 13A. Способ по варианту осуществления 1A, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00148]** 14A. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

**[00149]** 15A. Способ по варианту осуществления 14A, в котором указанный гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

**[00150]** 16A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,01 мг/кг.

**[00151]** 17A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,03 мг/кг.

**[00152]** 18A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,09 мг/кг.

**[00153]** 19A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,18 мг/кг.

**[00154]** 20A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,36 мг/кг.

**[00155]** 21A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,72 мг/кг.

**[00156]** 22A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят в дозе 1,08 мг/кг.

**[00157]**

**[00158]** 23A. Способ по варианту осуществления 15A, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00159]** 24A. Способ по варианту осуществления 14A, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

**[00160]** 25A. Способ по варианту осуществления 1A, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

**[00161]** 1B. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение один раз в неделю субъекту композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

**[00162]** 2B. Способ по варианту осуществления 1B, в котором субъект имеет избыточный вес.

**[00163]** 3B. Способ по варианту осуществления 2B, в котором ИМТ субъекта

составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

**[00164]** 4В. Способ по варианту осуществления 3В, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[00165]** 5В. Способ по варианту осуществления 1В, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

**[00166]** 6В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

**[00167]** 7В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

**[00168]** 8В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

**[00169]** 9В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

**[00170]** 10В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

**[00171]** 11В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

**[00172]** 12В. Способ по варианту осуществления 5В, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

**[00173]** 13В. Способ по варианту осуществления 1В, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00174]** 14В. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение один раз в неделю субъекту композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

**[00175]** 15В. Способ по варианту осуществления 14В, в котором указанный гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

**[00176]** 16В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,01 мг/кг.

**[00177]** 17В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,03 мг/кг.

**[00178]** 18В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,09 мг/кг.

**[00179]** 19В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,18 мг/кг.

**[00180]** 20В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,36 мг/кг.

**[00181]** 21В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,72 мг/кг.

**[00182]** 22В. Способ по варианту осуществления 15В, в котором гибридный белок вводят в дозе 1,08 мг/кг.

**[00183]** 23В. Способ по варианту осуществления 22В, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00184]** 1С. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение субъекту один раз в неделю композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

**[00185]** 2С. Способ по варианту осуществления 1С, в котором субъект имеет избыточный вес.

**[00186]** 3С. Способ по варианту осуществления 2С, в котором ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

**[00187]** 4С. Способ по варианту осуществления 3С, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

**[00188]** 5С. Способ по варианту осуществления 1С, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

**[00189]** 6С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

**[00190]** 7С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

**[00191]** 8С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

**[00192]** 9С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

**[00193]** 10С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

**[00194]** 11С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

**[00195]** 12С. Способ по варианту осуществления 5С, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

**[00196]** 13С. Способ по варианту осуществления 1С, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

**[00197]** 14С. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение субъекту один раз в неделю композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне

от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

**[00198]** 15С. Способ по варианту осуществления 14С, в котором указанный гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

**[00199]** 16С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,01 мг.

**[00200]** 17С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,03 мг.

**[00201]** 18С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,09 мг.

**[00202]** 19С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,18 мг.

**[00203]** 20С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,36 мг.

**[00204]** 21С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,72 мг.

**[00205]** 22С. Способ по варианту осуществления 15С, в котором гибридный белок вводят в дозе 1,08 мг.

**[00206]** 23С. Способ по варианту осуществления 22С, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

## **ПРИМЕРЫ**

**[00207]** Для дополнительной иллюстрации характера изобретения предложены следующие примеры изобретения. Предполагается, что любой специалист в данной области может, используя предыдущее описание и следующие иллюстративные примеры, реализовать и использовать настоящее изобретение и применить на практике заявленные способы. Следует понимать, что следующие примеры не ограничивают изобретение и что объем изобретения определен прилагаемыми пунктами формулы изобретения.

Пример 1. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15, - влияние усечений GDF15

**[00208]** Как и другие члены семейства TGF $\beta$ , белок GDF15 синтезируется как пре-про-белок, который образует димер в эндоплазматическом ретикулуме и подвергается фуриновому расщеплению с продуцированием секретируемого зрелого GDF15 (аминокислоты 197-308). Секретируемый зрелый гомодимер GDF15 имеет массу около 25 кДа и каждый мономер способен образовывать до 4 внутримолекулярных дисульфидных связей с одним межмолекулярным дисульфидом, связывающим компоненты гомодимера.

**[00209]** Кристаллическая структура GDF15 определена в изобретении и показана на Фиг. 1А и 1В. Из кристаллической структуры видно, что С-конец зрелого GDF15 скрыт на границе раздела димеров, в то время как N-конец остается открытым. Этот открытый конец позволяет связывать гибридные белки, такие как белки, продлевающие период полужизни, с N-концом GDF15.

**[00210]** В кристаллической структуре также виден новый узор дисульфидных мостиков между цистеиновыми остатками GDF15. В то время как TGFβ1 имеет мостики C1-C3 и C2-C7 (т. е. мостики между его первым и третьим цистеиновыми остатками, а также между его вторым и седьмым цистеиновыми остатками), GDF15 имеет мостики C1-C2 и C3-C7 (см. Фиг. 1А и 1В). Эти уникальные дисульфидные мостики приводят к замыканию петли, образованной мостиком C1-C2, который расположен на N-конце белка и на удалении от цистеинового узла, который содержит другие дисульфидные связи. Исходя из структуры, можно предположить, что N-конец GDF15 может не быть критическим для образования димера или общего складывания белка, и что GDF15 и присоединенные молекулы на его N-конце могут быть толерантны к делециям на N-конце, которые удаляют остатки C1 и C2, остатки внутри петли C1-C2 и даже остатки на C-конце, связанные с C2.

Пример 2. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15, - влияние линкера

**[00211]** Проводили оценки разных линкеров между молекулой HSA и молекулой GDF15. Оценке подвергались как гибкие линкеры, содержащие последовательность (GGGGS)<sub>n</sub>, так и структурированные линкеры, содержащие последовательность (AP)<sub>n</sub> или (EAAAK)<sub>n</sub>, где n составляет 2-20.

**[00212]** Гибридные белки, содержащие разные линкеры, сравнивали по их биофизическим свойствам, их влиянию на эффективность потребления пищи тощими мышами, их фармакокинетическим (ФК) параметрам у мышей и их стабильности *ex vivo* в человеческой крови. Результаты испытаний вариантов линкеров показаны в таблице 1. Молекула, содержащая SEQ ID NO: 31, которая содержала линкер (EAAAK)<sub>8</sub>, по данным ВЭЖХ, образовывала агрегаты. Остальные семь вариантов линкеров в таблице 1 не образовывали агрегатов.

**[00213]** Таблица 1. Обобщенные данные анализа вариантов линкеров

| SEQ ID NO* | Линкер                    | Агрегация | Хорошие фармакокинетические (ФК) параметры у мышей (WT) | Стабильность <i>ex vivo</i> в человеческой крови |
|------------|---------------------------|-----------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 25         | AS(GGGGS) <sub>2</sub> GT | Нет       | Да                                                      | Да                                               |
| 5          | GS(GGGGS) <sub>4</sub>    | Нет       | Да                                                      | Да                                               |
| 26         | AS(GGGGS) <sub>8</sub> GT | Нет       | Да                                                      | Да                                               |
| 27         | AS(AP) <sub>5</sub> GT    | Нет       | Да                                                      | Да                                               |
| 28         | AS(AP) <sub>10</sub> GT   | Нет       | Да                                                      | Да                                               |
| 29         | AS(AP) <sub>20</sub> GT   | Нет       | Да                                                      | Да                                               |

|    |                           |     |               |               |
|----|---------------------------|-----|---------------|---------------|
| 30 | AS(EAAAK) <sub>4</sub> GT | Нет | Да            | Да            |
| 31 | AS(EAAAK) <sub>8</sub> GT | ДА  | Не исследован | Не исследован |

\* К N-концу была присоединена метка 6xHis для целей очистки.

**[00214]** Для этих вариантов также оценивали стабильность линкеров по исследованиям *in vivo* у мышей, а также по исследованиям стабильности *ex vivo* в пробах человеческой цельной крови и плазмы. В анализе результатов, полученных в этих исследованиях, применяли две формы обнаружения. Оценку интактности линкера проводили методом иммуноанализа с парами антител, анти-GDF15 для захвата и анти-HSA для обнаружения, причем определяли наличие обеих молекул с какой-либо из сторон линкера. Более широкую картину целостности всей молекулы анализировали методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХМС) с использованием разных суррогатных пептидных последовательностей из HSA и GDF15. Иммуноанализ показал стабильный ФК профиль для всех вариантов линкеров и отсутствие потери концентрации в пробах плазмы с добавками для любого из вариантов линкеров по результатам наблюдения в течение 48 часов. Результаты ЖХМС согласовывались с результатами иммуноанализа, что демонстрирует, что суррогатные пептиды из различных участков молекул HSA и GDF15 были интактными. ФК профиль вариантов линкеров, подвергнутых анализу методом ЖХМС с использованием суррогатных пептидов, продемонстрировал аналогичную тенденцию для разных вариантов линкеров, причем все они имели обнаруживаемые уровни на 7-й день. Все варианты, приведенные в таблице 1, за исключением SEQ ID 31, имели желаемые биофизические свойства и ФК параметры.

**[00215]** Варианты линкеров оценивали по их активности *in vivo* посредством проведения исследований потребления пищи тощими мышами. В таблице 2 показано влияние вариантов линкеров на эффективность гибридного белка в отношении уменьшения потребления пищи. Показано явное влияние линкера на эффективность. Что касается гибких линкеров (GGGS)<sub>n</sub>, то увеличение длины линкера от 2 до 4-8 привело к существенному увеличению эффективности гибридного белка. Для более ригидных линкеров (AP)<sub>n</sub> тенденция была менее очевидной, что свидетельствует о том, что решающую роль в эффективности гибридного белка играет степень свободы молекулы GDF15.

**[00216]** Таблица 2. Влияние линкера на эффективность *in vivo* гибридных белков HSA-GDF15 у тощих мышей

| SEQ ID NO* | Линкер                    | Уменьшение потребления пищи, %<br>(среднее) |
|------------|---------------------------|---------------------------------------------|
| 25         | AS(GGGGS) <sub>2</sub> GT | 28,8                                        |
| 5          | GS(GGGGS) <sub>4</sub>    | 40,5                                        |
| 26         | AS(GGGGS) <sub>8</sub> GT | 60,7                                        |
| 27         | AS(AP) <sub>5</sub> GT    | 48,2                                        |



|    |                           |      |
|----|---------------------------|------|
| 28 | AS(AP) <sub>10</sub> GT   | 66,2 |
| 29 | AS(AP) <sub>20</sub> GT   | 55,1 |
| 30 | AS(EAAAK) <sub>4</sub> GT | 51,9 |

\* К N-концу была присоединена метка 6xHis для целей очистки.

Пример 3. Конфигурация гибридных молекул, содержащих GDF15, - влияние мутаций HSA

**[00217]** Были составлены рекомбинантные белки, состоящие из белка, продлевающего период полужизни, человеческого сывороточного альбумина, присоединенного к N-концу GDF15 посредством линкера. Такая конфигурация должна обеспечивать целостность интерфейса димеризации GDF15 и допускать соединение через нативные межцепочечные дисульфидные мостики, приводя к образованию гомодимера GDF15, в котором из каждого плеча GDF15 выдвинут слитый с ним HSA. При таком подходе для создания гомодимера HSA-GDF15 требуется только один ген.

**[00218]** Нативный человеческий сывороточный альбумин содержит 35 цистеиновых (Cys, C) остатков, которые образуют 17 дисульфидных мостиков, при этом остаток Cys-34 является единственным свободным цистеином в молекуле. Было показано, что этот свободный остаток Cys-34 функционирует как акцептор свободных радикалов, улавливая множество активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS). По этой причине свободный остаток Cys заменили так, чтобы минимизировать риск гетерогенности в результате окисления.

**[00219]** Свободный цистеин в положении 34 HSA заменяли на серин или аланин и анализировали гибридные молекулы GDF15 с мутацией HSA (C34S) или HSA (C34A). Обе молекулы очищали с использованием трехстадийного способа очистки: (i) ионообменная хроматография, (ii) гидрофобная хроматография и (iii) эксклюзионная хроматография. Сразу же после создания этих молекул анализ ВЭЖХ показал, что обе молекулы были чистыми и не содержали агрегатов (таблица 3).

**[00220]** Однако через две недели после создания гибридного белка с мутацией HSA (C34A) (содержащего SEQ ID NO: 48) анализ ВЭЖХ показал наличие в нем агрегатов, тогда как гибридный белок с мутацией HSA (C34S) (содержащий SEQ ID NO: 40) и через четыре недели не содержал агрегатов.

**[00221]** Таблица 3. Влияние мутации HSA C34 на агрегацию гибридного белка

| SEQ ID NO | Мутация HSA | Агрегация сразу после очистки, % | Агрегация через 2 недели после очистки, % |
|-----------|-------------|----------------------------------|-------------------------------------------|
| 40        | C34S        | 0                                | 0                                         |
| 48        | C34A        | 0                                | 33,29                                     |

Пример 4. Предрасположенность к расщеплению протеазами в GDF15

**[00222]** Авторы изобретения наблюдали, что остаток аргинина в положении аминокислоты 198 GDF15 (R198) предрасположен к расщеплению протеазами в гибридных

молекулах HSA-GDF15. Такое расщепление приводит к образованию гетерогенной популяции и нежелательно для терапевтических композиций. Расщепление можно предотвратить с помощью смеси ингибиторов протеаз. Были проведены исследования способов очистки для удаления протеазы. В таблице 4 указаны два типа колонок для проведения аффинной хроматографии HSA, с которыми проводили испытания по очистке гибридных белков HSA-GDF15, определяемой методом ВЭЖХ. На момент очистки гибридные белки HSA-GDF15, очищенные обоими способами, были на 100% чистыми и интактными. При низких концентрациях (2-5 мг/мл) белки, очищенные обоими способами, оставались интактными в течение всего периода испытания 4 недели. Однако при высоких концентрациях (40-50 мг/мл) только смола с антителами к HSA (CaptureSelect) позволяла очистить от протеазы белки, которые затем оставались интактными в течение всего периода испытания 4 недели. Смола с лигандами HSA (Albupure) позволяла очистить белки, которые сначала были интактными, а затем в процессе хранения в высоких концентрациях подвергались расщеплению. Добавление смеси ингибиторов протеаз (PI) и ЭДТА полностью подавляло расщепление партии гибридного белка HSA-GDF15 в высокой концентрации, очищенной с помощью смолы Albupure. Таким образом, способ очистки играет решающую роль в создании стабильной терапевтической композиции. Соответствующее разложение не наблюдалось *in vivo* или *ex vivo*, что свидетельствует о том, что после очистки терапевтической композиции от протеазы расщепление гибридных белков не является проблемой *in vivo*. Таким образом, способы очистки, позволяющие эффективно удалять возможные молекулы протеазы в процессе производства, например, использование смолы CaptureSelect, играют ключевую роль в успешном производстве терапевтических препаратов GDF15, которые являются гомогенными, интактными и стабильными.

[00223] Таблица 4. Расщепление гибридных белков HSA-GDF15 протеазами можно предотвратить способами очистки проб

| Условие      |               |              | Разложение в популяции HSA-GDF15 (SEQ ID 60), % |               |               |               |               |
|--------------|---------------|--------------|-------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Концентрация | Смола         | +PI/<br>ЭДТА | 0-Я<br>НЕДЕЛЯ                                   | 1-Я<br>НЕДЕЛЯ | 2-Я<br>НЕДЕЛЯ | 3-Я<br>НЕДЕЛЯ | 4-Я<br>НЕДЕЛЯ |
| Низк.        | CaptureSelect | Нет          | 0                                               | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Низк.        | Albupure      | Нет          | 0                                               | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Высок.       | CaptureSelect | Нет          | 0                                               | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Высок.       | Albupure      | Нет          | 0                                               | 3,04          | 9,47          | 11,57         | 13,89         |
| Высок.       | CaptureSelect | Да           | 0                                               | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Высок.       | Albupure      | Да           | 0                                               | 0             | 0             | 0             | 0             |

#### Пример 5. Варианты GDF15 с N-концевыми делециями

**[00224]** Кристаллическая структура GDF15, показанная на Фиг. 1A и 1B, позволяет предположить, что N-конец GDF15, затронутый в вариантах делеции, не является критическим для образования димера или общего фолдинга белка. Это также позволяет предположить, что такие N-концевые делеции не должны влиять на взаимодействие с возможными рецепторами. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие различные делеции N-конца GDF15, испытывали на активность *in vivo*.

**[00225]** Были запланированы варианты N-концевых делеций GDF15, которые удаляли сайт расщепления протеазами в GDF15 (R198). Непосредственно за остатком R198 у остатков N199-G200 имеется потенциальный сайт дезамидирования, а дезамидирование субстрата в терапевтических композициях также нежелательно. N-концевые делеции GDF15 могут одновременно удалять и сайт протеолитического расщепления, и сайты дезамидирования. Полученные в результате варианты делеций GDF15, которые были встроены в гибридные белки с HSA, включали GDF15 (201-308; SEQ ID NO: 8), GDF15 (202-308; SEQ ID NO: 9) и GDF15 (211-308; SEQ ID NO: 11). Исследования *in vivo* у мышей показали, что варианты GDF15 с N-концевыми делециями по-прежнему активно влияют на снижение потребления пищи (Фиг. 17). Экспериментальные данные подтвердили, что такие варианты GDF15 с N-концевыми делециями правильно экспрессируются, образуют надлежащие димеры и активны *in vivo*.

#### Пример 6. Неактивные мутанты GDF15

**[00226]** В таблице 5 перечислены двенадцать мутантов GDF15, которые были созданы для устранения активности GDF15 *in vivo* и определения функционального эпитопа GDF15. Мутанты включают пять точечных мутантов, два двойных мутанта и пять тройных мутантов. Гибридные белки HSA-GDF15, содержащие эти мутации, были охарактеризованы по их биофизическим свойствам и активностям (таблица 5). Из 12 мутантов один не экспрессировался, а четыре со временем образовывали агрегаты, что указывает на то, что мутации нарушают фолдинг белков и их биофизические свойства. Четыре из оставшихся семи мутантов содержали точечную мутацию GDF15, и эти мутанты испытывали на мышах с точки зрения снижения потребления пищи по сравнению с диким типом. Три из точечных мутантов (I89R, I89W и W32A) утратили активность *in vivo*, а один мутант (Q60W) остался таким же активным, как и дикий тип. Эти результаты показывают, что мутация I89R, I89W или W32A прерывает взаимодействие рецептора/корцептора с GDF15, что свидетельствует о том, что функциональные эпитопы GDF15 находятся вокруг рядом с остатками I89 и W32. Мутации пронумерованы на основе зрелого GDF15, вставленного в гибридный белок, т. е. «1» относится к 1-й аминокислоте зрелого GDF15 (SEQ ID NO: 6), а «89» относится к 89-й аминокислоте зрелого белка GDF15.

**[00227]** Таблица 5. Сводные данные по биофизическим свойствам и активностям гибридных белков, содержащих мутанты GDF15

| SEQ ID NO | Мутации в GDF15 | Биофизические свойства | Активности |
|-----------|-----------------|------------------------|------------|
|-----------|-----------------|------------------------|------------|

|    |                  |                                            |                                     |
|----|------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| 5  | Дикий тип        | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   | Активность дикого типа              |
| 64 | I89R             | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   | Полная потеря активности            |
| 65 | I89W             | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   | Полная потеря активности            |
| 66 | L34A, S35A, R37A | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   |                                     |
| 67 | V87A, I89A, L98A | Хорошо<br>экспрессируется,<br>нестабильный |                                     |
| 68 | L34A, S35A, I89A | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   |                                     |
| 69 | V87A, I89A       | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   |                                     |
| 70 | Q60W             | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   | Такой же активный, как<br>дикий тип |
| 71 | W32A             | Хорошо<br>экспрессируется,<br>стабильный   | Полная потеря активности            |
| 72 | W29A             | Хорошо<br>экспрессируется,<br>нестабильный |                                     |
| 73 | Q60A, S64A, R67A | Хорошо<br>экспрессируется,<br>нестабильный |                                     |
| 74 | W29A, Q60A, I61A | Не экспрессируется                         |                                     |

|    |            |                                            |  |
|----|------------|--------------------------------------------|--|
| 75 | W29A, W32A | Хорошо<br>экспрессируется,<br>нестабильный |  |
|----|------------|--------------------------------------------|--|

\* К N-концу была присоединена метка 6xHis для целей очистки.

Пример 7. Экспрессия и способы очистки

#### [00228] Экспрессия

**[00229]** Для экспрессии 20 мл и большего объема экспрессию проводили в клетках НЕК Expi293™, выращенных в среде экспрессии Expi293™. Клетки выращивали при температуре 37 °С при встряхивании со скоростью 125 об/мин с 8% CO<sub>2</sub>. Клетки трансфицировали с плотностью  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл с помощью набора для экспрессии Expi293™. На каждый литр трансфицированных клеток 1 мг общей ДНК разводили в 25 мл Opti-MEM и 2,6 мл реагента Expi293™ разводили в 25 мл Opti-MEM и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Разведенную ДНК и разведенный реагент Expi293 объединяли и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем комплекс ДНК добавляли к клеткам. Клетки помещали на ночь во встряхиватель-инкубатор. На следующий день после трансфекции 5 мл реагента Enhancer 1 из набора разводили в 50 мл реагента Enhancer 2 из набора, и весь объем из двух реагентов Enhancer добавляли к клеткам. Трансфицированные клетки помещали обратно в инкубатор на 4 дня до их отбора. Клетки концентрировали центрифугированием при 6000 g в течение 30 минут, а затем фильтровали через фильтр с ячейкой 0,2 мкм перед стадией очистки.

**[00230]** Экспрессию также проводили в клетках CHO. Плазмиду подвергали очистке и характеристике. Перед трансфекцией 1 аликвоту 200 мкг плазмидной ДНК, содержащей кодирующую область HSA-GDF15, линеаризовали посредством расщепления рестрикционным ферментом Acl I. Расщепление данной рестрикционной эндонуклеазой обеспечивает удаление гена резистентности к ампициллину. Две линеаризованные аликвоты по 15 мкг ДНК трансфицировали в двух порциях по  $1 \times 10^7$  клеток CHO (обозначены как пулы трансфекции А и В) с помощью электроманипулятора клеток ВТХ ЕСМ 830 Electro Cell Manipulator (Harvard Apparatus, г. Холлистон, штат Массачусетс, США). Клетки подвергали 3-кратной электропорации под напряжением 250 вольт с длительностью импульсов 15 миллисекунд и интервалами между импульсами 5 секунд в кювете с шириной зазора 4 мм. Трансфицированные клетки переносили во встряхиваемую колбу, содержащую MACH-1+L-глутамин, и инкубировали в течение 1 дня. Пул трансфекции А и пул трансфекции В центрифугировали, ресуспендировали в среде MACH-1+MSX и переносили во встряхиваемые колбы для инкубации в течение 6 дней. Трансфицированные клетки, продуцирующие HSA-гибридный белок, из пула трансфекции А и пула трансфекции В объединяли и высевали на метилцеллюлозу на 8-й день после электропорации.

#### [00231] Очистка

**[00232]** Проводили двухстадийную очистку с использованием смолы CaptureSelect

и эксклюзионной хроматографии. Клеточные супернатанты от временно трансфицированных клеток Expi293™ загружали в предварительно уравновешенную (PBS, pH 7,2) колонку со смолой CaptureSelect для связывания HSA (матрица аффинности к человеческому альбумину CaptureSelect от компании ThermoFisher Scientific) при приблизительной емкости 10 мг белка на 1 мл смолы. После загрузки несвязанные белки удаляли посредством промывания колонки PBS с pH 7,2 в количестве 10 объемов колонки (CV). HSA-GDF15, который был связан в колонке, элюировали 10 объемами CV раствора 2 М MgCl<sub>2</sub> в 20 mM Tris, pH 7,0. Соответствующие пикам фракции отбирали, фильтровали (0,2 мкм) и диализировали против PBS с pH 7,2 при 4 °C. После диализа белок повторно фильтровали (0,2 мкм) и концентрировали до подходящего объема перед загрузкой на колонку 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Фракции белка, элюированные из колонки эксклюзионной хроматографии (SEC) с высокой степенью чистоты (по определению электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН-ПААГ)), объединяли. Концентрацию белка определяли по поглощению света 280 нм на спектрофотометре BioTek Synergy HTTM. Качество очищенных белков оценивали ДСН-ПААГ и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (ЭХ-ВЭЖХ, система Dionex HPLC). Уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-анализа (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

**[00233]** Также проводили двухстадийную очистку с использованием смолы AlbuPure и эксклюзионной хроматографии. Гибридные белки HSA-GDF15 очищали при комнатной температуре с использованием смолы AlbuPure (ProMetic BioSciences Ltd), в которой использован иммобилизованный синтетический триазиновый лиганд для селективного связывания HSA. К смоле AlbuPure добавляли супернатанты с экспрессией. Затем смолу промывали, сначала 4 объемами CV PBS с pH 7,2, а затем 4 объемами CV буферного раствора 50 mM Tris с pH 8,0, 150 mM NaCl. HSA-GDF15, который был связан в колонке, элюировали 4 объемами CV PBS с pH 7,2, содержащего 100 mM октаноата натрия. Фракции, содержащие белок, концентрировали до объема 10 мл с помощью концентратора-центрифуги с отсечением по молекулярной массе 30 000 кДа (Amicon), а затем пропускали через колонку 26/60 Superdex S200pg (GE), уравновешенную PBS с pH 7,2. Фракции после эксклюзионной хроматографии, содержащие гомодимер HSA-GDF15, идентифицировали ДСН-ПААГ и объединяли для анализа. Степень чистоты белка оценивали ДСН-ПААГ и ЭХ-ВЭЖХ.

**[00234]** Примеры 8-14 и 19 включают характеристику примера гибридного белка изобретения, ~~который~~ имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимерного гибрида HSA и зрелого человеческого GDF15, соединенных линкером, содержащим 42 аминокислоты и состоящим из глициновых и сериновых остатков, GS-(GGGGS)<sub>8</sub>. Расчетная молекулярная масса этого гибридного белка составляет 162 696 дальтон, а единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен на серин. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет называться просто «FP1». Вариант FP1 с меткой 6xHis (6xHis-

FP1, SEQ ID NO: 26), содержащий линкер AS-(GGGGS)x8-GT, использовали для сравнения в некоторых из приведенных ниже примеров.

Пример 8. Влияние FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6

**[00235]** Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать дозозависимое влияние FP1 на ингибирование потребления пищи мышами линии C57BL/6.

**[00236]** Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем мышей разделяли на шесть групп по восемь животных на основании потребления пищи в предыдущие 24 часа. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композицию, содержащую FP1, посредством подкожной инъекции. Изменение массы корма в каждой клетке непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после инъекций. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

**[00237]** Результаты (Фиг. 2 и таблица 6) выражали как среднее значение суммарного потребления пищи для конкретного периода времени. Результаты показали, что подкожное введение FP1 мышам линии C57BL/6 существенно подавляло потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех дозах и во все моменты времени в ходе испытания. Введение 6xHis-FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг.

**[00238]** Таблица 6. Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи мышами линии C57BL/6; показано суммарное потребление пищи через 12, 24 и 48 часов после введения

| Суммарное потребление пищи (г) |                      |                      |                      |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Обработка                      | 12 часов             | 24 часа              | 48 часов             |
| PBS                            | $3,7 \pm 0,2$        | $4,3 \pm 0,1$        | $8,4 \pm 0,3$        |
| FP1, 1 нмоль/кг                | $2,9 \pm 0,1^*$      | $3,4 \pm 0,2^{**}$   | $7,0 \pm 0,3^{**}$   |
| FP1, 4 нмоль/кг                | $2,3 \pm 0,2^{****}$ | $3,1 \pm 0,1^{****}$ | $6,6 \pm 0,3^{***}$  |
| FP1, 8 нмоль/кг                | $2,1 \pm 0,2^{****}$ | $3,2 \pm 0,1^{***}$  | $6,4 \pm 0,2^{****}$ |
| FP1, 16 нмоль/кг               | $1,7 \pm 0,2^{****}$ | $2,7 \pm 0,2^{****}$ | $6,2 \pm 0,3^{****}$ |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг          | $1,8 \pm 0,2^{****}$ | $2,6 \pm 0,2^{****}$ | $6,0 \pm 0,2^{****}$ |

Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS; \*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , по сравнению с PBS; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , по сравнению с PBS

Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки для множественных сравнений; n=по 8/группа

Пример 9. Влияние FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Дули

**[00239]** Цель данного эксперимента заключалась в том, чтобы продемонстрировать дозозависимое влияние FP1 на ингибирование потребления пищи у крыс линии Спрег-Доули.

**[00240]** Самцы крыс линии Спрег-Доули в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ. Затем крыс разделяли на шесть групп по восемь животных на основании потребления пищи в предыдущие 24 часа. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композицию, содержащую гибридный белок, посредством подкожной инъекции. Изменение массы корма в каждой клетке непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после инъекций. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

**[00241]** Результаты представлены на Фиг. 3 и в таблице 7. Подкожное введение FP1 в дозах 2,5 нмоль/кг и 10 нмоль/кг подавляло потребление пищи по сравнению с животными, получавшими носитель. Подавление достигало статистической значимости только при самой высокой испытанной дозе (10 нмоль/кг) через 24 и 48 часов после введения. Введение FP1 вызывало снижение потребления пищи при дозе 8 нмоль/кг, и этот эффект был значимым через 24 и 48 часов.

**[00242]** Таблица 7. Влияние подкожного введения FP1 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули; показано суммарное потребление пищи через 12, 24 и 48 часов после введения

| Суммарное потребление пищи (г) |            |              |              |
|--------------------------------|------------|--------------|--------------|
| Обработка                      | 12 часов   | 24 часа      | 48 часов     |
| PBS                            | 20,6 ± 1,3 | 25,3 ± 1,3   | 49,1 ± 2,1   |
| FP1, 0,1 нмоль/кг              | 23,3 ± 1,4 | 26,9 ± 0,8   | 52,8 ± 1,3   |
| FP1, 0,5 нмоль/кг              | 22,6 ± 1,7 | 25,1 ± 1,0   | 48,3 ± 1,8   |
| FP1, 2,5 нмоль/кг              | 20,0 ± 1,4 | 22,0 ± 1,0   | 44,6 ± 1,4   |
| FP1, 10 нмоль/кг               | 18,7 ± 0,9 | 19,9 ± 1,0*  | 39,9 ± 2,3*  |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг          | 17,0 ± 1,5 | 18,8 ± 1,4** | 38,4 ± 2,5** |

Данные представлены как среднее ± SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS; \*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS

Однофакторный дисперсионный анализ и критерий Тьюки для множественных сравнений; n=по 8/группа

Пример 10. Влияние FP1 на гомеостаз глюкозы и массу тела у мышей с алиментарным ожирением (DIO)

**[00243]** Цель настоящего эксперимента заключалась в оценке влияния FP1 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы в течение двух недель обработки у мышей DIO линии C57BL/6.

**[00244]** Самцов мышей DIO взвешивали и подкожно вводили им FP1 в дозе 2 мл/кг раз в три дня (q3d) в 0-й, 3-й, 6-й, 9-й и 12-й дни. Группам лечения, получавшим носитель и росиглитазон, вводили PBS по аналогичной схеме. Животным контрольной группы



росиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%, доступ к корму не ограничивали. Массу тела мышей и массу пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли с помощью глюкометра (One Touch® Ultra®, Lifescan, г. Милпитас, штат Калифорния, США). Массу жировой и нежировой ткани у находящихся в сознании мышей количественно измеряли методом ЯМР с разрешением по времени (TD-NMR) с помощью прибора Bruker Mini-Spec LF110. Пероральный тест на толерантность к глюкозе (OGTT) у мышей проводили через 4 часа голодания. Глюкозу в крови измеряли через надрез на хвосте через 0, 30, 60, 90 и 120 минут после введения через желудочный зонд 2 г/кг глюкозы, 10 мл/кг. Инсулин измеряли через 0, 30 и 90 минут после введения глюкозы.

**[00245]** В конце исследования мышей умерщвляли посредством ингаляции CO<sub>2</sub> и отбирали пробу терминальной крови. Сыворотку помещали в планшет на 96 лунок на влажный лед, а затем хранили при температуре -80 °C. Извлекали печень и оценивали содержание жира по отношению к общей массе на срезах печени с помощью TD-NMR на приборе Bruker MiniSpec mq60 в соответствии с инструкцией производителя.

**[00246]** Выполняли оценку резистентности к инсулину натошак по гомеостатической модели (HOMA-IR) на основании произведения глюкозы натошак (в мг/дл) и инсулина (в мЕД/л), поделенного на коэффициент 405.

**[00247]** Введение мышам DIO FP1 по схеме q3d в дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг приводило к снижению массы тела (таблица 8) и потребления пищи (таблица 9). Указанные снижения достигали статистической значимости только в определенные моменты времени, как описано ниже.

**[00248]** FP1 вызывал уменьшение массы тела при дозах 1 (со 2-го по 14-й день) и 10 нмоль/кг (с 1-го по 14-й день) у мышей DIO (таблица 8 и Фиг. 4). Значительное снижение потребления пищи наблюдали в 1-й и 2-й дни исследования при дозе 1 нмоль/кг и в 1-й, 8-й и 9-й дни при дозе 10 нмоль/кг (таблица 9).

**[00249]** Таблица 8. Изменение массы тела (% от начальной) во время введения FP1 у мышей DIO

| Обработка<br>День | Носитель<br>н/п | FP1 (нмоль/кг) |             |             | Росиглитазон<br>10 мг/кг в день |
|-------------------|-----------------|----------------|-------------|-------------|---------------------------------|
|                   |                 | 0,1            | 1           | 10          |                                 |
| -2                | 0,1 ± 0,2       | -0,1 ± 0,4     | 0,6 ± 0,4   | 0,2 ± 0,3   | 0,1 ± 0,2                       |
| -1                | -0,8 ± 0,3      | -0,2 ± 0,3     | 0,4 ± 0,3   | -0,3 ± 0,4  | -0,9 ± 0,2                      |
| 0                 | 0,0 ± 0,0       | 0,0 ± 0,0      | 0,0 ± 0,0   | 0,0 ± 0,0   | 0,0 ± 0,0                       |
| 1                 | 0,1 ± 0,2       | -0,1 ± 0,4     | -1,5 ± 0,5  | -2,8 ± 0,4* | 1,9 ± 0,2                       |
| 2                 | 0,0 ± 0,3       | -0,8 ± 0,5     | -3,2 ± 0,4* | -3,1 ± 0,5* | 2,2 ± 0,5                       |
| 3                 | -0,2 ± 0,4      | -0,4 ± 0,4     | -3,2 ± 0,6* | -4,0 ± 0,7* | 2,6 ± 0,5                       |
| 4                 | -0,4 ± 0,5      | -0,7 ± 0,5     | -3,8 ± 0,6* | -4,4 ± 0,8* | 3,0 ± 0,5*                      |
| 5                 | -0,5 ± 0,4      | -1,0 ± 0,3     | -4,0 ± 0,5* | -4,6 ± 0,9* | 3,8 ± 0,6*                      |
| 6                 | -0,4 ± 0,6      | -0,5 ± 0,5     | -3,8 ± 0,4* | -5,6 ± 0,9* | 4,0 ± 0,7*                      |

|                                                                      |            |            |             |             |            |
|----------------------------------------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|
| 7                                                                    | -0,3 ± 0,5 | -0,5 ± 0,5 | -4,3 ± 0,6* | -6,1 ± 0,9* | 5,5 ± 0,8* |
| 8                                                                    | -0,6 ± 0,5 | -0,5 ± 0,5 | -4,2 ± 0,6* | -6,7 ± 1,1* | 6,1 ± 0,9* |
| 9                                                                    | -0,4 ± 0,5 | -0,2 ± 0,5 | -4,5 ± 0,6* | -7,2 ± 1,2* | 7,0 ± 1,0* |
| 10                                                                   | -0,3 ± 0,5 | 0,3 ± 0,5  | -4,4 ± 0,8* | -7,8 ± 1,2* | 7,8 ± 1,1* |
| 11                                                                   | -0,5 ± 0,5 | 0,5 ± 0,4  | -4,4 ± 0,8* | -7,9 ± 1,4* | 8,2 ± 1,2* |
| 12                                                                   | -0,8 ± 0,6 | 0,8 ± 0,5  | -4,3 ± 1,0* | -7,9 ± 1,5* | 8,5 ± 1,2* |
| 13                                                                   | -0,8 ± 0,6 | 0,5 ± 0,5  | -3,9 ± 0,9* | -8,7 ± 1,6* | 8,6 ± 1,3* |
| 14                                                                   | -1,7 ± 0,6 | -0,4 ± 0,5 | -4,6 ± 1,0* | -9,0 ± 1,7* | 7,6 ± 1,3* |
| Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.                |            |            |             |             |            |
| * p < 0,05, по сравнению со значением в группе, получавшей носитель. |            |            |             |             |            |

[00250] Таблица 9. Суточное потребление пищи (г) во время обработки FP1 мышей DIO

| Обработка<br>День                                                    | Носитель<br>н/п | FP1 (нмоль/кг) |            |            | Росиглитазон<br>10 мг/кг в день |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|------------|------------|---------------------------------|
|                                                                      |                 | 0,1            | 1          | 10         |                                 |
| -2                                                                   | 2,9 ± 0,1       | 3,0 ± 0,2      | 2,9 ± 0,1  | 2,8 ± 0,1  | 2,8 ± 0,1                       |
| 0                                                                    | 3,0 ± 0,1       | 3,0 ± 0,1      | 2,8 ± 0,1  | 2,8 ± 0,1  | 3,0 ± 0,1                       |
| 1                                                                    | 2,9 ± 0,1       | 3,1 ± 0,1      | 2,1 ± 0,2* | 1,5 ± 0,1* | 3,6 ± 0,1*                      |
| 2                                                                    | 3,0 ± 0,1       | 3,0 ± 0,1      | 2,3 ± 0,1* | 2,6 ± 0,2  | 3,9 ± 0,2*                      |
| 3                                                                    | 2,8 ± 0,1       | 3,0 ± 0,1      | 2,6 ± 0,1  | 2,4 ± 0,2  | 3,5 ± 0,1*                      |
| 4                                                                    | 2,3 ± 0,1       | 2,6 ± 0,1      | 2,2 ± 0,1  | 2,3 ± 0,1  | 3,3 ± 0,1*                      |
| 5                                                                    | 2,8 ± 0,1       | 3,0 ± 0,1      | 2,8 ± 0,1  | 2,6 ± 0,1  | 3,7 ± 0,2*                      |
| 6                                                                    | 2,8 ± 0,1       | 3,1 ± 0,1      | 2,9 ± 0,1  | 2,4 ± 0,2  | 3,7 ± 0,2*                      |
| 7                                                                    | 2,7 ± 0,1       | 2,9 ± 0,1      | 2,6 ± 0,1  | 2,4 ± 0,1  | 3,8 ± 0,2*                      |
| 8                                                                    | 2,7 ± 0,1       | 2,9 ± 0,1      | 2,6 ± 0,1  | 2,1 ± 0,1* | 3,5 ± 0,2*                      |
| 9                                                                    | 3,0 ± 0,1       | 3,3 ± 0,1      | 2,8 ± 0,1  | 2,5 ± 0,2* | 4,3 ± 0,2*                      |
| 10                                                                   | 2,6 ± 0,1       | 3,0 ± 0,1      | 2,6 ± 0,1  | 2,2 ± 0,1  | 3,6 ± 0,1*                      |
| 11                                                                   | 2,9 ± 0,1       | 3,1 ± 0,1      | 2,7 ± 0,2  | 2,6 ± 0,2  | 3,4 ± 0,1*                      |
| 12                                                                   | 2,7 ± 0,1       | 3,1 ± 0,1      | 3,0 ± 0,1  | 3,0 ± 0,2  | 3,6 ± 0,2*                      |
| 13                                                                   | 2,6 ± 0,1       | 2,8 ± 0,1      | 2,8 ± 0,1  | 2,2 ± 0,2  | 3,2 ± 0,1*                      |
| Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.                |                 |                |            |            |                                 |
| * p < 0,05, по сравнению со значением в группе, получавшей носитель. |                 |                |            |            |                                 |

[00251] По данным теста OGTT, проведенного на 14-й день исследования, FP1 существенно снижал уровни глюкозы по сравнению с животными, получавшими носитель, во все моменты времени после времени 0 и при всех трех дозах в испытании (таблица 10). Этот показатель дополнительно количественно определяли как полную площадь под

кривой (AUC) и дельта AUC, которые были значительно меньше по сравнению с животными, получавшими носитель, при всех трех дозах в испытании (таблица 10 и Фиг. 5А и 5В).

[00252] Таблица 10. Уровни глюкозы в крови (мг/дл), по данным теста OGTT, проведенного через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

| Обработка                                                            | Доза<br>(нмоль/<br>кг) | Время после стимуляции<br>глюкозой (мин) |                  |                  |                  |                  | Общая AUC<br>(мг/дл/120<br>мин) | Дельта AUC<br>(мг/дл/120 мин) |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|
|                                                                      |                        | 0                                        | 30               | 60               | 90               | 120              |                                 |                               |
| Носитель                                                             | Н/П                    | 209,6<br>± 16,5                          | 399,4<br>± 46,4  | 338,5<br>± 46,3  | 297,5<br>± 38,0  | 269,3<br>± 36,6  | 38244,4 ±<br>4308,2             | 13089,4 ± 3573,0              |
| FP1                                                                  | 0,1                    | 196,6<br>± 7,6                           | 319,0<br>± 21,5* | 241,6<br>± 14,4* | 196,0<br>± 12,8* | 184,0<br>± 6,3*  | 28408,1 ±<br>1236,1*            | 4885,5 ± 955,1*               |
|                                                                      | 1                      | 164,0<br>± 7,2                           | 251,4<br>± 13,0* | 227,6<br>± 12,6* | 191,9<br>± 9,4*  | 180,6<br>± 13,1* | 25295,6 ±<br>1026,7*            | 5615,6 ± 647,6*               |
|                                                                      | 10                     | 146,6<br>± 5,9                           | 195,6<br>± 14,5* | 197,1<br>± 6,9*  | 172,1<br>± 6,3*  | 174,9<br>± 13,8* | 21768,8 ±<br>603,0*             | 4211,4 ± 425,8*               |
| Росиглитазон                                                         | 10 мг/кг в<br>день     | 130,8<br>± 6,0                           | 199,1<br>± 12,9* | 204,4<br>± 8,5*  | 184,1<br>± 10,9* | 169,1<br>± 5,7*  | 22115,6 ±<br>671,9*             | 6425,6 ± 599,6                |
| Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.                |                        |                                          |                  |                  |                  |                  |                                 |                               |
| * p < 0,05, по сравнению со значением в группе, получавшей носитель. |                        |                                          |                  |                  |                  |                  |                                 |                               |

[00253] Уровни глюкозы после еды измеряли в начале (0-й день), на 7-й день и на 13-й дни исследования (таблица 11 и Фиг. 6). FP1 вызывал снижение уровня глюкозы в крови статистически значимым образом при дозах 1 нмоль/кг и 10 нмоль/кг на 13-й день исследования.

[00254] Таблица 11. Уровни глюкозы в крови после еды во время обработки FP1 мышей DIO по схеме q3d

| Обработка    | Доза<br>(нмоль/кг) | Время после начала введения (дней) |                  |                  |
|--------------|--------------------|------------------------------------|------------------|------------------|
|              |                    | 0                                  | 7                | 13               |
| Носитель     | Н/П                | 177,6 ±<br>10,9                    | 173,<br>6 ± 10,6 | 225,3 ±<br>23,0  |
| FP1          | 0,1                | 174,1 ±<br>8,5                     | 171,<br>8 ± 16,3 | 196,4 ±<br>8,1   |
|              | 1                  | 167,5 ±<br>7,8                     | 135,<br>1 ± 11,2 | 165,3 ±<br>10,3* |
|              | 10                 | 165,3 ±<br>13,7                    | 145,<br>3 ± 4,9  | 153,8 ±<br>7,5*  |
| Росиглитазон | 10 мг/кг<br>в день | 189,6 ±<br>17,3                    | 122,<br>6 ± 8,1* | 154,8 ±<br>6,5*  |

Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.

\* p < 0,05, по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

[00255] Уровни инсулина в плазме, измеренные в тесте OGTT, были значительно

выше в группе, получавшей FP1, чем в соответствующей группе, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг через 30 минут, и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг в тот же момент времени (таблица 12). Амплитуда уровня инсулина в тесте OGTT, измеряемая по общей AUC, была выше, чем у группы, получавшей носитель, для дозы 0,1 нмоль/кг FP1 (таблица 12), и ниже при дозах 1 и 10 нмоль/кг. В обоих случаях статистическая значимость была достигнута только при самой низкой дозе. В момент времени 90 минут у мышей, получавших 1 и 10 нмоль/кг FP1, уровни инсулина были ниже; однако этот эффект не достиг статистической значимости. НОМА-IR, используемый как показатель чувствительности к инсулину, определяли на 14-й день исследования. В этот момент времени введение FP1 приводило к снижению НОМА-IR или к улучшению чувствительности к инсулину при дозе 10 нмоль/кг (таблица 13 и Фиг. 7).

[00256] Таблица 12. Уровни инсулина в плазме (пг/мл), измеренные в тесте OGTT, проведенном через четырнадцать дней, в которые мышам DIO вводили FP1 по схеме q3d

| Обработка    | Доза<br>(нмоль/кг) | Время после стимуляции глюкозой<br>(мин) |                   |                | Общая AUC<br>(пг/мл/90 мин) |
|--------------|--------------------|------------------------------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|
|              |                    | 0                                        | 30                | 90             |                             |
| Носитель     | Н/П                | 6096,0 ± 774,3                           | 14660,0 ± 3031,2  | 5034,4 ± 405,1 | 902151,9 ± 143123,2         |
| FP1          | 0,1                | 7861,0 ± 779,5                           | 33825,8 ± 7902,0* | 6494,4 ± 797,0 | 1834808,8 ± 381276,1*       |
|              | 1                  | 4808,1 ± 795,8                           | 13061,8 ± 2226,3  | 3443,5 ± 342,5 | 763218,1 ± 119766,8         |
|              | 10                 | 3478,3 ± 634,6                           | 7147,0 ± 823,8    | 2958,0 ± 414,0 | 462528,8 ± 44653,1          |
| Росиглитазон | 10 мг/кг в день    | 2965,6 ± 524,2                           | 2203,1 ± 193,5*   | 1180,0 ± 57,1  | 179025,0 ± 9970,7           |

Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.

\* p < 0,05, по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

[00257] Таблица 13. Показатель НОМА-IR натощак у мышей DIO через четырнадцать дней обработки обрабатывали FP1 по схеме q3d

| Обработка    | Доза (нмоль/кг) | НОМА-IR      |
|--------------|-----------------|--------------|
| Носитель     | Н/П             | 93,5 ± 15,3  |
| FP1          | 0,1             | 112,4 ± 14,6 |
|              | 1               | 56,7 ± 9,7   |
|              | 10              | 37,7 ± 8,2*  |
| Росиглитазон | 10 мг/кг в день | 27,3 ± 4,7*  |

Данные представлены как среднее ± SEM.

n=по 8 на группу.

\*  $p < 0,05$ , по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

**[00258]** Величина снижения веса, достигнутая к 13-у дню, не приводила к измеримым изменениям абсолютной массы жировой ткани или относительной (%) массы жировой ткани при любой дозе (таблица 14). При дозе 10 нмоль/кг наблюдали значимое уменьшение абсолютной массы нежировой ткани. Этого уменьшения не наблюдали при выражении в виде относительной (%) массы нежировой ткани. Массу печени мышей измеряли при посмертной аутопсии на 15-й день исследования (таблица 15). Введение FP1 приводило к уменьшению абсолютной массы печени и массы печени, выраженной в процентах от массы тела, при дозе 10 нмоль/кг. Уменьшение наблюдали при дозе 1 нмоль/кг, но оно не достигало статистической значимости ни по одному из параметров. Содержание жира в печени измеряли по биопсийному материалу с помощью ЯМР (таблица 16). Гибридный белок FP1 уменьшал содержание печеночного жира, измеряемого в процентах от массы биопсийного материала, при дозах 1 и 10 нмоль/кг. Снижение было значимым при более высокой дозе.

Таблица 14. Состав тела через тринадцать дней обработки FP1 мышей DIO по схеме q3d

| Обработка    | Доза (нмоль/кг) | Масса жировой ткани (г) | Масса нежировой ткани (г) | Масса жировой ткани (% массы тела) | Масса нежировой ткани (% массы тела) |
|--------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Носитель     | Н/П             | 11,6 ± 0,5              | 29,6 ± 0,4                | 23,4 ± 0,8                         | 59,6 ± 0,9                           |
| FP1          | 0,1             | 12,2 ± 0,4              | 29,7 ± 0,4                | 24,1 ± 0,6                         | 58,5 ± 0,6                           |
|              | 1               | 12,1 ± 0,3              | 28,0 ± 0,4                | 25,1 ± 0,3                         | 58,3 ± 0,6                           |
|              | 10              | 10,6 ± 0,3              | 27,7 ± 0,4*               | 23,1 ± 0,3                         | 60,6 ± 0,6                           |
| Росиглитазон | 10 мг/кг в день | 14,9 ± 0,6*             | 30,0 ± 0,5                | 27,2 ± 0,4*                        | 55,0 ± 0,6*                          |

Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.

\*  $p < 0,05$ , по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

**[00259]** Таблица 15. Масса печени через пятнадцать дней обработки FP1 мышей DIO по схеме q3d

| Обработка | Доза (нмоль/кг) | Масса печени (г) | Масса печени (% массы тела) |
|-----------|-----------------|------------------|-----------------------------|
| Носитель  | Н/П             | 2,6 ± 0,1        | 5,4 ± 0,2                   |
| FP1       | 0,1             | 2,9 ± 0,2        | 5,8 ± 0,2                   |
|           | 1               | 2,2 ± 0,1        | 4,6 ± 0,2                   |
|           | 10              | 1,9 ± 0,1*       | 4,2 ± 0,1*                  |

|                     |                 |               |               |
|---------------------|-----------------|---------------|---------------|
| <b>Росиглитазон</b> | 10 мг/кг в день | $2,5 \pm 0,2$ | $4,6 \pm 0,2$ |
|---------------------|-----------------|---------------|---------------|

Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM; n=8 на группу.

\*  $p < 0,05$ , по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

**[00260]** Таблица 16. Содержание жира в печени, измеренное через пятнадцать дней обработки FP1 мышей DIO по схеме q3d

| Обработка           | Доза (нмоль/кг) | Жир (%)          |
|---------------------|-----------------|------------------|
| <b>Носитель</b>     | Н/П             | $27,3 \pm 2,1$   |
| <b>FP1</b>          | 0,1             | $26,0 \pm 1,4$   |
|                     | 1               | $22,5 \pm 1,4$   |
|                     | 10              | $17,8 \pm 1,6^*$ |
| <b>Росиглитазон</b> | 10 мг/кг в день | $25,9 \pm 0,8$   |

Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM; n=8 на группу.

\*  $p < 0,05$ , по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

Пример 11. Влияние FP1 на уровни глюкозы в крови и массу тела у мышей *ob/ob*

**[00261]** Цель этого эксперимента состояла в оценке влияния FP1 на массу тела и уровни глюкозы в крови через восемь дней обработки мышей *ob/ob* с ожирением, гипергликемией и дефицитом лептина.

**[00262]** Самцов мышей *ob/ob* взвешивали и подкожно вводили им FP1 в дозе 2 мл/кг раз в три дня (q3d) на 0-й, 3-й и 6-й день. Массу тела мышей и массу пищи регистрировали ежедневно. Уровни глюкозы измеряли ежедневно с помощью глюкометра. В конце исследования мышей умерщвляли и отбирали пробу терминальной крови.

**[00263]** FP1 в дозе 1 нмоль/кг значительно уменьшал массу тела (выраженную в процентах от начальной массы тела) у мышей *ob/ob*, начиная со 2-го дня и по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель. FP1 в дозе 10 нмоль/кг уменьшал массу тела (выраженную в процентах от начальной массы тела) у мышей *ob/ob*, начиная с 1-го дня и по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель (таблица 17 и Фиг. 8).

**[00264]** Таблица 17. Изменение массы тела (% начальной) во время обработки FP1 мышей *ob/ob* по схеме q3d

| Обработка | Носитель       | FP1            |                  |
|-----------|----------------|----------------|------------------|
| День      | н/п            | 1 нмоль/кг     | 10 нмоль/кг      |
| <b>-6</b> | $-2,5 \pm 0,3$ | $-2,8 \pm 0,4$ | $-3,6 \pm 0,5$   |
| <b>-5</b> | $-2,4 \pm 0,3$ | $-3,0 \pm 0,5$ | $-3,5 \pm 0,5$   |
| <b>-4</b> | $-1,9 \pm 0,2$ | $-2,5 \pm 0,4$ | $-2,8 \pm 0,3$   |
| <b>-1</b> | $-0,3 \pm 0,3$ | $0,1 \pm 0,2$  | $-0,3 \pm 0,2$   |
| <b>0</b>  | $0,0 \pm 0,0$  | $0,0 \pm 0,0$  | $0,0 \pm 0,0$    |
| <b>1</b>  | $0,5 \pm 0,2$  | $-1,6 \pm 0,2$ | $-2,3 \pm 0,5^*$ |

|          |           |             |             |
|----------|-----------|-------------|-------------|
| <b>2</b> | 1,1 ± 0,2 | -1,8 ± 0,4* | -2,0 ± 0,9* |
| <b>3</b> | 1,3 ± 0,3 | -2,5 ± 0,4* | -3,1 ± 1,1* |
| <b>4</b> | 1,8 ± 0,3 | -3,3 ± 0,5* | -4,2 ± 1,3* |
| <b>5</b> | 1,8 ± 0,4 | -3,5 ± 0,5* | -4,7 ± 1,5* |
| <b>6</b> | 2,0 ± 0,5 | -4,0 ± 0,7* | -5,7 ± 1,6* |
| <b>7</b> | 2,8 ± 0,6 | -4,8 ± 0,8* | -6,3 ± 1,7* |
| <b>8</b> | 3,5 ± 0,8 | -4,5 ± 1,0* | -6,1 ± 1,9* |

Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.

\*  $p < 0,05$ , по сравнению со значением в группе, получавшей носитель.

**[00265]** FP1 в дозе 10 нмоль/кг снижал уровни глюкозы после еды у мышей *ob/ob* в 1-й и 2-й дни исследования, а также с 4-го дня по 8-й день, по сравнению с мышами, получавшими носитель. Снижение уровня глюкозы в крови наблюдали при дозе 1 нмоль/кг; однако этот эффект не достиг статистической значимости (таблица 18 и Фиг. 9).

**[00266]** Таблица 18. Уровни глюкозы после еды у мышей *ob/ob* во время введения FP1 по схеме q3d

| <b>Обработка</b><br><b>День</b> | <b>Носитель</b><br><b>н/п</b> | <b>FP1</b>   |               |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|
|                                 |                               | 1 нмоль/кг   | 10 нмоль/кг   |
| <b>-6</b>                       | 463,6 ± 31,2                  | 395,7 ± 52,0 | 463,6 ± 41,0  |
| <b>-5</b>                       | 554,9 ± 57,5                  | 609,6 ± 53,6 | 552,9 ± 53,0  |
| <b>-4</b>                       | 502,9 ± 41,6                  | 517,9 ± 71,6 | 490,3 ± 54,4  |
| <b>-1</b>                       | 552,1 ± 45,1                  | 567,2 ± 51,2 | 586,0 ± 42,6  |
| <b>0</b>                        | 468,8 ± 57,3                  | 479,7 ± 61,8 | 437,0 ± 42,7  |
| <b>1</b>                        | 537,0 ± 42,8                  | 439,0 ± 80,4 | 336,2 ± 51,0* |
| <b>2</b>                        | 511,7 ± 43,5                  | 440,0 ± 74,3 | 293,7 ± 37,6* |
| <b>3</b>                        | 447,8 ± 54,2                  | 369,6 ± 75,9 | 279,4 ± 38,8  |
| <b>4</b>                        | 516,3 ± 47,0                  | 384,6 ± 84,0 | 261,2 ± 43,7* |
| <b>5</b>                        | 531,0 ± 47,1                  | 410,9 ± 92,2 | 286,9 ± 55,8* |
| <b>6</b>                        | 596,1 ± 45,1                  | 451,1 ± 82,6 | 301,9 ± 49,3* |
| <b>7</b>                        | 566,7 ± 44,3                  | 425,3 ± 86,9 | 246,7 ± 43,5* |
| <b>8</b>                        | 509,9 ± 37,6                  | 337,8 ± 75,1 | 223,4 ± 34,1* |

Данные представлены как среднее ± SEM; n=8 на группу.

Пример 12. Фармакокинетика у различных видов животных

**[00267]** Фармакокинетика у мышей

**[00268]** FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам мышей линии C57BL/6 в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими способами отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства.

Концентрацию FP1 определяли способом иммуноанализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени представлена в таблицах 19 и 20 и показана на Фиг. 10.

**[00269]** Таблица 19. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам мышей линии C57BL/6

| Момент времени | FP1, доза, подкожно           |                               |                               |                               |                               |                        | Станд. откл. |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------|
|                | Результат животного о 56 (нМ) | Результат животного о 57 (нМ) | Результат животного о 58 (нМ) | Результат животного о 60 (нМ) | Результат животного о 63 (нМ) | Средний результат (нМ) |              |
| 4 ч            | 32,299                        | 50,735                        | 42,766                        | 32,407                        | 23,018                        | 36,245                 | 10,698       |
| 24 ч           | 88,822                        | 106,418                       | 88,648                        | 103,841                       | 80,346                        | 93,615                 | 11,093       |
| 72 ч           | 33,563                        | 38,473                        | 32,473                        | 33,625                        | 32,769                        | 34,181                 | 2,451        |
| 96 ч           | 20,639                        | 24,988                        | 21,247                        | 19,356                        | 20,771                        | 21,400                 | 2,124        |
| 7-й день       | 5,399                         | 6,919                         | 7,234                         | 5,994                         | 5,637                         | 6,237                  | 0,803        |

**[00270]** Таблица 20. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам мышей линии C57BL/6

| Момент времени | FP1, доза, внутривенно        |                               |                               |                               |                               |                        | Станд. откл. |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------|
|                | Результат животного о 52 (нМ) | Результат животного о 53 (нМ) | Результат животного о 65 (нМ) | Результат животного о 66 (нМ) | Результат животного о 70 (нМ) | Средний результат (нМ) |              |
| 1 ч            | 240,419                       | 233,318                       | 232,484                       | 276,913                       | 272,727                       | 251,172                | 21,857       |
| 24 ч           | 86,823                        | 95,774                        | 80,201                        | 93,153                        | 88,853                        | 88,961                 | 6,027        |
| 72 ч           | 33,634                        | 37,447                        | 33,108                        | 41,680                        | 34,034                        | 35,981                 | 3,612        |
| 96 ч           | 22,666                        | 20,588                        | 19,458                        | 33,718                        | 20,361                        | 23,358                 | 5,909        |
| 7-й день       | 7,401                         | 5,606                         | 4,896                         | 8,556                         | 4,205                         | 6,133                  | 1,803        |

**[00271]** Фармакокинетический анализ показал, что конечный период полужизни FP1 у мышей линии C57BL/6 после подкожного и внутривенного введения составлял 1,67 и 1,57 дня соответственно (таблица 21). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~71%.

**[00272]** Таблица 21. Среднее ( $\pm$  CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам мышей линии C57BL/6

| Способ |         | $t_{1/2}$ (дни) | CL или CL/F (мл/день/кг) | Vss (мл/кг) | $C_{max}$ (нг/мл) | $T_{max}^*$ (дни) | AUC <sub>0-last</sub> (день*нг/мл) | AUC <sub>0-inf</sub> (день*нг/мл) |
|--------|---------|-----------------|--------------------------|-------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| П/к    | Среднее | 1,67            | 49,48                    |             | 14994             | 1                 | 38315                              | 40734                             |
|        | (CO)    | (0,14)          | (4,791)                  |             | (1776)            |                   | (3851)                             | (4072)                            |
| В/в    | Среднее | 1,57            | 35,00                    | 69,03       | 40231             | 0,04              | 55263                              | 57531                             |
|        | (CO)    | (0,19)          | (3,13)                   | (5,8)       | (3500)            |                   | (4853)                             | (5416)                            |

Примечание. \*  $T_{max}$  (медиана)

**[00273]** Фармакокинетика у крыс

**[00274]** FP1 внутривенно и подкожно вводили самкам крыс линии Спрег-Дули в дозе 2 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 7 дней после введения обоими способами отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства.



Концентрацию FP1 определяли способом иммуноанализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени представлена в таблицах 22 и 23 и показана на Фиг. 11.

[00275] Таблица 22. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно самкам крыс линии Спрег-Доули

| Момент времени | FP1, группа 3 (доза, подкожно) |                             |                             |                             |                             |                        | Станд. откл. |
|----------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------|
|                | Результат животного 53 (нМ)    | Результат животного 55 (нМ) | Результат животного 67 (нМ) | Результат животного 68 (нМ) | Результат животного 69 (нМ) | Средний результат (нМ) |              |
| 4 ч            | 4,766                          | 3,500                       | 3,932                       | 3,546                       | 3,250                       | 3,799                  | 0,593        |
| 24 ч           | 45,118                         | 53,192                      | 39,196                      | 39,823                      | 40,804                      | 43,627                 | 5,826        |
| 72 ч           | 18,900                         | 24,102                      | 23,124                      | 23,718                      | 18,933                      | 21,755                 | 2,615        |
| 96 ч           | 12,193                         | 14,333                      | 14,185                      | 14,669                      | 11,256                      | 13,327                 | 1,511        |
| 7-й день       | 2,805                          | 2,821                       | 2,447                       | 3,438                       | 2,358                       | 2,774                  | 0,426        |

[00276] Таблица 23. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно самкам крыс линии Спрег-Доули

| Момент времени | FP1, группа 4 (доза, внутривенно) |                             |                             |                             |                             |                        | Станд. откл. |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------|
|                | Результат животного 51 (нМ)       | Результат животного 52 (нМ) | Результат животного 57 (нМ) | Результат животного 64 (нМ) | Результат животного 66 (нМ) | Средний результат (нМ) |              |
| 1 ч            | 43,620*                           | 382,676                     | 403,255                     | 443,080                     | 510,105                     | 356,547                | 181,560      |
| 24 ч           | 102,665*                          | 142,661                     | 139,066                     | 124,528                     | 126,425                     | 127,069                | 15,728       |
| 72 ч           | 46,720                            | 60,105                      | 67,090                      | 59,257                      | 70,423                      | 60,719                 | 9,127        |
| 96 ч           | 29,409                            | 39,897                      | 41,225                      | 42,258                      | 48,074                      | 40,173                 | 6,779        |
| 7-й день       | 6,976                             | 11,251                      | 8,913                       | 9,540                       | 13,006                      | 9,937                  | 2,298        |

\* Повторный анализ подтвердил результаты

[00277] Фармакокинетический анализ показал, что конечный период полужизни FP1 у крыс линии Спрег-Доули после подкожного и внутривенного введения составлял 1,34 и 1,51 дня соответственно (таблица 24). Средняя биодоступность FP1 после подкожного введения составила ~23%.

[00278] Таблица 24. Среднее ( $\pm$  CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 2 мг/кг самкам крыс линии Спрег-Доули

| Способ |         | $t_{1/2}$ (дни) | CL или CL/F (мл/день/кг) | Vss (мл/кг) | C <sub>max</sub> (нг/мл) | T <sub>max</sub> * (дни) | AUC <sub>0-last</sub> (день*нг/мл) | AUC <sub>0-inf</sub> (день*нг/мл) |
|--------|---------|-----------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| П/к    | Среднее | 1,34            | 100,09                   |             | 6987                     | 1                        | 19250                              | 20112                             |
|        | (CO)    | (0,04)          | (3,97)                   |             | (417)                    |                          | (794)                              | (820)                             |
| В/в    | Среднее | 1,51            | 24,75                    | 53,41       | 59000                    | 0,04                     | 83028                              | 86525                             |
|        | (CO)    | (0,12)          | (8,53)                   | (17,15)     | (25031)                  |                          | (20126)                            | (20881)                           |

Примечание. \* T<sub>max</sub> (медиан.)

[00279] Фармакокинетика у обезьян

[00280] FP1 внутривенно и подкожно вводили новым самцам яванского макака

(*Macaca fascicularis*) в дозе 1 мг/кг в PBS с pH 7. В течение 21 дня после введения обоими путями отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства иммунологическим методом анализа. Зависимость концентрации лекарственного средства в сыворотке от времени представлена в таблицах 25 и 26 и показана на Фиг. 12.

**[00281]** Таблица 25. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения подкожно яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноанализа

| Момент времени       | FP1 (доза, подкожно) |                   |                   |                        |              |
|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|------------------------|--------------|
|                      | Животное 110 (нМ)    | Животное 111 (нМ) | Животное 112 (нМ) | Средний результат (нМ) | Станд. откл. |
| Предварительная доза | < LLOQ               | < LLOQ            | < LLOQ            | < LLOQ                 | Н/П          |
| 6 ч                  | 49,304               | 43,784            | 72,110            | 55,066                 | 15,017       |
| 24 ч                 | 93,368               | 71,958            | 96,863            | 87,396                 | 13,483       |
| 48 ч                 | 107,689              | 97,509            | 115,144           | 106,781                | 8,853        |
| 72 ч                 | 113,601              | 104,190           | 104,449           | 107,414                | 5,360        |
| 120 ч                | 101,490              | 95,049            | 91,717            | 96,085                 | 4,968        |
| 168 ч                | 82,167               | 75,435            | 81,569            | 79,724                 | 3,726        |
| 240 ч                | 71,033               | 56,732            | 59,266            | 62,344                 | 7,631        |
| 336 ч                | 44,380               | 42,758            | 42,571            | 43,236                 | 0,995        |
| 432 ч                | 30,911               | 29,445            | 32,839            | 31,065                 | 1,702        |
| 528 ч                | 21,277               | 20,404            | 26,427            | 22,703                 | 3,255        |

**[00282]** Таблица 26. Зависимость концентрации FP1 в сыворотке (нМ) от времени после однократного введения внутривенно яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноанализа

| Момент времени       | FP1 (доза, внутривенно) |                   |                   |                        |              |
|----------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|--------------|
|                      | Животное 104 (нМ)       | Животное 105 (нМ) | Животное 106 (нМ) | Средний результат (нМ) | Станд. откл. |
| Предварительная доза | < LLOQ                  | < LLOQ            | < LLOQ            | < LLOQ                 | Н/П          |
| 1 ч                  | 212,661                 | 235,168           | 189,000           | 212,276                | 23,087       |
| 6 ч                  | 190,315                 | 185,331           | 183,575           | 186,407                | 3,497        |
| 24 ч                 | 141,743                 | 155,943           | 146,487           | 148,058                | 7,229        |
| 48 ч                 | 111,765                 | 126,105           | 120,744           | 119,538                | 7,246        |
| 72 ч                 | 105,076                 | 106,955           | 106,441           | 106,157                | 0,971        |
| 120 ч                | 92,591                  | 103,882           | 103,757           | 100,077                | 6,483        |
| 168 ч                | 71,368                  | 93,055            | 87,706            | 84,043                 | 11,298       |
| 240 ч                | 71,554                  | 65,093            | 65,685            | 67,444                 | 3,572        |
| 336 ч                | 46,184                  | 38,961            | 41,696            | 42,280                 | 3,647        |
| 432 ч                | 34,589                  | 31,266            | 19,492            | 28,449                 | 7,933        |
| 528 ч                | 26,885                  | 24,154            | 22,422            | 24,487                 | 2,250        |

**[00283]** Фармакокинетический анализ показал, что конечный период полужизни FP1 у яванских макак после подкожного и внутривенного введения составил 8,5 и 9,2 дня соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~88%

(таблица 27).

**[00284]** Таблица 27. Среднее ( $\pm$  CO) значение фармакокинетических параметров FP1 после внутривенного и подкожного введения в дозе 1 мг/кг яванским макакам

| Способ     |                | $t_{1/2}$<br>(дни) | CL или CL/F<br>(мл/день/кг) | Vss<br>(мл/кг) | $C_{max}$<br>(нг/мл) | $T_{max}^*$<br>(дни) | AUC <sub>0-last</sub><br>(день*нг/<br>мл) | AUC <sub>0-inf</sub><br>(день*нг/<br>мл) |
|------------|----------------|--------------------|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>П/к</b> | <b>Среднее</b> | <b>8,5</b>         | <b>3,9</b>                  |                | <b>17776</b>         | <b>3</b>             | <b>211030</b>                             | <b>256202</b>                            |
|            | (CO)           | (1,5)              | (0,3)                       |                | (950)                |                      | (11332)                                   | (20192)                                  |
| <b>В/в</b> | <b>Среднее</b> | <b>9,2</b>         | <b>3,4</b>                  | <b>45,6</b>    | <b>34001</b>         | <b>0,04</b>          | <b>239758</b>                             | <b>292206</b>                            |
|            | (CO)           | (0,5)              | (0,1)                       | (1,6)          | (3698)               |                      | (6095)                                    | (11516)                                  |

Примечание. \*  $T_{max}$  (медиан.)

**[00285]** Количественное определение концентрации интактного димера в сыворотке яванских макак после внутривенного и подкожного введения проводили методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС (таблицы 28 и 29 и Фиг. 13 и 14). Концентрации, определяемые данным способом, были аналогичны концентрациям, определяемым методом иммуноанализа (IA), что демонстрирует, что в организме яванских макак FP1 циркулирует в виде интактного димера без обнаружимой подверженности метаболическим изменениям.

**[00286]** Таблица 28. Зависимость концентрации FP1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

| День  | Интактный димер по данным масс-спектрометрии (объединенные пробы) | Данные иммуноанализа (средн.) |
|-------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 0,00  | 0                                                                 | 0                             |
| 0,04  | 33347                                                             | 34537                         |
| 0,25  | 29686                                                             | 30328                         |
| 1,00  | 28787                                                             | 24089                         |
| 2,00  | 17249                                                             | 19449                         |
| 3,00  | 16827                                                             | 17272                         |
| 5,00  | 16159                                                             | 16282                         |
| 7,00  | 11124                                                             | 13674                         |
| 10,00 | 8746                                                              | 10973                         |
| 14,00 | 5328                                                              | 6879                          |
| 18,00 | 3857                                                              | 4629                          |
| 22,00 | 2252                                                              | 3984                          |

**[00287]** Таблица 29. Зависимость концентрации FP1 в виде интактного димера в сыворотке (нг/мл) от времени после однократного подкожного введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

| День | Интактный димер по данным масс-спектрометрии (объединенные пробы) | Данные иммуноанализа (средн.) |
|------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 0,00 | 0                                                                 | 0                             |
| 0,25 | 9625                                                              | 8959                          |
| 1,00 | 15799                                                             | 14219                         |

|       |       |       |
|-------|-------|-------|
| 2,00  | 17671 | 17373 |
| 3,00  | 19130 | 17476 |
| 5,00  | 12284 | 15633 |
| 7,00  | 10808 | 12971 |
| 10,00 | 8910  | 10143 |
| 14,00 | 5814  | 7034  |
| 18,00 | 4074  | 5054  |
| 22,00 | 2967  | 3694  |

**[00288]** Концентрацию анализов в сыворотке яванских макаков после внутривенного и подкожного введения также измеряли методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС) (таблицы 30 и 31). Выбранные триптические пептиды, а именно ALV (ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVK), ASL (ASLEDLGWADWVLSR) и TDT (TDTGVSLQTYDDLLAK), расположены в FP1 вблизи N-конца области HSA, N-конца GDF15 и C-конца GDF15 соответственно. Пептиды отслеживали как суррогатные пептиды FP1. Концентрации всех суррогатных пептидов были аналогичны друг другу и концентрациям, измеренным методом иммуноанализа, и это демонстрирует, что последовательность GDF15 в FP1 остается интактной и связана с полной последовательностью HSA *in vivo*.

**[00289]** Таблица 30. Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного внутривенного введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином /жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

| Момент времени |      | FP1 средн. (нг/мл) |         |         | Станд. откл. |        |        | Данные иммуноанализа (нг/мл) |
|----------------|------|--------------------|---------|---------|--------------|--------|--------|------------------------------|
| День           | Часы | ALV                | TDT     | ASL     | ALV          | TDT    | ASL    |                              |
| 0,00           | 0    | <LLOQ              | <LLOQ   | <LLOQ   | Н/П          | Н/П    | Н/П    | 0,0                          |
| 0,04           | 1    | 32400,0            | 39766,7 | 33333,3 | 2623,0       | 3162,8 | 2722,7 | 34536,9                      |
| 0,25           | 6    | 29100,0            | 27166,7 | 30600,0 | 3439,5       | 1006,6 | 2095,2 | 30328,1                      |
| 1,00           | 24   | 24366,7            | 23300,0 | 23800,0 | 4215,8       | 3996,2 | 4100,0 | 24088,7                      |
| 2,00           | 48   | 19433,3            | 17733,3 | 18700,0 | 1457,2       | 1193,0 | 854,4  | 19448,6                      |
| 3,00           | 72   | 18100,0            | 17200,0 | 17166,7 | 360,6        | 871,8  | 1001,7 | 17271,6                      |
| 5,00           | 120  | 15966,7            | 14033,3 | 14233,3 | 1001,7       | 642,9  | 1011,6 | 16282,3                      |
| 7,00           | 168  | 13733,3            | 11800,0 | 12100,0 | 1115,0       | 600,0  | 300,0  | 13673,6                      |
| 10,00          | 240  | 9303,3             | 8570,0  | 8570,0  | 2290,1       | 1682,2 | 1685,9 | 10973,0                      |
| 14,00          | 336  | 5860,0             | 5890,0  | 6056,7  | 415,8        | 312,2  | 388,0  | 6878,9                       |
| 18,00          | 432  | 4143,3             | 4400,0  | 4226,7  | 374,3        | 52,9   | 571,2  | 4628,6                       |
| 22,00          | 528  | 2830,0             | 3256,7  | 2753,3  | 355,4        | 420,0  | 319,0  | 3984,0                       |

**[00290]** Таблица 31. Зависимость концентрации в сыворотке (нг/мл) суррогатных

пептидов, представляющих различные области FP1, от времени после однократного подкожного введения яванским макакам, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/расщепления трипсином/жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХМС/МС)

| Момент времени |      | FP1 средн. (нг/мл) |         |         | Станд. откл. |        |        | Данные иммуноанализа (нг/мл) |
|----------------|------|--------------------|---------|---------|--------------|--------|--------|------------------------------|
| День           | Часы | ALV                | TDT     | ASL     | ALV          | TDT    | ASL    |                              |
| 0,00           | 0    | <LLOQ              | <LLOQ   | <LLOQ   | Н/П          | Н/П    | Н/П    | 0,0                          |
| 0,25           | 6    | 9323,3             | 7430,0  | 8123,3  | 1900,3       | 2471,6 | 1954,1 | 8959,1                       |
| 1,00           | 24   | 15233,3            | 13390,0 | 14533,3 | 2926,3       | 3222,0 | 2683,9 | 14219,2                      |
| 2,00           | 48   | 15366,7            | 14000,0 | 14166,7 | 2579,4       | 1646,2 | 2311,6 | 17373,0                      |
| 3,00           | 72   | 17300,0            | 16033,3 | 15333,3 | 1571,6       | 1001,7 | 986,6  | 17476,0                      |
| 5,00           | 120  | 15333,3            | 13366,7 | 13666,7 | 1222,0       | 1692,1 | 1501,1 | 15632,9                      |
| 7,00           | 168  | 13333,3            | 11633,3 | 11700,0 | 709,5        | 472,6  | 781,0  | 12970,9                      |
| 10,00          | 240  | 8496,7             | 7376,7  | 8343,3  | 1475,5       | 189,0  | 1039,1 | 10143,2                      |
| 14,00          | 336  | 6046,7             | 6116,7  | 6253,3  | 90,2         | 118,5  | 110,6  | 7034,5                       |
| 18,00          | 432  | 4593,3             | 5250,0  | 4636,7  | 802,6        | 1157,5 | 621,7  | 5054,2                       |
| 22,00          | 528  | 3056,7             | 3490,0  | 3116,7  | 424,5        | 687,7  | 220,5  | 3693,7                       |

[00291] Анализ стабильности в человеческой плазме

[00292] Целью данного исследования был анализ стабильности FP1 в человеческой плазме *ex vivo*. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) посредством центрифугирования. FP1 инкубировали в этой матрице при температуре 37 °C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 часов. Концентрацию FP1 определяли способом иммуноанализа. Среднее отличие в процентах от начальной концентрации (0 часов) варьировалось в диапазоне от -4,1 до -12,9 и не росло со временем, что демонстрирует стабильность FP1 в человеческой плазме в течение периода до 48 часов *ex vivo* (таблица 32 и Фиг. 15).

[00293] Таблица 32. Концентрация FP1 (мкг/мл) через 0, 4, 24 и 48 часов (ч) инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов (суб.), в соответствии с определением методом иммуноанализа

| Проба <i>ex vivo</i> | Конц. в плазме мужчины суб. 1 (мкг/мл) | % отличия T0 | Конц. в плазме женщины суб. 2 (мкг/мл) | % отличия T0 | Средняя конц. (мкг/мл) | % отличия T0 |
|----------------------|----------------------------------------|--------------|----------------------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| Плазма, T 0 ч FP1    | 11,503                                 | Н/П          | 12,649                                 | Н/П          | 12,076                 | Н/П          |
| Плазма, T 4 ч FP1    | 10,524                                 | -8,5         | 10,521                                 | -16,8        | 10,523                 | -12,9        |
| Плазма, T 24 ч FP1   | 9,934                                  | -13,6        | 12,402                                 | -2,0         | 11,168                 | -7,5         |
| Плазма, T 48 ч FP1   | 10,582                                 | -8,0         | 12,575                                 | -0,6         | 11,578                 | -4,1         |

[00294] Количественное определение концентрации интактного димера после инкубации в человеческой плазме проводили методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС.

Концентрации, определенные данным способом, оставались стабильными с течением времени (0, 4, 24 и 48 часов), и это демонстрирует, что FP1 сохраняется в человеческой плазме *ex vivo* в виде интактного димера в течение до 48 часов (таблица 33 и Фиг. 16).

**[00295]** Таблица 33. Средняя концентрация FP1 (мкг/мл) в виде интактного димера и отличие (%) от начальной концентрации через 0, 4, 24, 48 часов инкубации *ex vivo* в плазме, полученной от двух человеческих субъектов, в соответствии с определением методом иммуноаффинного захвата/ЖХМС

|             | Конц. димера (мкг/мл) | Отличие (%) |
|-------------|-----------------------|-------------|
| <b>0 ч</b>  | 15,8                  | 100,0       |
| <b>4 ч</b>  | 15,8                  | 100,1       |
| <b>24 ч</b> | 15,9                  | 100,9       |
| <b>48 ч</b> | 15,2                  | 96,0        |

**[00296]** Примеры 15-19 включают характеризацию примера гибридного белка изобретения, описанного в примере 5, который имеет аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 92 (кодируемую последовательностями нуклеотидов SEQ ID NO: 95 (оптимизация кодонов 1) и SEQ ID NO: 110 (оптимизация кодонов 2)). Этот гибридный белок представляет собой полностью рекомбинантный белок, который существует в виде гомодимера гибрида HSA (C34S) и варианта делеции зрелого человеческого GDF15 (201-308; SEQ ID NO: 8), соединенных содержащим 42 аминокислоты линкером, состоящим из глициновых и сериновых остатков, GS-(GGGGS)<sub>8</sub>. Единственный нативный свободный цистеин в положении 34 HSA был заменен на серин. Далее в примерах этот конкретный гибридный белок HSA-GDF15 для простоты будет называться «FP2».

**[00297]** SEQ ID NO: 92:  
 DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES  
 AENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPPLRLV  
 RPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADK  
 AACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS  
 KLVTDLTQVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAE  
 VENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLR  
 AKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQNALL  
 VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEK  
 TPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ  
 TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFEEGKKLVAAASQAAL  
 GLGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDHCPLGPGRCCRL  
 HTVRASLEDLWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPA  
 PCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLLQTYDDLAKDCHCI

Пример 13. Активность FP2 *in vitro* в качестве агониста

**[00298]** Активность FP2 *in vitro* в качестве агониста оценивали с помощью клеточного анализа pAKT с клетками SK-N-AS, стабильно сверхэкспрессирующими

человеческий рецептор GDF15 (GFRAL). Активность GFRAL определяли посредством измерения уровня фосфо-AKT (Ser473) в клетках человеческой нейробластомы SK-N-AS (ATCC), стабильно трансфицированных для сверхэкспрессии человеческого GFRAL. Фосфорилирование AKT после обработки GFRAL-экспрессирующих клеток различными концентрациями гибридных молекул измеряли с помощью аналитического набора Phospho-AKT (Ser473) (Cisbio, г. Бедфорд, штат Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные данные использовали для расчета значений  $EC_{50}$  с помощью статистического программного обеспечения Prism (GraphPad Software, г. Сан-Диего, США). FP2 активировали pAKT с полумаксимальной эффективной концентрацией ( $EC_{50}$ )  $2,908 \pm 0,239$  нМ (N=3). Нативный GDF15 выступал в качестве аналитического контроля и демонстрировал агонистическую активность с  $EC_{50}$   $0,153 \pm 0,008$  нМ (N=3).

**Пример 14. Влияние FP2 на потребление пищи мышами линии C57BL/6**

**[00299]** Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи у самцов мышей линии C57BL/6 после введения однократной дозы. В данном исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 (в возрасте 10-12 недель), полученных от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности, в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом свет/тьма (6:00/18:00), и предоставляли им неограниченный доступ к воде и корму. Самцы мышей линии C57BL/6 в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем мышей на основании потребления пищи за последние 24 часа разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции посредством подкожной инъекции. Изменение массы корма в каждой клетке непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6xHis-FP1.

**[00300]** FP2 оказывал значительное влияние на снижение потребления пищи через 12, 24 и 48 часов после введения при всех уровнях дозы, применявшихся в испытании (таблица 34). У мышей наблюдали снижение в процентном изменении потребления пищи по сравнению с PBS во все моменты времени и при всех уровнях дозы (таблица 35).

**Таблица 34.** Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 часов мышами линии C57BL/6

| Суммарное потребление пищи (г) |                      |                      |                     |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Обработка                      | 12 часов             | 24 часа              | 48 часов            |
| PBS                            | $3,7 \pm 0,2$        | $4,4 \pm 0,2$        | $8,8 \pm 0,4$       |
| FP2, 1 нмоль/кг                | $2,8 \pm 0,4^*$      | $3,0 \pm 0,4^{**}$   | $6,9 \pm 0,7^*$     |
| FP2, 4 нмоль/кг                | $2,4 \pm 0,2^{***}$  | $3,1 \pm 0,2^{**}$   | $7,0 \pm 0,3^*$     |
| FP2, 8 нмоль/кг                | $1,9 \pm 0,2^{****}$ | $2,4 \pm 0,1^{****}$ | $6,2 \pm 0,2^{***}$ |
| FP2, 16 нмоль/кг               | $1,8 \pm 0,1^{****}$ | $2,7 \pm 0,1^{***}$  | $6,3 \pm 0,4^{**}$  |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг          | $2,3 \pm 0,3^{***}$  | $2,8 \pm 0,4^{**}$   | $6,6 \pm 0,7^{**}$  |

Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS

\*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , по сравнению с PBS

\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , по сравнению с PBS соответственно

Применяемые статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

n=8 на группу, за исключением 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг (n=6).

**Таблица 35.** Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем) в течение 48 часов у мышей линии C57BL/6

| Процент ингибирования по сравнению с PBS |                       |                       |                       |
|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Обработка                                | 12 часов              | 24 часа               | 48 часов              |
| PBS                                      | $0,0 \pm 7,9$         | $0,0 \pm 7,7$         | $0,0 \pm 5,9$         |
| FP2, 1 нмоль/кг                          | $22,4 \pm 12,5^*$     | $31,8 \pm 10,5^{**}$  | $21,8 \pm 8,1^*$      |
| FP2, 4 нмоль/кг                          | $36,6 \pm 7,2^{****}$ | $30,4 \pm 5,8^{**}$   | $20,2 \pm 4,7^*$      |
| FP2, 8 нмоль/кг                          | $47,0 \pm 6,2^{****}$ | $45,7 \pm 3,8^{****}$ | $29,7 \pm 3,9^{****}$ |
| FP2, 16 нмоль/кг                         | $49,2 \pm 4,1^{****}$ | $38,1 \pm 4,1^{***}$  | $27,8 \pm 5,1^{**}$   |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг                    | $36,9 \pm 9,9^{***}$  | $36,5 \pm 8,8^{**}$   | $24,6 \pm 8,2^{**}$   |

Анорексигенный эффект FP2 выражается как относительное снижение потребления пищи по сравнению с PBS в контролях соответственно.

Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS

\*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , по сравнению с PBS

\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , по сравнению с PBS соответственно

Применяемые статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

n=8 на группу, за исключением 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг (n=6).

Пример 15. Влияние FP2 на потребление пищи крысами линии Спрег-Доули

**[00301]** Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и набор массы тела у самцов крыс линии Спрег-Доули после однократной дозы. Животных получили от компании Charles Rivers Labs (г. Уилмингтон, штат Массачусетс, США), они имели массу тела 200-225 г и были использованы в течение одной недели после доставки. Животных размещали в клетках по отдельности на подстилках Alpha Dry и с пластиковой трубкой для подачи в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом света/тьмы. Им предоставляли неограниченный доступ к воде и кормили кормом для лабораторных грызунов; корм для грызунов Irradiated Certified PicoLab® Rodent Diet 20, 5K75\* (поставщик: Purina Mills, г. Сент-Луис, штат Миссури, через ASAP, г. Квакертаун, штат Пенсильвания, США). Перед введением дозы каждую крысу взвешивали и



регистрировали массу тела.

**[00302]** Животные в течение минимум 72 часов проходили акклиматизацию в клетках BioDAQ; затем крыс на основании потребления пищи за последние 24 часа разделяли на шесть групп по восемь животных. В период с 16:00 до 17:00 животных взвешивали и вводили им носитель или композиции посредством подкожной инъекции. Изменение массы корма в каждой клетке непрерывно регистрировалось системой BioDAQ в течение 48 часов после введения композиции. Для сравнения в настоящем исследовании использовали 6XHis-FP1.

**[00303]** После введения однократной дозы FP2 измеряли дозозависимые снижения потребления пищи. При дозе 0,3 нмоль/кг не наблюдали существенных отличий в потреблении пищи. При дозе 1 нмоль/кг наблюдали значительное влияние на снижение потребления пищи через 12 часов, но не через 24 или 48 часов. При уровнях дозы 3 и 10 нмоль/кг наблюдали значительное снижение потребления пищи во все моменты времени (таблица 36, Фиг. 19). Снижение в процентном изменении потребления пищи по сравнению с PBS наблюдали во все моменты времени и при всех уровнях дозы (таблица 37).

**Таблица 36.** Влияние однократной дозы FP2 на потребление пищи в течение 48 часов крысами линии Спрег-Доули

| Суммарное потребление пищи (г) |               |              |              |
|--------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| Обработка                      | 12 часов      | 24 часа      | 48 часов     |
| PBS                            | 21,7 ± 0,6    | 25,0 ± 0,8   | 53,1 ± 1,6   |
| FP2, 0,3 нмоль/кг              | 19,5 ± 0,9    | 22,9 ± 0,7   | 48,4 ± 1,5   |
| FP2, 1 нмоль/кг                | 17,5 ± 0,9*   | 19,8 ± 0,8   | 47,0 ± 2,6   |
| FP2, 3 нмоль/кг                | 16,1 ± 1,2**  | 17,0 ± 1,0** | 39,2 ± 3,2** |
| FP2, 10 нмоль/кг               | 15,8 ± 0,9*** | 16,5 ± 0,9** | 36,5 ± 3,2** |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг          | 15,0 ± 1,4*** | 15,7 ± 1,2** | 37,2 ± 4,5** |

Данные представлены как среднее ± SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS

\*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , по сравнению с PBS соответственно

Применяемые статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

n=по 8/группа

**Таблица 37.** Влияние однократной дозы FP2 на процентное снижение потребления пищи (по сравнению с носителем) в течение 48 часов крысами линии Спрег-Доули.

| Процент ингибирования по сравнению с PBS |            |           |           |
|------------------------------------------|------------|-----------|-----------|
| Обработка                                | 12 часов   | 24 часа   | 48 часов  |
| PBS                                      | 0,0 ± 4,0  | 0,0 ± 4,6 | 0,0 ± 4,3 |
| FP2, 0,3 нмоль/кг                        | 10,0 ± 4,7 | 8,5 ± 4,1 | 8,8 ± 3,9 |

|                       |               |              |              |
|-----------------------|---------------|--------------|--------------|
| FP2, 1 нмоль/кг       | 19,3 ± 4,7*   | 20,8 ± 4,1   | 11,5 ± 5,5   |
| FP2, 3 нмоль/кг       | 25,9 ± 6,1**  | 32,0 ± 4,7** | 26,2 ± 6,5** |
| FP2, 10 нмоль/кг      | 27,4 ± 4,8*** | 33,8 ± 4,1** | 31,2 ± 6,4** |
| 6xHis-FP1, 8 нмоль/кг | 30,8 ± 6,6*** | 37,0 ± 5,4** | 29,9 ± 8,8** |

Анорексигенный эффект FP2 выражается как относительное снижение потребления пищи по сравнению с PBS в контролях соответственно.

Данные представлены как среднее ± SEM.

\*  $p \leq 0,05$ , по сравнению с PBS

\*\*  $p \leq 0,01$ , по сравнению с PBS

\*\*\*  $p \leq 0,001$ , по сравнению с PBS, по сравнению с PBS соответственно

Применяемые статистические анализы: метод дисперсионного анализа и критерий Даннетта для множественных сравнений.

n=по 8/группа

Пример 16. Влияние FP2 на потребление пищи, массу тела и гомеостаз глюкозы у мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6

**[00304]** Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи и массу тела, а также улучшать гомеостаз глюкозы при многократной дозе у самцов мышей DIO линии C57BL/6 в течение 8 дней. В исследовании использовали самцов мышей DIO линии C57BL/6 (в возрасте 21 недели, откормленные высокожировым кормом в течение 15 недель), полученные от компании Taconic Biosciences (г. Хадсон, штат Нью-Йорк, США). Мышей размещали в клетках по отдельности в помещении с регулируемой температурой и 12-часовым циклом свет/тьма (6:00/18:00), им предоставляли неограниченный доступ к воде и давали корм Research Diet D12492 (Research Diets, г. Нью-Брансуик, штат Нью-Джерси, США). Перед экспериментом мыши больше 1 недели проходили акклиматизацию в виварии для мышей. Конечными показателями исследования являлись измерения потребления пищи, массы тела, состава тела и показателей гликемии (тест OGTT, уровень глюкозы в крови). За один день перед введением дозы животных взвешивали и разделяли на группы по массе тела (BW). Дозу мышам вводили посредством подкожной инъекции. Животные, которым вводили FP2, получали данную композицию на 0-й день, 3-й день, 6-й день, 9-й день и 12-й день. Группа, получавшая носитель, и группа, получавшая росиглитазон, в эти дни получали стерильный PBS подкожно. Росиглитазон добавляли в корм в количестве 0,015%; доступ к корму не ограничивали. Массу тела и потребление пищи регистрировали ежедневно в течение периода пятнадцать дней. Уровень глюкозы в крови измеряли на 0-й, 7-й и 13-й дни. Пероральный тест на толерантность к глюкозе (OGTT) проводили на 14-й день. Уровни инсулина измеряли в выбранные моменты времени в ходе проведения теста OGTT. На 15-й день мышей умерщвляли посредством ингаляции CO<sub>2</sub> и отбирали пробы терминальной крови посредством пункции сердца для анализа воздействия. Отдельную ветвь ФК проводили в дозовых группах, состоящих из трех мышей, всего 15 мышей.

**[00305] Анализ зависимости воздействие - ответ (E-R) для FP2 у мышей DIO**

**[00306]** Большинство животных в фармакодинамических (ФД) (эффективность) ветвях в последний день исследования, когда отбирали фармакокинетические (ФК) пробы, имели необнаружимые концентрации лекарственного средства, возможно, из-за иммуногенности. Таким образом, при проведении анализа зависимости воздействие - ответ (на 3-й, 6-й и 9-й дни соответственно) средние профили ФК из ветвей ФК вместо отдельных ФК из ветвей ФД использовали оценки для изменения массы тела (%) относительно исходного уровня в ветвях ФД при соответственном уровне дозы. Этот способ предполагает, что с точки зрения воздействия лекарственного средства ветви ФК ведут себя аналогично ветвям ФД.

**[00307]** Для определения корреляции между воздействием и данными ответа (логарифмически преобразованные концентрации лекарственных препаратов) использовали модель  $E_{\max}$  ((GraphPad Prism 6, log (агонист) против ответа)). Угловый коэффициент Хилла был принят равным 1. Следует отметить, что подобранные моделью значения  $EC_{10}$ - $EC_{50}$  для 3-го, 6-го и 9-го дней отличались не более чем вдвое, несмотря на то что оценки  $E_{\max}$  различались ( $E_{\max} = -4,26\%$ ,  $-8,18\%$  и  $-9,85\%$  соответственно). У некоторых животных на 9-й день также наблюдали снижение воздействия лекарственного средства ввиду возможного образования ADA, поэтому оценки параметра E-R на основании данных на 9-й день следует интерпретировать с осторожностью.

**[00308]** Влияние двухнедельного воздействия FP2 на потребление пищи, массу тела, гомеостаз глюкозы и содержание жира в печени оценивали у самцов мышей с алиментарным ожирением (DIO) линии C57BL/6. В ветви ФК исследования до 9-го дня исследования воздействие в группе лечения, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, составило 1,7-3,3 нМ FP2, в группе лечения, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг, - 7,1-14 нМ, в группе лечения, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг, - 20,8-41,6 нМ, а в группе лечения, получавшей дозу 10 нмоль/кг, - 28,5-112,9 нМ FP2 ( $n=2$  или 3, таблица 49). После 9-го дня наблюдалось уменьшение уровней циркуляции у большинства животных, несмотря на постоянное введение препарата по схеме q3d (таблица 49). В соответствии с этим ускоренным выведением большинство животных в ветви ФД исследования на 15-й день имело необнаружимые уровни циркулирующего FP2 (таблица 50).

**[00309]** Введение FP2 мышам DIO по схеме q3d привело к снижению потребления пищи (таблица 38), массы тела (таблицы 39, 40 и Фиг. 20) и уровня глюкозы в крови после еды по сравнению с обработкой носителем (таблица 43 и Фиг. 23). Значимое уменьшение потребления пищи наблюдали на 2-й день, 5-й день, 8-й день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 1-го дня по 7-й день при дозе 1,0 нмоль/кг, на 1-й день, 2-й день, с 4-го дня по 6-й день и на 8-й день при дозе 3,0 нмоль/кг, а также на 1-й день, с 3-го дня по 6-й день, на 8-й день и на 9-й день при дозе 10,0 нмоль/кг. Процентное изменение массы тела было значимым с 5-го дня по 13-й день при дозе 0,3 нмоль/кг, с 3-го дня по 13-й день при дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, а также с 4-го дня по 13-й день при дозе 3,0 нмоль/кг. Изменение массы тела в граммах было значимым с 8-го дня при дозе 0,3 нмоль/кг, с 6-го дня при дозе 1,0 нмоль/кг,

с 7-го дня при дозе 3,0 нмоль/кг и с 5-го дня при дозе 10,0 нмоль/кг. Снижение уровней глюкозы в крови после еды было значимым на 7-й день у животных с уровнем дозы 3,0 нмоль/кг и было значимым на 13-й день у животных с уровнями дозы 3,0 и 10,0 нмоль/кг.

**[00310]** Мыши DIO, получавшие FP2 по схеме q3d, на 14-й день имели улучшенную толерантность к глюкозе по сравнению с обработкой носителем, по данным перорального теста на стимуляцию глюкозой (таблица 41; Фиг. 21А и 21В). Уровень глюкозы значительно снижался через 30 минут в группе, получавшей дозу 0,3 нмоль/кг, через 60 минут и 120 минут в группе, получавшей дозу 1,0 нмоль/кг, через 120 минут в группе, получавшей дозу 3,0 нмоль/кг, и через 30, 90 и 120 минут в группе, получавшей дозу 10,0 нмоль/кг. Полная площадь под кривой была значимой для всех дозовых групп. Уровни инсулина по данным теста на стимуляции глюкозой были значимо ниже через 30 минут в группах, получавших дозы 0,3 и 10,0 нмоль/кг (таблица 42; Фиг. 22А и 22В). Кроме того, по сравнению с животными, получавшими носитель, наблюдали значимое снижение расчетного показателя НОМА-IR натощак у мышей DIO через 14 дней, в которые им вводили FP2 по схеме q3d в дозе 10,0 нмоль/кг, что указывает на улучшенную чувствительность к инсулину (таблица 44 и Фиг. 24).

**[00311]** Состав тела измеряли методом МРТ в -1-й день перед началом исследования и на 13-й день (таблица 47 и таблица 48). Введение FP2 в дозах 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг мышам DIO приводило к значимым снижениям массы жировой ткани на 13-й день; при этом не наблюдались изменения массы нежировой ткани во всех группах лечения. На 13-й день группа лечения, получавшая 10,0 нмоль/кг, имела значимое увеличение относительной (%) массы нежировой ткани и значимое относительное (%) снижение массы жировой ткани по сравнению с группой, получавшей носитель. С -1-го по 13-й день были значимые изменения массы нежировой ткани в группах лечения, получавших 0,3 нмоль/кг, 1,0 нмоль/кг и 10,0 нмоль/кг, и были значимые относительные изменения (%) массы нежировой ткани в группах лечения, получавших 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг. С -1-го по 13-й день были значимые изменения массы жировой ткани и относительные изменения (%) массы нежировой ткани во всех группах лечения по сравнению с носителем.

**[00312]** Не наблюдали значимых отличий в уровнях эндогенного мышинового GDF15 в сыворотке между животными, получавшими носитель и получавшими FP2 по схеме q3d в течение 15 дней (таблица 46).

**[00313]** Заключение: результаты показывают, что более высокое воздействие лекарственного средства по существу связано с более высоким (%) изменением массы тела относительно исходной на уровне популяции по всем дозовым группам в исследовании, на 3-й, 6-й и 9-й дни.

**[00314]** Воздействие FP2 в течение двух недель приводило к уменьшению потребления пищи, уменьшению массы тела, снижению уровня глюкозы в крови, улучшению толерантности к глюкозе и чувствительности к инсулину у мышей DIO. Значимое снижение потребления пищи за множество дней было достигнуто при введении 1,0, 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Масса тела существенно уменьшалась, начиная с

третьего-пятого дня после начала исследования. Уровень глюкозы в крови после еды значительно снижался на 13-й день после введения FP2 в дозах 3,0 и 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. Чувствительность к инсулину, которую оценивали по значительному снижению показателя НОМА-IR натошак, была достигнута через 14 дней, в которые животным вводили FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d. На 13-й день наблюдали значимое увеличение процентной массы нежировой ткани и значимое снижение процентной массы жировой ткани у мышей DIO, получавших FP2 в дозе 10,0 нмоль/кг по схеме q3d.

**Таблица 38.** Влияние FP2 на суточное потребление пищи (г) после 13 дней введения

| Обработка<br>День | Носитель<br>Н/П | FP2 (нмоль/кг) |            |            |            | Росиглитазон<br>10 мг/кг в день |
|-------------------|-----------------|----------------|------------|------------|------------|---------------------------------|
|                   |                 | 0,3            | 1,0        | 3,0        | 10,0       |                                 |
| 0                 | 2,0 ± 0,1       | 1,9 ± 0,1      | 2,2 ± 0,2  | 1,9 ± 0,2  | 1,9 ± 0,2  | 2,2 ± 0,1                       |
| 1                 | 2,4 ± 0,2       | 2,1 ± 0,1      | 1,6 ± 0,1* | 1,5 ± 0,1* | 1,3 ± 0,1* | 2,7 ± 0,1                       |
| 2                 | 2,5 ± 0,1       | 1,8 ± 0,1*     | 1,7 ± 0,2* | 1,9 ± 0,1* | 2,0 ± 0,1  | 3,0 ± 0,2                       |
| 3                 | 2,5 ± 0,1       | 2,1 ± 0,1      | 1,7 ± 0,1* | 1,9 ± 0,1  | 1,8 ± 0,1* | 2,8 ± 0,2                       |
| 4                 | 2,6 ± 0,1       | 2,0 ± 0,1      | 1,8 ± 0,1* | 1,9 ± 0,1* | 1,9 ± 0,1* | 2,9 ± 0,2                       |
| 5                 | 2,8 ± 0,1       | 2,1 ± 0,2*     | 2,2 ± 0,1* | 2,2 ± 0,0* | 1,9 ± 0,1* | 2,7 ± 0,2                       |
| 6                 | 2,8 ± 0,1       | 2,3 ± 0,2      | 2,1 ± 0,1* | 2,2 ± 0,1* | 2,0 ± 0,1* | 2,8 ± 0,2                       |
| 7                 | 2,6 ± 0,2       | 2,3 ± 0,1      | 2,0 ± 0,1* | 2,0 ± 0,2  | 2,1 ± 0,1  | 2,9 ± 0,2                       |
| 8                 | 2,7 ± 0,2       | 2,1 ± 0,1*     | 2,2 ± 0,1  | 2,0 ± 0,1* | 2,0 ± 0,1* | 3,1 ± 0,2                       |
| 9                 | 2,8 ± 0,1       | 2,3 ± 0,1      | 2,3 ± 0,2  | 2,3 ± 0,2^ | 2,1 ± 0,2* | 3,2 ± 0,1                       |
| 10                | 2,6 ± 0,1       | 2,5 ± 0,1      | 2,4 ± 0,2  | 2,3 ± 0,2^ | 2,1 ± 0,2  | 3,0 ± 0,2                       |
| 11                | 2,9 ± 0,1       | 2,5 ± 0,1      | 2,8 ± 0,2  | 2,6 ± 0,4  | 2,6 ± 0,1  | 3,3 ± 0,1                       |
| 12                | 2,8 ± 0,1       | 2,7 ± 0,2      | 2,8 ± 0,1  | 2,8 ± 0,2  | 2,9 ± 0,1  | 3,1 ± 0,2                       |
| 13                | 2,7 ± 0,1       | 2,5 ± 0,2      | 2,6 ± 0,1  | 2,6 ± 0,1  | 2,2 ± 0,1  | 3,1 ± 0,2                       |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе, за исключением данных для n=7, которые отмечены значком ^

\* p < 0,05, по сравнению с носителем

Применяемые статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 39.** Влияние FP2 на процентное изменение массы тела после 13 дней обработки

| Обработка<br>День | Носитель<br>Н/П | FP2 (нмоль/кг) |            |            |           | Росиглитазон<br>10 мг/кг в день |
|-------------------|-----------------|----------------|------------|------------|-----------|---------------------------------|
|                   |                 | 0,3            | 1,0        | 3,0        | 10,0      |                                 |
| -1                | -0,1 ± 0,4      | 0,5 ± 0,2      | -0,1 ± 0,1 | -0,4 ± 0,2 | 0,0 ± 0,6 | 0,1 ± 0,2                       |

|    |            |             |             |             |              |           |
|----|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------|
| 0  | 0,0 ± 0,0  | 0,0 ± 0,0   | 0,0 ± 0,0   | 0,0 ± 0,0   | 0,0 ± 0,0    | 0,0 ± 0,0 |
| 1  | -0,4 ± 0,5 | -1,0 ± 0,3  | -2,2 ± 0,4  | -1,8 ± 0,6  | -2,4 ± 0,5   | 1,3 ± 0,4 |
| 2  | -0,4 ± 0,3 | -2,2 ± 0,4  | -3,4 ± 0,6  | -3,0 ± 0,6  | -3,1 ± 0,4   | 1,3 ± 0,5 |
| 3  | -0,3 ± 0,4 | -2,3 ± 0,4  | -4,2 ± 0,6* | -3,5 ± 0,6  | -4,3 ± 0,5*  | 1,9 ± 0,5 |
| 4  | -0,3 ± 0,5 | -2,9 ± 0,5  | -5,3 ± 0,6* | -4,9 ± 0,7* | -5,8 ± 0,7*  | 1,8 ± 0,7 |
| 5  | -0,2 ± 0,4 | -4,2 ± 0,7* | -6,2 ± 0,6* | -5,6 ± 0,7* | -6,8 ± 0,7*  | 1,7 ± 0,8 |
| 6  | -0,4 ± 0,6 | -5,1 ± 0,7* | -7,4 ± 0,8* | -6,9 ± 0,7* | -8,5 ± 0,9*  | 1,1 ± 0,9 |
| 7  | 0,2 ± 0,8  | -5,1 ± 0,7* | -7,7 ± 0,9* | -7,4 ± 0,7* | -8,7 ± 0,9*  | 2,0 ± 1,0 |
| 8  | 0,2 ± 1,0  | -6,1 ± 0,8* | -7,9 ± 0,9* | -8,0 ± 0,8* | -9,7 ± 0,8*  | 2,4 ± 1,1 |
| 9  | 0,5 ± 1,1  | -6,0 ± 0,9* | -8,4 ± 0,9* | -8,8 ± 0,9* | -10,1 ± 1,0* | 3,1 ± 1,0 |
| 10 | 1,1 ± 1,2  | -5,7 ± 0,8* | -8,1 ± 0,9* | -8,9 ± 0,9* | -10,7 ± 1,2* | 3,5 ± 1,2 |
| 11 | 1,2 ± 1,3  | -6,1 ± 0,9* | -8,2 ± 0,8* | -8,6 ± 1,3* | -11,1 ± 1,4* | 3,7 ± 1,2 |
| 12 | 1,4 ± 1,3  | -6,3 ± 1,2* | -7,7 ± 0,8* | -8,2 ± 1,4* | -10,9 ± 1,4* | 4,1 ± 1,3 |
| 13 | 1,7 ± 0,9  | -5,8 ± 1,4* | -7,1 ± 1,0* | -7,2 ± 1,4* | -10,9 ± 1,4* | 4,7 ± 1,3 |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*p < 0,05 по сравнению с носителем

Применяемые статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 40.** Влияние FP2 на изменение массы тела (г) после 13 дней обработки

| Обработка | Носитель   | FP2 (нмоль/кг) |             |             |             | Росиглитазон    |
|-----------|------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| День      | Н/П        | 0,3            | 1,0         | 3,0         | 10,0        | 10 мг/кг в день |
| -1        | 44,6 ± 0,6 | 44,5 ± 0,6     | 44,5 ± 0,6  | 44,5 ± 0,6  | 44,5 ± 0,6  | 44,5 ± 0,6      |
| 0         | 44,6 ± 0,6 | 44,3 ± 0,6     | 44,6 ± 0,6  | 44,7 ± 0,6  | 44,6 ± 0,7  | 44,4 ± 0,6      |
| 1         | 44,5 ± 0,7 | 43,8 ± 0,6     | 43,6 ± 0,6  | 43,9 ± 0,7  | 43,5 ± 0,7  | 45,0 ± 0,7      |
| 2         | 44,5 ± 0,7 | 43,3 ± 0,7     | 43,1 ± 0,6  | 43,3 ± 0,7  | 43,2 ± 0,7  | 45,0 ± 0,7      |
| 3         | 44,5 ± 0,7 | 43,2 ± 0,7     | 42,7 ± 0,6  | 43,1 ± 0,7  | 42,6 ± 0,6  | 45,3 ± 0,7      |
| 4         | 44,5 ± 0,7 | 43,0 ± 0,7     | 42,2 ± 0,6  | 42,5 ± 0,7  | 42,0 ± 0,7  | 45,2 ± 0,7      |
| 5         | 44,5 ± 0,7 | 42,4 ± 0,7     | 41,8 ± 0,5  | 42,2 ± 0,7  | 41,5 ± 0,6* | 45,2 ± 0,7      |
| 6         | 44,5 ± 0,7 | 42,0 ± 0,7     | 41,3 ± 0,6* | 41,6 ± 0,7  | 40,7 ± 0,5* | 44,9 ± 0,8      |
| 7         | 44,7 ± 0,7 | 42,0 ± 0,7     | 41,1 ± 0,6* | 41,4 ± 0,7* | 40,6 ± 0,5* | 45,3 ± 0,8      |

|    |            |             |             |             |             |            |
|----|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 8  | 44,7 ± 0,7 | 41,6 ± 0,7* | 41,1 ± 0,7* | 41,1 ± 0,7* | 40,2 ± 0,6* | 45,5 ± 0,8 |
| 9  | 44,8 ± 0,7 | 41,6 ± 0,8* | 40,8 ± 0,7* | 40,8 ± 0,8* | 40,0 ± 0,8* | 45,8 ± 0,7 |
| 10 | 45,1 ± 0,7 | 41,8 ± 0,8* | 41,0 ± 0,8* | 40,8 ± 0,8* | 39,8 ± 0,8* | 46,0 ± 0,8 |
| 11 | 45,2 ± 0,8 | 41,6 ± 0,8* | 40,9 ± 0,7* | 40,8 ± 0,9* | 39,6 ± 0,9* | 46,1 ± 0,8 |
| 12 | 45,3 ± 0,7 | 41,5 ± 0,9* | 41,2 ± 0,7* | 41,0 ± 0,9* | 39,7 ± 0,9* | 46,3 ± 0,9 |
| 13 | 45,4 ± 0,7 | 41,7 ± 0,9* | 41,4 ± 0,8* | 41,5 ± 0,9* | 39,7 ± 0,9* | 46,5 ± 0,9 |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 41.** Влияние FP2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней обработки

| Обработка | Доза<br>(нмоль / кг) | Время после стимуляции глюкозой (мин) |           |           |          |          | Общая<br>AUC<br>(мг/дл/ 120<br>мин) | Δ AUC<br>(мг/дл/<br>120 мин) |
|-----------|----------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|-------------------------------------|------------------------------|
|           |                      | 0                                     | 30        | 60        | 90       | 120      |                                     |                              |
| Носитель  | Н/П                  | 161 ± 10                              | 225 ± 17  | 228 ± 14  | 208 ± 18 | 213 ± 19 | 25429 ± 1228                        | 6094 ± 1430                  |
| FP2       | 0,3                  | 144 ± 4                               | 163 ± 14* | 209 ± 11  | 180 ± 12 | 171 ± 7  | 21270 ± 399*                        | 3985 ± 521                   |
|           | 1,0                  | 151 ± 9                               | 179 ± 18  | 188 ± 7   | 179 ± 13 | 163 ± 8* | 21096 ± 754*                        | 2972 ± 907                   |
|           | 3,0                  | 149 ± 8                               | 180 ± 18  | 179 ± 11* | 164 ± 6  | 163 ± 9* | 20338 ± 876*                        | 2426 ± 1058                  |
|           | 10,0                 | 134 ± 6                               | 163 ± 7*  | 190 ± 13  | 152 ± 7* | 163 ± 8* | 19599 ± 614*                        | 3539 ± 1198                  |

|                   |                       |         |              |              |             |             |                 |                |
|-------------------|-----------------------|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|----------------|
| <b>Росиглигаз</b> | 10<br>мг/кг в<br>день | 132 ± 9 | 152 ±<br>10* | 162 ±<br>13* | 138 ±<br>9* | 159 ±<br>9* | 17904 ±<br>632* | 2139 ±<br>1179 |
|-------------------|-----------------------|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|----------------|

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений для значений уровней глюкозы;

однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC

**Таблица 42.** Влияние FP2 на уровни инсулина (нг/мл) в тесте OGTT, проведенном через 14 дней обработки

| Обработка         | Доза<br>(нмоль/кг) | Время после стимуляции глюкозой<br>(мин) |            |           | Общая<br>AUC<br>(нг/мл/90<br>мин) |
|-------------------|--------------------|------------------------------------------|------------|-----------|-----------------------------------|
|                   |                    | 0                                        | 30         | 90        |                                   |
| Носитель          | Н/П                | 4,2 ± 0,7                                | 12,2 ± 2,3 | 3,6 ± 0,5 | 716,1 ±<br>122,0                  |
| FP2               | 0,3                | 2,9 ± 0,6                                | 5,8 ± 1,8* | 2,4 ± 0,4 | 377,1 ±<br>97,3                   |
|                   | 1,0                | 2,9 ± 0,4                                | 8,2 ± 2,6  | 2,6 ± 0,4 | 491,8 ±<br>118,2                  |
|                   | 3,0                | 3,0 ± 0,3                                | 8,4 ± 1,5  | 2,5 ± 0,3 | 498,6 ±<br>77,0                   |
|                   | 10,0               | 2,4 ± 0,4                                | 4,3 ± 0,5* | 2,1 ± 0,4 | 295,5 ±<br>32,0*                  |
| Росиглигаз<br>зон | 10 мг/кг в<br>день | 0,9 ± 0,1                                | 1,8 ± 0,2* | 0,8 ± 0,1 | 118,5 ±<br>9,6*                   |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений для значений уровней инсулина;

однофакторный дисперсионный анализ, критерий множественных сравнений Тьюки для AUC



**Таблица 43.** Влияние FP2 на уровни глюкозы в крови (мг/дл) после еды

| Обработка           | Доза (нмоль/кг) | Время после начала введения (дней) |          |          |
|---------------------|-----------------|------------------------------------|----------|----------|
|                     |                 | 0                                  | 7        | 13       |
| <b>Носитель</b>     | Н/П             | 162 ± 5                            | 159 ± 6  | 180 ± 9  |
| <b>FP2</b>          | 0,3             | 143 ± 5                            | 150 ± 9  | 168 ± 9  |
|                     | 1,0             | 153 ± 12                           | 135 ± 7  | 159 ± 7  |
|                     | 3,0             | 148 ± 3                            | 127 ± 6* | 151 ± 8* |
|                     | 10,0            | 146 ± 6                            | 136 ± 4  | 148 ± 3* |
| <b>Росиглитазон</b> | 10 мг/кг в день | 137 ± 7                            | 117 ± 4* | 134 ± 6* |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 44.** Показатель HOMA-IR после голодания у мышей DIO через 14 дней обработки FP2 по схеме q3d

| Обработка           | Доза (нмоль/кг) | HOMA-IR     |
|---------------------|-----------------|-------------|
| <b>Носитель</b>     | Н/П             | 48,7 ± 9,2  |
| <b>FP2</b>          | 0,1             | 30,1 ± 6,6  |
|                     | 1,0             | 30,5 ± 3,8  |
|                     | 3,0             | 31,3 ± 3,2  |
|                     | 10,0            | 22,7 ± 3,1* |
| <b>Росиглитазон</b> | 10 мг/кг в день | 8,7 ± 1,0*  |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 45.** Масса печени у мышей DIO через 15 дней обработки FP2 по схеме q3d

| Обработка    | Доза (нмоль/кг) | Масса печени (г) | Масса печени (% массы тела) |
|--------------|-----------------|------------------|-----------------------------|
| Носитель     | Н/П             | 1,9 ± 0,1        | 4,3 ± 0,3                   |
| FP2          | 0,1             | 1,7 ± 0,1        | 4,0 ± 0,1                   |
|              | 1,0             | 1,7 ± 0,0        | 4,2 ± 0,1                   |
|              | 3,0             | 1,8 ± 0,1        | 4,2 ± 0,1                   |
|              | 10,0            | 1,7 ± 0,1        | 4,2 ± 0,1                   |
| Росиглитазон | 10 мг/кг в день | 1,9 ± 0,1        | 4,1 ± 0,2                   |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 46.** Уровни мышиног GDF15 (пг/мл) в сыворотке мышей DIO через 15 дней обработки FP2 по схеме q3d

| Обработка    | Доза (нмоль/кг) | mGDF15        |
|--------------|-----------------|---------------|
| Носитель     | Н/П             | 258,3 ± 21,4  |
| FP2          | 0,1             | 214,1 ± 10,3  |
|              | 1,0             | 191,6 ± 12,7  |
|              | 3,0             | 254,5 ± 28,6  |
|              | 10,0            | 202,0 ± 10,0  |
| Росиглитазон | 10 мг/кг в день | 509,6 ± 26,2* |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*  $p < 0,05$ , по сравнению с носителем

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 47.** Влияние FP2, вводимого мышам DIO по схеме q3d, на состав тела (г), по данным MPT

| Обработка | Доза | Жировая | Жировая | Δ Жир (г) | Нежирова | Нежирова | Δ |
|-----------|------|---------|---------|-----------|----------|----------|---|
|           |      |         |         |           |          |          |   |

|                          | (нмоль/<br>кг)         | ткань (г),<br>1-й день | ткань (г),<br>13-й день |             | я ткань<br>(г), 1-й<br>день | я ткань<br>(г), 13-й<br>день | Нежировая<br>ткань (г) |
|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|
| <b>Носитель</b>          | Н/П                    | 17,4 ± 0,6             | 18,2 ± 0,6              | 0,9 ± 0,3   | 25,4 ± 0,3                  | 25,1 ± 0,3                   | -0,4 ± 0,2             |
| <b>FP2</b>               | 0,3                    | 17,0 ± 0,6             | 15,2 ± 0,8              | -1,9 ± 0,6* | 25,8 ± 0,7                  | 24,5 ± 0,5                   | -1,2 ± 0,2*            |
|                          | 1,0                    | 17,0 ± 0,6             | 14,9 ±<br>0,6*          | -2,1 ± 0,4* | 25,8 ± 0,5                  | 24,6 ± 0,4                   | -1,2 ± 0,2*            |
|                          | 3,0                    | 17,4 ± 0,7             | 15,1 ± 1,1              | -2,3 ± 0,5* | 25,3 ± 0,4                  | 24,2 ± 0,4                   | -1,1 ± 0,1             |
|                          | 10,0                   | 16,7 ± 0,6             | 13,2 ±<br>0,8*          | -3,6 ± 0,5* | 26,1 ± 0,6                  | 24,5 ± 0,6                   | -1,7 ± 0,2*            |
| <b>Росиглитаз<br/>он</b> | 10 мг/<br>кг в<br>день | 17,2 ± 0,6             | 19,1 ± 0,5              | 1,9 ± 0,6   | 25,5 ± 0,7                  | 25,1 ± 0,6                   | -0,4 ± 0,2             |

Значения представляют среднее ± SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\*p < 0,05 по сравнению с носителем

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 48.** Влияние FP2, вводимого мышам DIO по схеме q3d, на состав тела (%), по данным MPT

| Обработка                | Доза<br>(нмоль/кг)  | Жировая<br>ткань<br>(%), -1-й<br>день | Жирова<br>я ткань<br>(%), 13-й<br>день | Δ Жир<br>(%) | Нежиров<br>ая ткань<br>(%), -1-й<br>день | Нежирова<br>я ткань<br>(%), 13-й<br>день | Δ<br>Нежировая<br>ткань (%) |
|--------------------------|---------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Носитель</b>          | Н/П                 | 38,1 ± 1,0                            | 40,1 ± 1,0                             | 2,1 ± 0,3    | 55,9 ± 0,9                               | 55,3 ± 0,9                               | -0,6 ± 0,3                  |
| <b>FP2</b>               | 0,3                 | 37,6 ± 1,2                            | 36,3 ± 1,3                             | -1,3 ± 0,9*  | 56,8 ± 1,3                               | 59,0 ± 1,4                               | 2,2 ± 0,8                   |
|                          | 1,0                 | 37,2 ± 1,1                            | 35,8 ± 0,9                             | -1,4 ± 0,5*  | 56,7 ± 1,1                               | 59,5 ± 1,0                               | 2,8 ± 0,6*                  |
|                          | 3,0                 | 38,3 ± 1,4                            | 36,1 ± 2,0                             | -2,3 ± 0,7*  | 55,9 ± 1,2                               | 58,7 ± 2,0                               | 2,8 ± 0,8*                  |
|                          | 10,0                | 36,9 ± 1,1                            | 33,1 ±<br>1,5*                         | -3,8 ± 0,8*  | 57,5 ± 1,0                               | 61,7 ± 1,4*                              | 4,2 ± 0,7*                  |
| <b>Росиглитаз<br/>он</b> | 10 мг/ кг<br>в день | 38,0 ± 1,2                            | 41,1 ± 0,9                             | 3,1 ± 0,9    | 56,2 ± 1,2                               | 53,9 ± 0,8                               | -2,3 ± 0,8                  |

Значения представляют среднее  $\pm$  SEM по данным от 8 животных в каждый момент времени и в каждой группе

\* $p < 0,05$  по сравнению с носителем

Статистические анализы: однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки для множественных сравнений

**Таблица 49.** Воздействия FP2 в сыворотке (нМ) в ветви ФК исследования у мышей DIO, получавших обработку по схеме q3d

| Группа<br>лечения    | Идентификат<br>ор субъекта | Время после введения начальной дозы (время после<br>введения последней дозы) |          |             |              |                        |                        |                         |
|----------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                      |                            | 3-й<br>день                                                                  | 6-й день | 9-й<br>день | 12-й<br>день | 14-й<br>день (48<br>ч) | 15-й<br>день (72<br>ч) | 17-й<br>день<br>(120 ч) |
| 0,1<br>нмоль/<br>кг  | 9                          | 1,930                                                                        | 2,993    | <LOQ        | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 10                         | 1,853                                                                        | 3,369    | 2,817       | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 11                         | 1,715                                                                        | 2,637    | 2,568       | 2,709        | 3,441                  | 1,313                  | <LOQ                    |
| 1,0<br>нмоль/<br>кг  | 9                          | 8,198                                                                        | 9,660    | 9,645       | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 10                         | 7,073                                                                        | 10,595   | 8,966       | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 11                         | 6,689                                                                        | 13,967   | 10,802      | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
| 3,0<br>нмоль/<br>кг  | 9                          | 20,802                                                                       | 26,329   | 27,863      | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 10                         | 23,563                                                                       | 32,020   | 41,576      | 1,168        | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 11                         | 21,704                                                                       | 30,101   | <LOQ        | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
| 10,0<br>нмоль/<br>кг | 9                          | 28,495                                                                       | 33,050   | <LOQ        | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 10                         | 70,779                                                                       | 112,898  | <LOQ        | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |
|                      | 11                         | 70,404                                                                       | 111,767  | 55,117      | <LOQ         | <LOQ                   | <LOQ                   | <LOQ                    |

Данные выражены в виде концентрации для каждого животного.

<LOQ=ниже предела количественного определения; LOQ=0,494 нМ

\*\* Значения на 3-й, 6-й, 9-й и 12-й дни непосредственно перед введением следующей дозы

**Таблица 50.** Конечные воздействия FP2 в сыворотке (нМ) у мышей DIO через 15 дней обработки по схеме q3d

| Группа лечения (нмоль/кг)  |       |      |      |        |
|----------------------------|-------|------|------|--------|
| Идентификатор<br>животного | 0,1   | 1,0  | 3,0  | 10,0   |
| 1                          | 2,567 | <LOQ | <LOQ | <LOQ   |
| 2                          | <LOQ  | <LOQ | <LOQ | 44,149 |
| 3                          | <LOQ  | <LOQ | <LOQ | <LOQ   |

|   |       |       |      |      |
|---|-------|-------|------|------|
| 4 | 1,144 | 0,678 | <LOQ | <LOQ |
| 5 | <LOQ  | <LOQ  | <LOQ | <LOQ |
| 6 | 3,440 | <LOQ  | <LOQ | <LOQ |
| 7 | 2,727 | <LOQ  | <LOQ | <LOQ |
| 8 | <LOQ  | <LOQ  | <LOQ | <LOQ |

Данные выражены в виде концентрации для каждого животного.

<LOQ=ниже предела количественного определения; LOQ=0,494 нМ

Пример 17. Фармакокинетика FP2 у различных видов животных и иммунный ответ  
[00315] Фармакокинетика у мышей

[00316] Фармакокинетические свойства FP2 оценивали посредством подкожного введения самкам мышей линии C57BL/6. FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам мышей линии C57BL/6 (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы 2,0 мг/кг в PBS (pH 7,3-7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 часов отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли способом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме представлены в таблицах 51 и 52 и показаны на Фиг. 25.

[00317] Фармакокинетический анализ показал, что конечный период полужизни FP2 у мышей линии C57BL/6 после внутривенного и подкожного введения составил ~1,51 и 1,76 дня соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила ~61%.

**Таблица 51.** Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) мышам линии C57BL/6

|                       | FP2, доза, подкожно |          |          |          |          |          |         |
|-----------------------|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| Момент<br>времен<br>и | Результа            | Результа | Результа | Результа | Результа | Средни   | Станд.  |
|                       | т                   | т        | т        | т        | т        | й        | откл.   |
|                       | животно             | животно  | животно  | животно  | животно  | результ  | откл.   |
|                       | го 31               | го 32    | го 33    | го 35    | го 36    | ат       | (нг/мл) |
|                       | (нг/мл)             | (нг/мл)  | (нг/мл)  | (нг/мл)  | (нг/мл)  | (нг/мл)  |         |
| 4 ч                   | 11310,11            | 6323,44  | 23489,21 | 4357,74  | 4835,54  | 10063,21 | 7995,0  |
| 24 ч                  | 12378,58            | 10896,80 | 17769,03 | 15928,14 | 15404,08 | 14475,33 | 2785,0  |
| 72 ч                  | 5127,95             | 5569,27  | 6727,37  | 7909,66  | 7550,32  | 6576,91  | 1210,5  |
| 96 ч                  | 3059,83             | 3350,25  | 4042,04  | 4095,15  | 4431,94  | 3795,84  | 569,0   |
| 168 ч                 | 784,61              | 1202,66  | 1364,68  | 1557,60  | 1678,02  | 1317,51  | 348,9   |

**Таблица 52.** Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения внутривенно (в/в) мышам линии C57BL/6

| Момент<br>времен<br>и | FP2, доза, внутривенно |                  |                  |                  |                  |               |                  |
|-----------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|------------------|
|                       | Результа<br>т          | Результа<br>т    | Результа<br>т    | Результа<br>т    | Результа<br>т    | Средни<br>й   | Станд.           |
|                       | животно<br>го 37       | животно<br>го 40 | животно<br>го 41 | животно<br>го 45 | животно<br>го 48 | результ<br>ат | откл.<br>(нг/мл) |
|                       | (нг/мл)                | (нг/мл)          | (нг/мл)          | (нг/мл)          | (нг/мл)          | (нг/мл)       |                  |
| 1 ч                   | 49573,59               | 42382,59         | 40001,18         | 43085,75         | 46443,59         | 44297,34      | 3742,9           |
| 24 ч                  | 22173,85               | 19120,39         | 19393,78         | 19798,29         | 17459,96         | 19589,25      | 1696,7           |
| 72 ч                  | 8334,33                | 7989,10          | 8573,44          | 9086,37          | 8186,68          | 8433,98       | 422,5            |
| 96 ч                  | 4478,83                | 4699,80          | 4749,93          | 5331,39          | 4579,08          | 4767,81       | 332,3            |
| 168 ч                 | 1044,24                | 1419,64          | 1393,44          | 1835,63          | 979,49           | 1334,49       | 343,6            |

**Таблица 53.** Фармакокинетические параметры FP2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг мышам линии C57BL/6

| Способ |             | $t_{1/2}$<br>(дни) | CL или<br>CL/F<br>(мл/день/<br>кг) | Vz или<br>Vz/F<br>(мл/кг) | $C_{max}$<br>(нг/мл) | $T_{max}^*$<br>(дни) | AUC <sub>0-last</sub><br>(дни*<br>нг/мл) | AUC <sub>0-inf</sub><br>(дни*<br>нг/мл) |
|--------|-------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| П/к    | Средне<br>е | 1,76               | 43                                 | 108                       | 15619                | 1                    | 44972                                    | 48379                                   |
|        | SD          | 0,16               | 8                                  | 20                        | 4870                 |                      | 8563                                     | 9147                                    |
| В/в    | Средне<br>е | 1,51               | 25                                 | 55                        | 44297                | 0,042                | 76269                                    | 79253                                   |
|        | SD          | 0,18               | 1                                  | 6                         | 3743                 |                      | 3788                                     | 4051                                    |

**[00318]** Фармакокинетика у крыс

**[00319]** FP2 вводили подкожно (n=5 проб на каждый момент времени) и внутривенно (n=5 проб на каждый момент времени) самкам крыс линии Спрег-Доули (Sage Laboratories, г. Сент-Луис, штат Миссури, США) при уровне дозы 2,0 мг/кг в PBS (pH 7,3-7,5). В последний момент времени отбирали пробы терминальной крови. В течение 168 часов отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства. Уровни FP2 измеряли способом иммуноанализа. Профили концентрации лекарственного средства в плазме представлены в таблицах 54 и 55 и показаны на Фиг. 26. Фармакокинетические параметры, рассчитанные на основании этих данных, представлены в таблице 56.

**[00320]** Фармакокинетический анализ FP2 у крыс линии Спрег-Доули показал, что конечный период полужизни после внутривенного и подкожного введения составил ~1,46 и 1,37 дня соответственно, а средняя биодоступность после подкожного введения составила

~28%.

**Таблица 54.** Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения подкожно (п/к) крысам линии Спрег-Доули

|                   | FP2, доза, подкожно |                 |                 |                 |                 |                                 |                            |
|-------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------|
| Момент<br>времени | Результат           | Результат       | Результат       | Результат       | Результат       | Средний<br>результат<br>(нг/мл) | Станд.<br>откл.<br>(нг/мл) |
|                   | животного           | животного       | животного       | животного       | животного       |                                 |                            |
|                   | о 01<br>(нг/мл)     | о 02<br>(нг/мл) | о 03<br>(нг/мл) | о 04<br>(нг/мл) | о 05<br>(нг/мл) |                                 |                            |
| 4 ч               | 730,95              | 257,94          | 469,95          | 496,34          | 400,65          | 471,16                          | 172,2                      |
| 24 ч              | 9236,27             | 6658,79         | 7728,92         | 7449,56         | 6502,60         | 7515,23                         | 1092,1                     |
| 72 ч              | 4559,04             | 4464,72         | 5619,82         | 4287,25         | 3844,15         | 4555,00                         | 655,6                      |
| 96 ч              | 2791,97             | 2452,35         | 3387,55         | 2316,06         | 2176,00         | 2624,79                         | 483,8                      |
| 168 ч             | 622,32              | 606,36          | <80,00          | 514,19          | 476,49          | 554,84                          | 70,7                       |

**Таблица 55.** Концентрация FP2 в сыворотке (нг/мл) после однократного введения внутривенно (в/в) крысам линии Спрег-Доули

|                   | FP2, доза, внутривенно |                 |                 |                 |                 |                                 |                            |  |
|-------------------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------------|--|
| Момент<br>времени | Результат              | Результат       | Результат       | Результат       | Результат       | Средний<br>результат<br>(нг/мл) | Станд.<br>откл.<br>(нг/мл) |  |
|                   | животного              | животного       | животного       | животного       | животного       |                                 |                            |  |
|                   | о 06<br>(нг/мл)        | о 07<br>(нг/мл) | о 08<br>(нг/мл) | о 09<br>(нг/мл) | о 10<br>(нг/мл) |                                 |                            |  |
| 1 ч               | 60785,80               | 47392,80        | 43046,54        | 46014,25        | 44547,65        | 48357,41                        | 7134,5                     |  |
| 24 ч              | 25470,36               | 24729,88        | 21157,29        | 20497,32        | 21459,71        | 22662,91                        | 2267,1                     |  |
| 72 ч              | 8208,46                | 9262,13         | 8866,76         | 8635,93         | 8843,83         | 8763,42                         | 384,1                      |  |
| 96 ч              | 4433,18                | 4833,22         | 4995,63         | 4630,60         | 4604,13         | 4699,35                         | 218,1                      |  |
| 168 ч             | 1083,14                | 1469,35         | 1614,61         | 1394,17         | 1053,89         | 1323,03                         | 245,7                      |  |

**Таблица 56.** Фармакокинетические параметры FP2 после введения внутривенно в дозе 2 мг/кг и подкожно в дозе 2 мг/кг крысам линии Спрег-Доули

| Способ |         | $t_{1/2}$<br>(дни) | CL или<br>CL/F<br>(мл/день/кг) | Vz или<br>Vz/F<br>(мл/кг) | $C_{max}$<br>(нг/мл) | $T_{max}^*$<br>(дни) | AUC <sub>0-last</sub><br>(день*<br>нг/мл) | AUC <sub>0-inf</sub><br>(день*<br>нг/мл) |
|--------|---------|--------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| П/к    | Среднее | 1,37               | 84                             | 165                       | 7515                 | 1                    | 22614                                     | 24036                                    |
|        | SD      | 0,04               | 10                             | 17                        | 1092                 |                      | 2509                                      | 2893                                     |
| В/в    | Среднее | 1,46               | 23                             | 49                        | 48357                | 0,042                | 83271                                     | 86089                                    |

|  |    |      |   |   |      |  |      |      |
|--|----|------|---|---|------|--|------|------|
|  | SD | 0,12 | 2 | 6 | 7135 |  | 6081 | 5820 |
|--|----|------|---|---|------|--|------|------|

**[00321]** Фармакокинетика у обезьян

**[00322]** FP2 вводили подкожно в дозе 1 мг/кг и внутривенно в дозе 1 мг/кг каждому из трех самцов яванского макака в PBS (pH 7,0-7,6). В течение 21 дня отбирали пробы крови, обрабатывали сыворотку и измеряли концентрации лекарственного средства.

**[00323]** Фармакокинетические (ФК) параметры FP2 характеризовали после введения яванским макакам однократной дозы внутривенно (1,0 мг/кг) и подкожно (1,0 мг/кг). Зависимость концентрации лекарственного средства в плазме от времени после введения подкожно по данным иммуноанализа и анализа ЖХМС представлена в таблицах 57 и 58 соответственно, а после введения внутривенно по данным иммуноанализа и анализа ЖХМС представлены в таблицах 59 и 60 соответственно. Данные иммуноанализа представлены на графике на Фиг. 27, а данные ЖХМС представлены на Фиг. 28.

**[00324]** Исходя из результатов иммуноанализа, среднее значение конечного периода полужизни ( $t_{1/2}$ ) FP2 после внутривенного и подкожного введения на основании NCA составило ~7,05 и ~8,51 дня соответственно. Средние ФК параметры после внутривенного и подкожного введения представлены в таблице 61. Исходя из результатов иммунологического биоанализа, среднее расчетное значение конечного периода полужизни ( $t_{1/2}$ ) FP2 после внутривенного и подкожного введения на основании модели без компартментов составило 7,05 и 8,51 дня соответственно. Средняя биодоступность ( $F\%$ ) FP2 у яванских макаков после подкожного введения согласно расчетам на основании  $AUC_{0-last}$  составила ~98,5%, а согласно расчетам на основании  $AUC_{0-inf}$  - ~109,2%.

**Таблица 57.** Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения подкожно, по данным иммуноанализа

| Иммуноанализ |                 |                 |                 |             |                 |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|
| Время (ч)    | Животное<br>704 | Животное<br>705 | Животное<br>706 | Средн., п/к | Станд.<br>откл. |
| 0            | <80,0           | <80,0           | <80,0           | <80,0       | Н/П             |
| 6            | 7365,3          | 6128,5          | 6056,9          | 6516,9      | 735,6           |
| 24           | 19716,8         | 10903,8         | 10554,7         | 13725,1     | 5191,9          |
| 48           | 18191,7         | 14353,7         | 14464,7         | 15670,0     | 2184,5          |
| 72           | 17813,9         | 14207,5         | 12684,0         | 14901,8     | 2634,5          |
| 120          | 13823,9         | 11445,8         | 10590,8         | 11953,5     | 1675,3          |
| 168          | 12359,6         | 10103,8         | 9467,8          | 10643,8     | 1519,7          |
| 240          | 9457,9          | 7642,6          | 8109,1          | 8403,2      | 942,7           |
| 336          | 6796,8          | 5679,8          | 5235,7          | 5904,1      | 804,3           |
| 432          | 5581,3          | 3830,6          | 3746,5          | 4386,1      | 1035,9          |
| 528          | 4126,2          | 2613,4          | 2879,3          | 3206,3      | 807,7           |



Н/П=не применимо

**Таблица 58.** Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения подкожно, по данным ЖХМС

| Время (ч) | ЖХ/МС           |                 |                 | Средн., п/к | SEM   |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-------|
|           | Животное<br>704 | Животное<br>705 | Животное<br>706 |             |       |
| 0         | <1000           | <1000           | <1000           | <1000       | Н/П   |
| 6         | 6110,0          | 5910            | 6200,0          | 6073,3      | 85,7  |
| 24        | #               | 10420,0         | 11300,0         | 10860,0     | 359,3 |
| 48        | 16560,0         | 13510,0         | 14960,0         | 15010,0     | 880,8 |
| 72        | 13690,0         | 13450,0         | 13380,0         | 13506,7     | 93,9  |
| 120       | 11040,0         | #               | #               | 11040,0     | Н/П   |
| 168       | #               | 8680,0          | 9400,0          | 9040,0      | 293,9 |
| 240       | 6940,0          | 7070,0          | 7140,0          | 7050,0      | 58,6  |
| 336       | 4400,0          | 4580,0          | 4430,0          | 4470,0      | 55,7  |
| 432       | -               | 2910,0          | -               | 2910,0      | Н/П   |
| 528       | <1000           | <1000           | <1000           | <1000       | Н/П   |

- = не удалось выполнить анализ в первый раз, пробы недостаточно для повторного анализа

# = неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа

Н/П=не применимо

**Таблица 59.** Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макаков после однократного введения внутривенно, по данным иммуноанализа

| Время (ч) | Иммуноанализ    |                 |                 | Средн., в/в | Станд. откл. |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|--------------|
|           | Животное<br>701 | Животное<br>702 | Животное<br>703 |             |              |
| 0         | <80,0           | <80,0           | <80,0           | <80,0       | Н/П          |
| 1         | 29938,3         | 31139,0         | 23545,3         | 28207,6     | 4082,0       |
| 6         | 24711,9         | 21173,0         | 20434,4         | 22106,4     | 2286,5       |
| 24        | 19648,4         | 21420,9         | 8662,7          | 16577,3     | 6911,3       |
| 48        | 17790,1         | 17107,0         | 12983,1         | 15960,0     | 2600,7       |
| 72        | 17889,4         | 13871,1         | 13692,4         | 15151,0     | 2373,3       |
| 120       | 15298,6         | 11982,5         | 11361,5         | 12880,9     | 2116,7       |
| 168       | 11752,0         | 10982,8         | 9933,8          | 10889,5     | 912,7        |
| 240       | 8921,1          | 7465,0          | 6733,4          | 7706,5      | 1113,6       |

|            |        |        |        |        |        |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>336</b> | 6572,8 | 5750,5 | 4687,6 | 5670,3 | 945,1  |
| <b>432</b> | 1099,6 | 3425,0 | 3458,0 | 2660,9 | 1352,2 |
| <b>528</b> | <80,0  | 2069,0 | 2416,2 | 2242,6 | Н/П    |

Н/П=не применимо

**Таблица 60.** Концентрация FP2 в плазме (нг/мл) у яванских макак после однократного введения внутривенно, по данным ЖХМС

| <b>ЖХ/МС</b>     |                         |                         |                         |                    |            |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|------------|
| <b>Время (ч)</b> | <b>Животное<br/>701</b> | <b>Животное<br/>702</b> | <b>Животное<br/>703</b> | <b>Средн., в/в</b> | <b>SEM</b> |
| <b>0</b>         | <1000                   | <1000                   | <1000                   | <1000              | Н/П        |
| <b>1</b>         | 25340,0                 | 28820                   | 26220,0                 | 26793,3            | 1044,7     |
| <b>6</b>         | 24610,0                 | 26340,0                 | 23810,0                 | 24920,0            | 746,6      |
| <b>24</b>        | 18410,0                 | 18680,0                 | 9810,0                  | 15633,3            | 2912,7     |
| <b>48</b>        | 16290,0                 | 17370,0                 | 13840,0                 | 15833,3            | 1044,3     |
| <b>72</b>        | 15430,0                 | 14920,0                 | 14280,0                 | 14876,7            | 332,7      |
| <b>120</b>       | 11180,0                 | 11480,0                 | 11440,0                 | 11366,7            | 94,0       |
| <b>168</b>       | 9170,0                  | #                       | #                       | 9170,0             | Н/П        |
| <b>240</b>       | 6800,0                  | 7380,0                  | 7600,0                  | 7260,0             | 238,6      |
| <b>336</b>       | 2870,0                  | 3860,0                  | 3480,0                  | 3403,3             | 288,3      |
| <b>432</b>       | -                       | -                       | 3030,0                  | 3030,0             | Н/П        |
| <b>528</b>       | 1150,0                  | 1680,0                  | 1400,0                  | 1410,0             | 153,1      |

- = не удалось выполнить анализ в первый раз, пробы недостаточно для повторного анализа

Н/П=не применимо

# = неправильно маркированная пробирка, проба исключена из анализа

**Таблица 61.** Среднее значение ( $\pm$  CO) фармакокинетических параметров FP2 после внутривенного и подкожного введения яванским макакам в дозе 1 мг/кг

| <b>Способ</b> |                | <b>t<sub>1/2</sub><br/>(дни)</b> | <b>CL или<br/>CL/F<br/>(мл/день/<br/>кг)</b> | <b>Vz или<br/>Vz/F<br/>(мл/кг)</b> | <b>C<sub>max</sub><br/>(нг/мл)</b> | <b>T<sub>max</sub>*<br/>(дни)</b> | <b>AUC<sub>0-last</sub><br/>(день*нг/мл)</b> | <b>AUC<sub>0-inf</sub><br/>(день*нг/мл)</b> |
|---------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>П/к</b>    | <b>Среднее</b> | 8,51                             | 4,6                                          | 56                                 | 16178                              | 1,67                              | 180792                                       | 221032                                      |
|               | <b>SD</b>      | 1,28                             | 0,8                                          | 7                                  | 3065                               |                                   | 29990                                        | 44931                                       |
| <b>В/в</b>    | <b>Средн</b>   | 7,05                             | 4,9                                          | 51                                 | 28208                              | 0,042                             | 183468                                       | 202380                                      |

|  |    |      |     |    |      |  |       |      |
|--|----|------|-----|----|------|--|-------|------|
|  | ee |      |     |    |      |  |       |      |
|  | SD | 1,45 | 0,2 | 12 | 4082 |  | 18268 | 9617 |

ФК параметры представляют собой средние значения ФК по данным иммуноанализа на основании NCA.

\* Tmax (медиана)

**[00325]** Анализ стабильности в человеческой плазме

**[00326]** Стабильность FP2 исследовали в свежей гепаринизированной плазме *ex vivo* при 37 °C в течение периода до 48 часов. Свежую незамороженную человеческую плазму получали из гепаринизированной крови двух субъектов (одного мужчины и одной женщины) посредством центрифугирования. FP2 инкубировали в этой матрице при температуре 37 °C с осторожным перемешиванием в течение 0, 4, 24 и 48 часов. Концентрацию FP2 определяли способом иммуноанализа. Количественное определение концентрации интактного димера в этой матрице при условиях анализа проводили способом независимого иммуноаффинного захвата с последующей ЖХМС.

**[00327]** По данным способа иммуноанализа, коэффициент извлечения в процентах относительно исходной концентрации варьировал в диапазоне от 104,8 до 94,1 и не уменьшался с течением времени, и это демонстрирует, что FP2 стабилен в человеческой плазме *ex vivo* в течение периода до 48 часов (Фиг. 29 и таблица 62). По данным способа ЖХМС, концентрация оставалась стабильной во времени, и это демонстрирует, что FP2 остается в человеческой плазме *ex vivo* в виде интактного димера в течение периода до 48 часов (Фиг. 30 и таблица 63).

**Таблица 62.** Стабильность FP2 в человеческой плазме *ex vivo* (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, по данным иммуноанализа

| Композиция | Пол  | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | Нормализованное извлечение в процентах |
|------------|------|-----------|----------------------|----------------------------------------|
| FP2        | Жен. | 0         | 9104                 | 100,0                                  |
|            |      | 4         | 9056                 | 99,5                                   |
|            |      | 24        | 9332                 | 102,5                                  |
|            |      | 48        | 9374                 | 103,0                                  |
|            | Муж. | 0         | 9473                 | 100,0                                  |
|            |      | 4         | 9929                 | 104,8                                  |
|            |      | 24        | 9081                 | 95,9                                   |
|            |      | 48        | 8912                 | 94,1                                   |

**Таблица 63.** Стабильность FP2 в человеческой плазме *ex vivo* (нг/мл) (нормализованное извлечение в процентах) в течение 48 часов, по данным интактной ЖХ/МС

| Композиция | Пол  | Время (ч) | Концентрация (нг/мл) | Нормализованное извлечение в процентах |
|------------|------|-----------|----------------------|----------------------------------------|
| FP2        | Жен. | 0         | 11090                | 100,0                                  |
|            |      | 4         | 10830                | 97,7                                   |
|            |      | 24        | 10500                | 94,7                                   |
|            |      | 48        | 10030                | 90,4                                   |
|            | Муж. | 0         | 10760                | 100,0                                  |
|            |      | 4         | 9640                 | 89,6                                   |
|            |      | 24        | 10190                | 94,7                                   |
|            |      | 48        | 8500                 | 79,0                                   |

Пример 18. Эффективность однократной дозы FP1 и FP2 у яванских макак

**[00328]** Оценивали влияние FP1 и FP2 на потребление пищи и массу тела после введения однократной дозы у новых яванских макак.

**[00329]** FP1 подкожно вводили группе новых яванских макак в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включали группу, получавшую носитель. Животным вводили композицию по слепому методу. Исследование продолжалось в целом в течение 6 недель: в течение 2 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные и в течение 4 недель собирали данные после однократного введения композиции. Воздействия лекарственного препарата в плазме измеряли на 1-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после введения.

**[00330]** Обработка яванских макаков однократной дозой FP1 приводила к снижению потребления пищи и массы тела по сравнению с обработкой носителем (Фиг. 31-32). Значимое снижение суточного потребления пищи наблюдали на 4-й, 5-й, 6-й и 8-12-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 31). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 2-й неделе после введения при уровне дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг наблюдали значимое процентное снижение среднего потребления пищи за неделю на 2-й неделе после введения дозы по сравнению с потреблением до введения дозы, а при уровне дозы 10 нмоль/кг наблюдали значимое процентное снижение среднего потребления пищи за неделю на 1-й и 2-й неделях после введения дозы по сравнению с потреблением до введения дозы. Значимое процентное снижение массы тела по сравнению с 0-м днем наблюдали на 28-й день при уровне дозы 3 нмоль/кг и на 14-й, 21-й и 28-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 32).

**[00331]** FP2 подкожно вводили когорте интактных яванских макак в трех разных уровнях доз: 1, 3 и 10 нмоль/кг. Также в исследование включали группу, получавшую носитель. Животным вводили композицию по слепому методу. Исследование продолжалось в целом в течение 11 недель: в течение 5 недель измеряли исходные уровни потребления пищи и собирали данные, в течение 1 недели проводили обработку и в течение 5 недель собирали данные о стадии выведения. Воздействия лекарственного средства в

плазме измеряли на 1-й, 7-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й дни после введения.

**[00332]** Обработка яванских макаков однократной дозой FP2 приводила к снижению потребления пищи и массы тела по сравнению с обработкой носителем (Фиг. 33-34). Значительное снижение суточного потребления пищи наблюдали на 3-й, 5-8-й, 10-й и 12-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг и на 3-38-й и 40-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 33). Среднее суточное потребление пищи за неделю значительно снизилось на 1-й неделе после введения дозы 3 нмоль/кг и значительно снизилось на 1-6-й неделях после введения дозы 10 нмоль/кг. При уровне дозы 3 нмоль/кг наблюдали значимое процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 2-й неделе после введения дозы по сравнению с потреблением до введения дозы, а при уровне дозы 10 нмоль/кг наблюдали значимое процентное снижение среднего суточного потребления пищи за неделю на 1-6-й неделях после введения дозы по сравнению с потреблением до введения дозы. Значимое процентное изменение массы тела по сравнению с 0-м днем наблюдали на 21-42-й дни при уровне дозы 1 нмоль/кг, на 14-42-й дни при уровне дозы 3 нмоль/кг и на 7-42-й дни при уровне дозы 10 нмоль/кг (Фиг. 33).

Пример 19. Эффективность многократных доз FP2 у яванских макаков

**[00333]** Эффективность FP2 оценивали, выполняя подкожные инъекции один раз в неделю в группе интактных яванских макаков со спонтанно развившимся избыточным весом (в возрасте от 8 до 20 лет и с массой тела от 8,0 до 11,9 кг) при 3 уровнях дозы: 0,3, 1 и 10 нмоль/кг. Потребление пищи измеряли ежедневно, массу тела измеряли еженедельно и клиническую оценку животных выполняли ежедневно. Лечение яванских макаков с избыточным весом 12 еженедельными дозами FP2 приводило к снижению потребления пищи (Фиг. 35) и массы тела (Фиг. 36) по сравнению с обработкой носителем. Концентрацию циркулирующего FP2 определяли методом иммуноанализа (Фиг. 37). Наблюдали снижение воздействия FP2 у некоторых животных в более поздние моменты времени, предположительно из-за выработки антител к лекарственному средству (ADA): на фигурах показаны данные, собранные до момента снижения воздействия (определяемое как снижение остаточной концентрации лекарственного средства в сыворотке на  $\geq 40\%$  по сравнению с предыдущим измерением у того же животного). На протяжении всего исследования не было обнаружено связанных с обработкой нежелательных эффектов.

Пример 20. Термостабильность линкера

**[00334]** Исследовали термостабильность различных линкеров, соединяющих HSA и GDF15. Для оценки способности к фрагментированию и образованию агрегатов гибридные белки HSA-GDF15 с различными линкерами разводили до концентрации 10 мг/мл. После добавления ЭДТА и метионина пробы инкубировали при температуре 40 °C в течение 14 дней. Затем пробы разводили до концентрации 1 мг/мл и оценивали методом эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ). В этих белках количественно определяли процентное содержание интактного белка, а также фрагментов и агрегатов. В таблице 64 показано, что белки HSA-GDF15 с линкерами, состоящими из повторов AP, наиболее устойчивы к фрагментированию в условиях

теплового стресса.

**[00335]** Чтобы оценить, влияют ли эти линкеры на взаимодействие GDF15 с его рецептором, проводили иммунный анализ, при котором на планшет наносили гибридный белок GFRAL-Fc и определяли анти-GDF15 или анти-HSA с использованием моноклональных антител к GDF15 (Janssen) и к HSA (Kerafast, Inc., г. Бостон, штат Массачусетс, США). Анализ показал, что все эти варианты линкеров, представленные в таблице 66, связываются с рецептором аналогичным образом.

Таблица 64. Результаты эксклюзионной/высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ) после теплового стресса в течение 14 дней

| SEQ ID NO | Линкер                                 | Агрегаты (%) | Интактные (%) | Фрагменты (%) |
|-----------|----------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| 113       | GS(GGGGS) <sub>8</sub>                 | 3,33         | 84,44         | 12,22         |
| 115       | GA(GGGGA) <sub>8</sub>                 | 3,51         | 87,98         | 8,5           |
| 117       | (AP) <sub>10</sub>                     | 1,64         | 98,36         | 0             |
| 119       | (AP) <sub>12</sub>                     | 2,36         | 97,64         | 0             |
| 121       | GGs-(EGKSSGSGSESKST) <sub>3</sub> -GGs | 1,67         | 85,24         | 13,09         |
| 123       | GS(PGGGS) <sub>8</sub>                 | 2,96         | 88,12         | 8,91          |
| 125       | GS(AGGGGS) <sub>8</sub>                | 3,44         | 86,22         | 10,34         |
| 127       | GGs-(EGKSSGSGSESKST) <sub>2</sub> -GGs | 1,71         | 91,17         | 7,12          |

Пример 21. Протокол клинического исследования

**[00336]** Двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование однократных нарастающих доз по оценке безопасности, переносимости, фармакокинетики (включая абсолютную биодоступность), а также иммуногенности FP2 при подкожном введении здоровым субъектам, но с избыточным весом

**[00337]** Протокол 64739090EDI1001; Фаза 1

**[00338]** HOMER EudraCT: 2018-000324-34

Сокращения

ADA                      антитела к лекарственному средству

АЛТ                      аланинаминотрансфераза

Анти-ВГС              антитело к вирусу гепатита С

АСТ                      аспартатаминотрансфераза

AUC                      площадь под кривой

BA                        биодоступность

BLQ                      ниже наименьшей поддающейся количественному определению концентрации

|                  |                                                                                              |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| ИМТ              | индекс массы тела                                                                            |
| АД               | артериальное давление                                                                        |
| Уд./мин          | число ударов в минуту                                                                        |
| АМК              | азот мочевины крови                                                                          |
| BW               | масса тела                                                                                   |
| ЦНС              | центральная нервная система                                                                  |
| CRF              | индивидуальная регистрационная карта (в этом исследовании - электронная)                     |
| CRU              | отделение клинических исследований                                                           |
| СС               | сердечно-сосудистый                                                                          |
| DCF              | форма уточнения данных                                                                       |
| DG               | дозовая группа                                                                               |
| DIO              | алиментарное ожирение                                                                        |
| DRC              | Комиссия по анализу данных                                                                   |
| DSM-V            | Руководство по диагностике и статистическому учету психических расстройств (5-е издание)     |
| EC <sub>50</sub> | полумаксимальная эффективная концентрация                                                    |
| ЭКГ              | электрокардиограмма                                                                          |
| eCRF             | электронная индивидуальная регистрационная карта                                             |
| EDC              | электронная система регистрации данных                                                       |
| EMA              | Европейское агентство по лекарственным средствам                                             |
| ЕС               | Европейский союз                                                                             |
| FcRn             | неонатальный Fc-рецептор                                                                     |
| FDA              | Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США |
| FIN              | первое применение у человека                                                                 |

|       |                                                                            |
|-------|----------------------------------------------------------------------------|
| ФСГ   | фолликулостимулирующий гормон                                              |
| GCP   | надлежащая клиническая практика                                            |
| GDF15 | ростовой фактор дифференцировки 15                                         |
| GFRAL | рецептор семейства факторов GDNF, подобный альфа-рецептору, рецептор GDF15 |
| ГТТ   | гамма-глутамилтрансфераза                                                  |
| GLP   | надлежащие лабораторные практики                                           |
| НА    | орган здравоохранения                                                      |
| HbA1c | гемоглобин A1c                                                             |
| HBsAg | поверхностный антиген вируса гепатита В                                    |
| ХГЧ   | хорионический гонадотропин человека                                        |
| ВГС   | вирус гепатита С                                                           |
| ЛПВП  | липопротеин высокой плотности                                              |
| НED   | эквивалентная человеческая доза                                            |
| ВИЧ   | вирус иммунодефицита человека                                              |
| ЧСС   | частота сердечных сокращений                                               |
| HSA   | человеческий сывороточный альбумин                                         |
| IAC   | Комитет по промежуточному анализу                                          |
| IB    | Брошюра исследователя                                                      |
| ICF   | форма информированного согласия                                            |
| ICH   | Международная конференция по гармонизации                                  |
| IEC   | Независимый комитет по этике                                               |
| IMP   | экспериментальный лекарственный препарат                                   |
| IRB   | Экспертный совет организации                                               |
| в/в   | внутривенно                                                                |
| IVRS  | интерактивная система голосового ответа                                    |



|         |                                                                                                                            |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IWRS    | интерактивная система веб-ответа                                                                                           |
| ЖХМС/MC | жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия                                                             |
| ЛПНП    | липопротеин низкой плотности                                                                                               |
| LLOQ    | нижний предел количественного обнаружения                                                                                  |
| MABEL   | минимальный ожидаемый уровень биологического эффекта                                                                       |
| MedDRA  | Медицинский словарь для регуляторной деятельности                                                                          |
| MRSD    | максимальная рекомендованная начальная доза                                                                                |
| MRU     | использование медицинских ресурсов                                                                                         |
| n       | число (размер подвыборки)                                                                                                  |
| N       | число (общий размер выборки)                                                                                               |
| NAb     | нейтрализующие антитела                                                                                                    |
| NAFLD   | неалкогольная жировая дистрофия печени                                                                                     |
| NASH    | неалкогольный стеатогепатит                                                                                                |
| NBE     | новое биологическое соединение                                                                                             |
| NOAEL   | доза без наблюдаемых нежелательных эффектов                                                                                |
| PAD     | фармакологически активная доза                                                                                             |
| PAP     | мазок по Папаниколау                                                                                                       |
| ФД      | фармакодинамика                                                                                                            |
| PI      | главный исследователь                                                                                                      |
| ФК      | фармакокинетика                                                                                                            |
| PQC     | претензия к качеству препарата                                                                                             |
| PRO     | сообщаемый пациентом результат лечения (в бумажной или электронной форме в зависимости от требований данного исследования) |
| ПСА     | простат-специфический антиген                                                                                              |
| QEW-5   | анкета по оценке особенностей диеты и массы тела-5                                                                         |

|       |                                                               |
|-------|---------------------------------------------------------------|
| RBC   | эритроцит                                                     |
| RET   | корцептор GFRA1-сигнализации                                  |
| SAD   | однократная нарастающая доза                                  |
| CHЯ   | серьезное нежелательное явление                               |
| SBP   | систолическое артериальное давление                           |
| п/к   | подкожное введение                                            |
| SD    | Спрег-Доули                                                   |
| SUSAR | предполагаемая непредвиденная серьезная нежелательная реакция |
| T2DM  | сахарный диабет 2 типа                                        |
| TEAE  | возникшее в процессе лечения нежелательное явление            |
| TK    | токсикокинетика                                               |
| TTG   | тиреотропный гормон                                           |
| BГН   | верхняя граница нормы                                         |
| США   | Соединенные Штаты Америки                                     |
| VAS   | визуальная аналоговая шкала                                   |
| WBC   | лейкоцит                                                      |

### 1. График мероприятий - период скрининга и нахождения пациента в исследовательском центре

[illegible]

|                                                                                                                 |                                  |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--|
| Поступление в CRU                                                                                               |                                  | X                           |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Нахождение в CRU                                                                                                |                                  | X                           | X                    | X-----X          |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Выписка из CRU                                                                                                  |                                  |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 | X               |  |
| Амбулаторное посещение                                                                                          | X                                |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| <b>Введение исследуемого лекарственного средства</b>                                                            |                                  |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Рандомизация <sup>g</sup>                                                                                       |                                  |                             |                      | X                |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Введение исследуемого лекарственного средства <sup>h</sup>                                                      |                                  |                             |                      |                  | X        |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| <b>Оценки безопасности</b>                                                                                      |                                  |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Полный физический осмотр                                                                                        | X                                |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Краткий физический осмотр                                                                                       |                                  | X                           |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 | X               |  |
| Рост                                                                                                            | X                                |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
| Температура тела (тимпаническая)                                                                                | X                                |                             | X                    | X                |          |             |             |             |             |             |             |              | X               |              |              | X               | X               | X               |  |
| Основные показатели жизнедеятельности<br>(артериальное давление и частота сердечных<br>сокращений) <sup>1</sup> | X                                |                             | X                    | X                |          | X           | X           | X           | X           | X           | X           | X            | X               | X            | X            | X               | X               | X               |  |
| <b>Период исследования</b>                                                                                      | <b>Части 1 и 2<sup>a</sup></b>   |                             |                      |                  |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
|                                                                                                                 | <b>Скрининг</b>                  | <b>Исходный<br/>уровень</b> |                      | <b>Стационар</b> |          |             |             |             |             |             |             |              |                 |              |              |                 |                 |                 |  |
|                                                                                                                 | <b>С -28-го до<br/>-3-го дня</b> | <b>-2-й<br/>день</b>        | <b>-1-й<br/>день</b> | <b>1-й день</b>  |          |             |             |             |             |             |             |              | <b>2-й день</b> |              |              | <b>3-й день</b> | <b>4-й день</b> | <b>5-й день</b> |  |
| <b>До введения дозы или часы относительно введения<br/>дозы исследуемого лекарственного средства</b>            |                                  |                             |                      | <b>До</b>        | <b>0</b> | <b>+0,5</b> | <b>+1 ч</b> | <b>+2 ч</b> | <b>+4 ч</b> | <b>+6 ч</b> | <b>+8 ч</b> | <b>+12 ч</b> | <b>+24 ч</b>    | <b>+30 ч</b> | <b>+36 ч</b> | <b>+48 ч</b>    | <b>+72 ч</b>    | <b>+96 ч</b>    |  |

|                                                                                   |   |   |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---|---|-----------------|---------|--|----------------|---|---|---|---|---|---|---|--|--|---|---|---|
| Непрерывный мониторинг ЭКГ во II отведении <sup>j</sup>                           |   |   |                 | X-----X |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| ЭКГ в 12 отведениях <sup>k, l</sup>                                               | X |   | X <sup>l</sup>  | X       |  |                | X | X | X |   | X | X | X |  |  | X | X | X |
| Фармакодинамические оценки                                                        |   |   |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Масса тела <sup>m</sup>                                                           | X |   | X               | X       |  |                |   |   |   |   |   |   | X |  |  | X | X | X |
| Анкетирование по VAS <sup>o</sup>                                                 |   |   | X-----<br>----X |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Стандартизованные приемы пищи для 24-часовой оценки потребления пищи <sup>o</sup> |   |   | X               |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  | X |   |   |
| Клинические лабораторные исследования                                             |   |   |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Тест на беременность <sup>p</sup>                                                 | X | X |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Гематология, биохимия <sup>e</sup>                                                | X | X |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   | X |  |  | X |   | X |
| Липидная панель (общий холестерин, триглицериды, ЛПВП и ЛПНП) <sup>e</sup>        | X | X |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  | X |   | X |
| Коагуляционная панель <sup>e</sup>                                                | X | X |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   | X |  |  | X |   | X |
| Общий анализ мочи <sup>e</sup>                                                    | X | X |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   | X |  |  | X |   | X |
| Поисковые биомаркеры                                                              |   |   |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Взятие пробы крови для анализа поисковых биомаркеров <sup>q</sup>                 |   | X | X               | X       |  |                |   |   |   |   |   |   | X |  |  |   |   | X |
| Процедуры оценки фармакокинетики и иммуногенности                                 |   |   |                 |         |  |                |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |   |   |
| Взятие пробы крови для фармакокинетического (ФК) анализа <sup>r, q</sup>          |   |   |                 | X       |  | X <sup>s</sup> | X | X | X | X | X | X | X |  |  | X | X | X |

|                                                                                                  |                                |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Взятие пробы крови на антитела к лекарственному средству (ADA) <sup>q</sup>                      |                                |                         |                  | X                |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| <b>Необязательное взятие пробы крови для фармакогеномного анализа</b>                            |                                |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| Взятие пробы крови для анализа ДНК <sup>t, q</sup>                                               |                                |                         |                  | X                |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| <b>Текущие оценки безопасности субъекта</b>                                                      |                                |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| Отчет о нежелательных явлениях и сопутствующих лекарственных средствах <sup>u</sup>              | X ----- X                      |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| Нежелательное явление (непрямые вопросы) <sup>u</sup>                                            |                                |                         | X                | X                |          |             |             |             | X           |             | X           | X               | X            | X               | X               | X               | X            |
| Оценка переносимости в месте введения - местная инъекция                                         |                                |                         |                  | X                |          |             | X           |             | X           | X           |             | X               | X            |                 |                 | X               | X            |
| <b>Период исследования</b>                                                                       | <b>Части 1 и 2<sup>a</sup></b> |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
|                                                                                                  | <b>Скрининг</b>                | <b>Исходный уровень</b> |                  | <b>Стационар</b> |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| <b>День</b>                                                                                      | <b>С -28-го до -3-го дня</b>   | <b>-2-й день</b>        | <b>-1-й день</b> | <b>1-й день</b>  |          |             |             |             |             |             |             | <b>2-й день</b> |              | <b>3-й день</b> | <b>4-й день</b> | <b>5-й день</b> |              |
| <b>До введения дозы или часы относительно введения дозы исследуемого лекарственного средства</b> |                                |                         |                  | <b>До</b>        | <b>0</b> | <b>+0,5</b> | <b>+1 ч</b> | <b>+2 ч</b> | <b>+4 ч</b> | <b>+6 ч</b> | <b>+8 ч</b> | <b>+12 ч</b>    | <b>+24 ч</b> | <b>+30 ч</b>    | <b>+36 ч</b>    | <b>+48 ч</b>    | <b>+72 ч</b> |
| Оценка участка (часть 1) <sup>v</sup>                                                            |                                |                         |                  |                  |          |             |             |             |             |             |             |                 |              |                 |                 |                 |              |
| Аллергические реакции/генерализованные реакции гиперчувствительности <sup>w</sup>                |                                |                         |                  | X                |          |             | X           |             | X           | X           |             | X               | X            |                 |                 | X               | X            |

**а. Часть 1:** двойная слепая; будет состоять максимум из 7 дозовых групп.

**Часть 2:** открытая и будет состоять из одной дозовой группы.

**b. Скрининг:** процедуры должны быть проведены в течение 4 недель (28 дней) перед введением исследуемого лекарственного средства в 1-й день.

**c. Информированное согласие:** необходимо получить перед началом любой связанной с исследованием процедуры.

**d. Критерии включения/исключения:** минимальные критерии для наличия документации, подтверждающей критерии пригодности для участия в исследовании, описаны в разделе 4 «Оценка популяции субъектов, пригодных к участию в исследовании» и будут подтверждены после анализа результатов исследований, выполненных на исходном уровне перед введением дозы.

e. См. перечень клинико-лабораторных исследований, которые будут проведены, в примере 21, раздел 9.6.2 «Клинико-лабораторные исследования»; забор крови у субъектов выполняется натощак (т. е. субъектам запрещено употреблять пищу или напитки [кроме воды] в течение по меньшей мере 10 часов до забора крови). Клинико-лабораторные исследования на исходном уровне могут быть выполнены в -2-й день или -1-й день при условии, что результаты будут доступны для оценки перед рандомизацией и введением дозы в 1-й день.

f. Необходимо получить только у всех субъектов женского пола.

**g. Рандомизация** будет проведена в 1-й день после выполнения всех исследований в -2-й день и -1-й день, анализа и проверки для подтверждения того, что субъект соответствует всем критериям включения и не соответствует критериям исключения (например, результаты лабораторных исследований, ЭКГ и т. д.).

**h. Часть 1.** Увеличение дозы/подкожное (п/к) введение дозы: субъекты получают однократную дозу FP2 или плацебо (максимальный объем 2 мл). **Часть 2:** Субъекты получают однократную в/в инфузию FP2 в течение 30 минут (с постоянной скоростью). Все субъекты в частях 1 и 2 должны будут голодать в течение ночи (по меньшей мере 10 часов) перед введением дозы и 3 часа после введения дозы. Время 0 для части 1 представляет собой время п/к инъекции исследуемого лекарственного средства, а для части 2 представляет собой время начала в/в инфузии исследуемого лекарственного средства.

**i. Основные показатели жизнедеятельности** следует измерять через 5 минут отдыха в положении лежа на спине, и они включают частоту сердечных сокращений (ЧСС) в состоянии покоя и артериальное давление (АД). Если забор крови или измерение основных показателей жизнедеятельности запланировано в тот же момент времени, что и регистрация ЭКГ, процедуры следует выполнять в следующем порядке: основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, ФК, забор крови для анализа безопасности или поискового биомаркера. Измерения следует проводить с помощью полностью автоматизированного устройства измерения артериального давления. Во все моменты времени будут выполнять однократное измерение и регистрацию кровяного давления и ЧСС.

**j. Непрерывный мониторинг ЭКГ во II отведении** будет проводиться только в части 2, и его следует начинать в 1-й день за 30 минут до начала в/в инфузии и заканчивать через 2 часа после завершения инфузии. На усмотрение исследователя продолжительность контроля сердечной деятельности может быть увеличена.

**к. ЭКГ в 12 отведениях:** все ЭКГ, за исключением скрининговой, будут регистрироваться по три раза. Субъекты должны находиться в покое в положении лежа на спине по меньшей мере 5 минут в спокойной обстановке без отвлекающих факторов (например, телевизор, сотовые телефоны) и не должны разговаривать или двигать руками или ногами. Три повторяющихся ЭКГ следует регистрировать с интервалом менее 2 минут в каждый момент времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени исследования, что и анализ ФК пробы, ФК пробу следует отбирать сразу же после ЭКГ.

ЭКГ в 12 отведениях в -1-й день должны совпадать по времени (выполняться в то же время) с ЭКГ в 12 отведениях, запланированными на 1-й день (т. е. перед введением дозы, через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после введения дозы).

**м. Масса тела:** будет измерена перед утренним приемом пищи и после мочеиспускания в -1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни и перед введением дозы в 1-й день после мочеиспускания. Массу тела следует измерять два раза. Субъектов следует взвешивать на калиброванных весах в больничной рубашке без обуви.

**п. Процедуры** перед введением дозы должны быть выполнены в течение 30 минут перед введением исследуемого лекарственного средства.

**о.** Подробное описание оценки потребления пищи за 24 часа и времени анкетирования по VAS см. в графике «Время приема пищи и анкетирования по VAS» раздела 9.3 «Фармакодинамические исследования» в примере 21.

**р.** При скрининге всем женщинам требуется выполнить анализ сыворотки на беременность. Анализ мочи на беременность может быть выполнен во все остальные моменты времени.

**q.** См. лабораторное руководство в отношении процедур сбора проб и инструкций по обработке.

**г. Фармакокинетические исследования:** Все заборы крови для ФК анализа следует проводить как можно ближе к указанному в графике моменту времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени образец для ФК анализа следует брать сразу же после завершения ЭКГ. В части 2 (в/в инфузия) все моменты времени забора относятся к концу инфузии. Время забора проб для фармакокинетического анализа может быть изменено (но дополнительные пробы не будут собираться), если это требуется по предварительным ФК данным, полученным при исследовании предыдущей (-их) дозы (доз).

**s.** Момент времени 0,5 ( $= t_0$  (конец инфузии) применим только к в/в введению в части 2.



t. Пробу для фармакогеномного анализа (ДНК) необходимо собирать в установленный момент времени, однако при необходимости ее можно собирать и в более поздний момент времени без отклонения от протокола.

и. Нежелательные явления и сопутствующие лекарственные средства будут регистрироваться, начиная с момента подписания информированного согласия и до выполнения последней процедуры исследования во время завершающего посещения. Кроме того, в течение всего исследования будут проводиться опросы на предмет нежелательных явлений (с использованием не прямых вопросов) в установленные моменты времени.

v. Инструкции по составлению отчетов по токсичности при местных реакциях в участке инъекции см. в таблице 70 раздела 9.6.8 «Местная реакция в участке инъекции» в примере 21.

в. Инструкции по лечению аллергических реакций и/или реакций гиперчувствительности см. в разделе 9.6.7 «Аллергические реакции/общие реакции гиперчувствительности» примера 21.

## 1. График мероприятий - прием пищи и анкетирование по VAS

[illegible]

|                                                                                                  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Анкетирование по VAS для оценки аппетита в -1-й и 3-й дни <sup>h</sup>                           | X |   | X | X | X | X | X | X |   | X | X | X | X | X |   | X | X | X | X | X |   | X |
| Анкетирование по VAS для оценки аппетита в 1-й, 2-й, 4-й и 5-й дни <sup>h, i</sup>               | X |   | X |   |   | X |   | X |   | X | X |   |   | X |   | X |   |   | X | X |   | X |
| Анкетирование по VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи с -1-го по 5-й день <sup>j</sup> |   | X |   |   |   |   |   |   | X |   |   |   |   |   | X |   |   |   |   |   | X |   |

a. Время при необходимости можно скорректировать на  $\pm 15$  минут.

b. Время 0 относится к началу завтрака в -1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни и к началу первого приема пищи после введения дозы в 1-й день.

c. Все субъекты должны принимать пищу в одно и то же время ( $\pm 15$  минут) во все дни. Время приема пищи установлено, чтобы избежать перекрытия с измерениями ЭКГ в -1-й день, и оно было рассчитано с учетом того, что ЭКГ будут регистрировать до 7 часов утра, а впоследствии либо в 08:00, 09:00, 11:00, 15:00 и 19:00 (если введение дозы в 1-й день происходит в 07:00), либо в 10:00, 11:00, 13:00, 17:00 и 21:00 (если введение дозы в 1-й день происходит в 09:00).

d. Завтрак, обед, полдник и ужин должны быть идентичными в -1-й и 3-й дни и должны отличаться от приемов пищи, назначенных в остальные дни.

e. В -1-й и 3-й дни субъекты должны быть визуально изолированы друг от друга для принятия пищи, чтобы избежать влияния других субъектов.

f. В -1-й и 3-й дни каждый прием пищи должен осуществляться в течение 30 минут, и субъекты должны предупреждать персонал исследования, если прием пищи длился меньше 30 минут. Время начала и завершения приема пищи должно быть зарегистрировано.

g. В -1-й и 3-й дни каждый элемент каждого приема пищи должен быть взвешен до и после приема, а потребленное количество должно быть зарегистрировано для последующего подсчета калорийности.

h. Анкетирование по VAS для оценки аппетита следует проводить непосредственно перед и в конце каждого приема пищи, каждый час в -1-й и 3-й дни и каждые 3 часа в 1-й, 2-й, 4-й и 5-й дни. Подробную информацию, касающуюся анкетирования по VAS для оценки аппетита, см. в разделе 9.3 «Фармакодинамические исследования» в примере 21.

i. В 1-й день анкетирование по VAS для оценки аппетита следует проводить, начиная с первого приема пищи в этот день (через 3

часа после введения дозы).

j. Анкетирование по VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи должно быть завершено субъектами после первого куса пищевого продукта. Подробную информацию, касающуюся анкетирования по VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи, см. в разделе 9.3 «Фармакодинамические исследования» в примере 21.

## 1. График мероприятий - амбулаторный период

|                                                                                                           |                                     |           |           |           |           |           |           |           |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------------------|
|                                                                                                           | Части 1 и 2                         |           |           |           |           |           |           |           |                                    |
| Период исследования                                                                                       | Амбулаторные посещения <sup>a</sup> |           |           |           |           |           |           |           |                                    |
| Semana                                                                                                    | 1                                   | 2         | 3         | 4         | 6         | 8         | 10        | 12        |                                    |
| Дни относительно введения дозы исследуемого лекарственного средства                                       | 7-й день                            | 14-й день | 21-й день | 28-й день | 42-й день | 56-й день | 70-й день | 84-й день | Завершающее посещение <sup>b</sup> |
| Оценки безопасности                                                                                       |                                     |           |           |           |           |           |           |           |                                    |
| Полный физический осмотр                                                                                  |                                     |           |           |           |           |           |           | X         | X                                  |
| Краткий физический осмотр                                                                                 | X                                   | X         | X         | X         | X         | X         | X         |           |                                    |
| Температура тела                                                                                          | X                                   | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X                                  |
| Основные показатели жизнедеятельности (артериальное давление и частота сердечных сокращений) <sup>b</sup> | X                                   | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X                                  |
| ЭКГ в 12 отведениях <sup>c</sup>                                                                          | X                                   | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X                                  |
| Фармакодинамические оценки                                                                                |                                     |           |           |           |           |           |           |           |                                    |
| Масса тела                                                                                                | X                                   | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X         | X                                  |
| Клинические лабораторные исследования                                                                     |                                     |           |           |           |           |           |           |           |                                    |

|                                                                                          |         |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Тест на беременность (моча)                                                              |         |   | X |   |   | X |   | X | X |
| Гематология, биохимия <sup>d</sup>                                                       | X       | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Липидная панель (общий холестерин, триглицериды, ЛПВП и ЛПНП) <sup>d</sup>               |         |   |   |   |   |   |   |   | X |
| Коагуляционная панель <sup>d</sup>                                                       | X       | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Общий анализ мочи <sup>d</sup>                                                           | X       | X | X | X | X | X | X | X | X |
| <b>Поисковые биомаркеры</b>                                                              |         |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Взятие пробы крови для анализа поисковых биомаркеров <sup>e</sup>                        |         | X |   | X |   | X |   | X |   |
| <b>Процедуры оценки фармакокинетики и иммуногенности</b>                                 |         |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Взятие пробы крови для фармакокинетического (ФК) анализа <sup>e, f</sup>                 | X       | X | X | X | X | X | X | X |   |
| Взятие пробы крови на антитела к лекарственному средству (ADA) <sup>e</sup>              |         |   |   | X |   | X |   | X |   |
| <b>Текущие оценки безопасности субъекта</b>                                              |         |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Отчетность о нежелательных явлениях и сопутствующих лекарственных средствах <sup>g</sup> | X-----X |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Нежелательное явление (непрямые вопросы) <sup>g</sup>                                    | X       | X | X | X | X | X | X | X | X |

а. Амбулаторные посещения: Посещения следует выполнять утром и субъект должен голодать в течение по меньшей мере 10 часов (в течение ночи) перед процедурами исследования. Следует принимать все разумные усилия, чтобы проводить амбулаторные посещения в установленные графиком моменты времени (т. е. в конкретный день для каждого посещения), но до посещения на 4-й неделе (28-й день) допустимо окно в пределах  $\pm 1$  день, а для остальных амбулаторных посещений до 12-й недели (84-й день) допустимо окно в пределах  $\pm 3$  дня. Все последующие посещения следует планировать относительно даты первого введения дозы исследуемого лекарственного средства (1-й день), а не даты предыдущего запланированного посещения.

б. Основные показатели жизнедеятельности следует измерять через 5 минут отдыха в положении лежа на спине, и они включают тимпаническую температуру, частоту сердечных сокращений (ЧСС) в состоянии покоя и артериальное давление. Если забор крови или измерение основных показателей жизнедеятельности запланировано на тот же момент времени, что и регистрация ЭКГ, процедуры следует выполнять в следующем порядке: основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, забор крови. Измерения следует проводить с помощью

полностью автоматизированного устройства измерения артериального давления. Во все моменты времени будут выполнять однократное измерение и регистрацию кровяного давления и ЧСС.

с. ЭКГ в 12 отведениях: Все ЭКГ будут регистрироваться по три раза. Субъекты должны находиться в покое в положении лежа на спине по меньшей мере 5 минут в спокойной обстановке без отвлекающих факторов (например, телевизор, сотовые телефоны) и не должны разговаривать или двигать руками или ногами. Три повторяющихся ЭКГ следует регистрировать с интервалом менее 2 минут в каждый момент времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени исследования, что и анализ ФК пробы, ФК пробу следует отбирать сразу же после ЭКГ.

d. См. перечень клинико-лабораторных исследований, которые будут выполнены, в разделе 9.6.2 «Клинико-лабораторные исследования» протокола; забор крови у субъектов выполняется натощак (т. е. субъектам запрещено употреблять пищу или напитки [кроме воды] в течение по меньшей мере 10 часов до забора крови).

e. См. лабораторное руководство в отношении процедур сбора проб и инструкций по обработке.

f. Фармакокинетические исследования: Все заборы крови для ФК анализа следует проводить как можно ближе к указанному в графике моменту времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени образец для ФК анализа следует брать сразу же после завершения ЭКГ. В части 2 (в/в инфузия) все моменты времени забора относятся к концу инфузии. Время забора проб для фармакокинетического анализа может быть изменено (но дополнительные пробы не будут собираться), если это требуется по предварительным ФК данным, полученным при исследовании предыдущей (-их) дозы (доз).

g. Нежелательные явления и сопутствующие лекарственные средства будут регистрироваться, начиная с момента подписания информированного согласия и до выполнения последней процедуры исследования во время завершающего посещения. Кроме того, в течение всего исследования будут проводиться опросы на предмет нежелательных явлений (с использованием не прямых вопросов) в установленные моменты времени.

h. Завершающее посещение должно происходить в течение 7-10 дней после амбулаторного посещения на 84-й день. У преждевременно выбывших из исследования субъектов завершающее исследование следует выполнять как можно скорее после введения исследуемого лекарственного средства.

## 1. ВВЕДЕНИЕ

**[00339]** Ростовый фактор дифференцировки 15 (GDF15) является циркулирующим белковым фактором, присутствующим в человеческой плазме в виде димера с молекулярной массой 25 кДа. Опубликованные и внутренние данные подтверждают его роль в регуляции энергетического баланса, главным образом за счет воздействия на энергию (т. е. на потребление пищи).

**[00340]** Подкожное (п/к) введение FP2 приводит к уменьшению потребления пищи и последующей потере массы тела (BW) у грызунов и не относящихся к человеку приматов. Кроме того, п/к введение FP2 приводит к улучшению гомеостаза глюкозы и облегчает симптомы резистентности к инсулину у мышей с алиментарным ожирением (DIO), вероятно, вследствие снижения веса. FP2 оказывает воздействие посредством связывания с недавно выявленным рецептором GDF15, подобным альфа-рецептору семейства факторов GDNF (GFRAL), который экспрессируется преимущественно в самом заднем поле центральной нервной системы (ЦНС)<sup>5,17,24,15</sup>. Предполагается, что FP2 будет уменьшать потребление пищи и, следовательно, вызовет снижение веса у субъектов с ожирением, что также приведет к улучшению симптомов связанных с ожирением сопутствующих заболеваний.

### **[00341] 1.1. Предпосылки**

#### **[00342] 1.1.1. Доклинические исследования**

#### **[00343] Фармакологический профиль**

**[00344]** Активность FP2 *in vitro* в качестве агониста оценивали с помощью клеточного анализа рАКТ с клетками SK-N-AS, стабильно сверхэкспрессирующими человеческий рецептор GFRAL. FP2 активировали рАКТ с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC<sub>50</sub>) 2,908 ± 0,239 нМ (N=3) (см. пример 14). Нативный GDF15 выступал в качестве аналитического контроля и демонстрировал агонистическую активность с EC<sub>50</sub> 0,153 ± 0,008 нМ (N=3).

**[00345]** Выполняли оценку способности FP2 снижать потребление пищи у множества видов. Однократное п/к введение FP2 остро подавляло потребление пищи самцами мышей линии C57BL/6 (см. пример 14) и крысами линии Спрег-Доули (SD) (см. пример 15). Однократное п/к введение FP2 интактным яванским макакам с произвольно развившимся избыточным весом приводило к снижению потребления пищи и последующему значительному снижению веса по сравнению с животными, получавшими носитель, в течение периода до 4 недель после введения дозы (пример 18).

**[00346]** Повторное введение FP2 каждые 3 дня в течение периода 2 недель уменьшало потребление пищи и вес, а также улучшало толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину, измеренные по результатам оценки резистентности к инсулину в гомеостатической модели у мышей с DIO (см. пример 16). Введение FP2 один раз в неделю когорте интактных яванских макак со спонтанно развившимся избыточным весом в течение периода 12 недель приводило к значительному снижению потребления пищи и веса по сравнению с обработкой носителем (см. пример 19). У некоторых животных

наблюдали снижение воздействия в более поздние моменты времени, предположительно из-за выработки антител к лекарственному средству (ADA). На протяжении всего исследования не было обнаружено связанных с обработкой нежелательных эффектов.

#### **[00347] Фармакологические параметры безопасности**

**[00348]** В соответствии с рекомендациями Международной конференции по гармонизации (ICH) S6(R1) конечные показатели безопасности (функции сердечно-сосудистой [СС], дыхательной и центральной нервной систем [ЦНС]-функция) оценивали в рамках 4-недельных исследований токсичности повторных доз на яванских макаках (исследование 8372593) и крысах SD (исследование 8371098) согласно принципам надлежащей лабораторной практики (GLP). Кроме того, было проведено отдельное исследование фармакологических параметров безопасности для сердечно-сосудистой системы (исследование T-2017-044) на яванских макаках с установленным телеметрическим оборудованием.

**[00349]** В целом, в/в и п/к введение FP2 вплоть до самых высоких доз не оказывало влияния на связанные с сердечно-сосудистой системой конечные показатели, центральную температуру тела, частоту дыхания, неврологические или поведенческие конечные показатели.

#### **[00350] Токсикология**

**[00351]** Были проведены доклинические исследования безопасности (см. таблицу 65) в соответствии с принципами GLP, раздел 21, часть 58 Свода федеральных постановлений США и/или принципами ОЭСР-GLP в странах, участвующих в процессе взаимного признания данных Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), и они включают в себя соответствующую документацию. Исследуемый материал FP2 (партия № CVC\_PCM01), применяемый для доклинических исследований безопасности, считается характерным для клинического исследуемого материала.

#### **[00352] Таблица 65. Обзор токсикологических исследований с FP2**

| Тип исследования             | Вид<br>линия      | и Способ<br>введения | Продолжительность | Дозы<br>(мг/кг) |
|------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------|
| Токсичность<br>повторных доз | Крыса SD          | п/к (biw)            | 4 недели          | 0, 1, 10, 100   |
| Токсичность<br>повторных доз | Яванский<br>макак | п/к/в/в (qw)         | 4 недели          | 0, 1, 10, 50    |

**[00353]** Обозначения: biw=два раза в неделю; в/в=внутривенно; qw=один раз в неделю; п/к=подкожно; SD=Спрег-Доули.

**[00354]** При повторном введении яванским макакам и крысам SD FP2 по существу хорошо переносился. Отсутствовали смертельные случаи и явные клинические симптомы.

Некоторые результаты (например, снижение потребления пищи и веса) считаются следствием предполагаемого механизма действия и не считаются нежелательными эффектами.

#### [00355] Выбор подходящих видов

[00356] Поскольку FP2 представляет собой полностью рекомбинантный гибридный белок, содержащий домены человеческого GDF15 и HSA, связанные коротким пептидом, состоящим из природных аминокислот, программа токсикологических исследований была разработана преимущественно в соответствии с руководством ICH S6(R1) «Доклиническая оценка безопасности компании *Biotechnology-Derived Pharmaceuticals*».

[00357] Что касается определения соответствующих видов животных, то часть FP2, представляющая собой GDF15, является биологически активным компонентом, тогда как компонент HSA главным образом служит, посредством взаимодействия с неонатальным рецептором Fc (FcRn), для продления периода полужизни и, следовательно, усиления воздействия FP2. Недавно были выявлены рецептор GDF15 (GFRAL) и корецептор GFRAL-сигнализации (RET)<sup>17,24,5,15</sup>.

[00358] In silico анализ гомологии аминокислотной последовательности биологически активного компонента (GDF15), его рецепторов (GFRAL и RET), его компонента для продления периода полужизни (HSA) и альбуминового рецептора (FcRn) у разных видов показал наибольшую степень сходства (95-100%) между человеком и обезьяной (т. е. яванскими макаками) и достаточно высокое сходство (78-100%) между человеком и крысой (таблица 66).

[00359] Таблица 66. Гомология последовательности между видами

| % сходства                  |              | Чело | Яванск | Свинья | Собака | Кролик | Крыса | Мышь |
|-----------------------------|--------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|------|
| последовательности с        | человеческой | век  | ий     |        |        |        |       |      |
|                             |              |      | макак* | **     |        |        |       |      |
| Активный компонент          | GDF15        | 100  | 95,7   | 78,3   | 78,3   | -      | 95,7  | 95,7 |
| Рецепторы                   | GFRAL        | 100  | 100    | 90,9   | 95,5   | 95,5   | 90,9  | 90,9 |
|                             | RET          | 100  | 98,8   | 89,3   | 90,8   | 89,6   | 87,3  | 86,0 |
| Продление периода полужизни | Альбумин     | 100  | 97,8   | 87,0   | 93,5   | 95,7   | 93,5  | 93,5 |
|                             | FcRn(p51)    | 100  | 100    | 90,6   | 90,6   | 84,4   | 78,1  | 78,1 |
|                             | FcRn(b2M)    | 100  | 100    | 100    | 100    | 100    | 100   | 80,0 |

[00360] Обозначения: Суно=яванский макак; FcRn=неонатальный Fc-рецептор; GFRAL=рецептор семейства факторов GDNF, подобный  $\alpha$ -рецептору; RET=корецептор GFRAL-сигнализации, \* не относящиеся к грызунам виды и \*\* грызуны, выбранные для исследования токсичности.

[00361] Анализы связывания in vitro продемонстрировали связывание FP2 с рекомбинантными гибридными белками GFRAL у человека, крысы и яванского макака с



аффинностью в пределах 2-кратного диапазона между людьми и яванскими макаками и 5-кратного диапазона между людьми и крысами. Кроме того, анализ тканевой экспрессии рецептора GFRAL у разных видов показал сопоставимый профиль экспрессии (преимущественно в самом заднем поле в заднем мозге) у крыс, обезьян и человека<sup>24</sup>.

**[00362]** Фармакодинамические (ФД) исследования *in vivo* продемонстрировали предполагаемые ФД эффекты (например, снижение потребления пищи и веса) FP2 как у яванских макак, так и у крыс.

**[00363]** Однако ФК исследования с однократной дозой также демонстрируют некоторые существенные различия в ФК между яванскими макаками ( $T_{1/2}$ : приблизительно 7-9 дней) и крысами SD ( $T_{1/2}$ : приблизительно 1-2 дня) из-за более низкой аффинности человеческого HSA к крысиному рецептору FcRn, но аналогичной аффинности человеческого HSA к FcRn яванского макака.

**[00364]** Таким образом, яванский макак считается наиболее значимым/прогностическим видом животных и был отобран в качестве не относящегося к грызунам вида для доклинических исследований безопасности, позволяющих впервые применить препарат у человека. Крыс выбрали в качестве вида грызунов для токсикологических исследований с некоторыми ограничениями с точки зрения ФК.

#### **[00365] Фармакокинетический профиль**

**[00366]** ФК и токсикокинетику (ТК) FP2 характеризовали у грызунов и у худых яванских макак после однократной дозы и после хронического введения в течение периода до 4 недель. Медианное время до достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) составило 1 день, 1 день и 1,67 дня для мышей, крыс и яванских макак соответственно. Клиренс (~ 25 и 5 мл/день/кг у грызунов и обезьян соответственно) и период полувыведения (~ 1,5 и 7,1 дня у грызунов и обезьян соответственно) FP2 у обезьян и грызунов существенно отличаются, предположительно из-за различий в аффинности HSA к FcRn грызуна или обезьяны (т. е. HSA связывается с FcRn грызуна с более низкой аффинностью, чем с человеческим FcRn, тогда как аффинность HSA к FcRn обезьяны аналогична аффинности у человека). Следовательно, обезьяны имеют более высокую прогностическую ценность в отношении ФК FP2 у людей, чем грызуны. Прогнозируемый период полувыведения у человека весом 90 кг составляет приблизительно от 12 до 17 дней.

**[00367]** Показано, что FP2 стабилен в виде интактного димера *ex vivo* в человеческой плазме в течение до 48 часов и *in vivo* у яванских макак после п/к и в/в введения. Предполагается, что метаболизм интактного FP2 осуществляется посредством стандартных протеолитических путей.

#### **[00368] 1.1.2. Клинические исследования**

**[00369]** Это будет первым введением FP2 людям; таким образом, опыт клинического применения отсутствует.

#### **[00370] Фармакокинетика и иммуногенность у человека**

**[00371]** До настоящего времени ФК исследования FP2 на людях не проводились.

#### **[00372] Исследования эффективности/безопасности**

[00373] До настоящего времени клинические исследования FP2 не проводились.

## 2. ЦЕЛИ И ГИПОТЕЗА

### 2.1 Цели

#### 2.1.1. Часть 1: нарастающие однократные дозы

[00374] У здоровых субъектов, но с избыточным весом (ИМТ от  $\geq 25$  до  $\leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>), после однократных нарастающих п/к доз FP2:

##### Главные цели

Оценить безопасность и переносимость FP2, вводимого подкожно (п/к).

##### Вторичные цели

- оценить ФК FP2;
- оценить иммуногенность FP2 с точки зрения потенциального образования ADA, а также возможного образования антител к эндогенному GDF15;
- оценить фармакодинамические (ФД) конечные показатели, такие как масса тела и потребление пищи.

##### Поисковые цели

- оценить, связано ли введение FP2 с изменениями конечных показателей ФД, таких как уровень аппетита и вкусовая привлекательность пищи, с помощью анкетирования по визуальной аналоговой шкале (VAS);
- оценить, связаны ли эндогенные концентрации GDF15 с конечными показателями ФД;
- оценить, связана ли ФК FP2 с конечными показателями ФД.

#### 2.1.2. Часть 2: абсолютная биодоступность

[00375] У здоровых субъектов, но с избыточным весом (ИМТ от  $\geq 25$  до  $\leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>), после однократных внутривенных (в/в) доз FP2:

##### Главная цель

Оценить абсолютную п/к биодоступность FP2 путем выполнения однократной в/в инфузии в течение 30 минут (с постоянной скоростью) субъектам, по возрасту, полу и массе тела соответствующим субъектам, входящим в одну из предшествующих групп с п/к введением нарастающих доз в части 1.

##### Вторичная цель

Оценить безопасность и переносимость FP2 при в/в введении.

### 2.2. Гипотеза

[00376] Для данного исследования не запланирована формальная проверка статистической гипотезы с учетом того, что основной целью является безопасность и переносимость. Все остальные анализы будут поисковыми.

## 3. ДИЗАЙН И ОБОСНОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### [00377] Обзор дизайна исследования

[00378] Это исследование первого применения FP2 у человека (F1H). Исследование состоит из 2 частей и будет проводиться у здоровых субъектов, но с избыточным весом, в одном исследовательском центре. Часть 1 представляет собой рандомизированное двойное

слепое плацебо-контролируемое исследование для оценки безопасности, переносимости и ФК однократных нарастающих п/к доз FP2. Часть 2 представляет собой открытое несравнительное исследование по оценке системного воздействия и ФК FP2, вводимого в виде однократной кратковременной в/в инфузии дозы в течение 30 минут (с постоянной скоростью).

**[00379]** В данном исследовании (части 1 и 2) планируется участие до приблизительно 62 здоровых субъектов, но с избыточной массой тела (ИМТ от  $\geq 25$  до  $\leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>), мужского и женского полов (без репродуктивного потенциала). Максимум приблизительно 56 субъектов будут случайным образом распределены в часть 1 данного исследования и приблизительно 6 субъектов будут распределены в часть 2.

**[00380]** Субъекты будут проходить скрининг на пригодность к участию в исследовании в период от -28-го дня до -3-го дня. Пригодные субъекты будут госпитализированы в отделение клинических исследований (CRU) в -2-й день, и им будут проведены исследования для оценки безопасности на исходном уровне. В -1-й день и 3-й день у субъектов в течение 24 часов будут измерять потребление пищи, и они будут заполнять анкеты с VAS для оценки аппетита и вкусовой привлекательности пищи. Субъекты будут получать исследуемое лекарственное средство в 1-й день и будут оставаться в CRU для оценки безопасности, переносимости, ФК/ADA и ФД до утра 5-го дня, в который после завершения анализов исследования их можно будет выписать. Субъектам нужно будет вернуться в CRU для совершения амбулаторных посещений на 1-й (7-й день), 2-й (14-й день), 3-й (21-й день), 4-й (28-й день), 6-й (42-й день), 8-й (56-й день), 10-й (70-й день), 12-й (84-й день) неделях и завершающего посещения (через 7-10 дней). Общая продолжительность исследования для каждого субъекта будет составлять не более чем приблизительно 17 недель.

**[00381]** Схема дизайна исследования представлена на Фиг. 38.

### **[00382] 3.1.1. Часть 1: однократные нарастающие дозы**

**[00383]** Последовательно будут исследованы до 7 дозовых групп (DG) здоровых субъектов, но с избыточным весом (по 8 субъектов в каждой DG). В каждой DG 6 субъектов будут рандомизированы для получения FP2 и 2 субъекта будут рандомизированы для получения плацебо; таким образом, отношение активного лекарственного средства к плацебо составит 3 : 1 для каждого уровня дозы (см. таблицу 67). В первую DG в части 1 будут включены четыре субъекта мужского пола и 4 субъекта женского пола (рандомизация: 3 субъекта будут получать активное вещество и 1 плацебо), и им планируется вводить неразбавленное исследуемое лекарственное средство (т. е. неразбавленный состав 50 мг/мл), чтобы обеспечить соответствие субъектов соответствующей группе в/в дозы в части 2 исследования.

**[00384]** Планируемая схема повышения дозы FP2 описана ниже в таблице 67. Доза, которую будут вводить в ходе исследования, основана на подходе с постоянной дозой, рассчитанной для субъекта с массой тела 80 кг, как указано в столбце «FP2 (мг п/к)»:

**[00385]** Таблица 67. Планируемые уровни дозы FP2 в части 1

| Дозовая группа | FP2 (мг п/к) | FP2 (мг/кг) | Соответствующее плацебо (п/к) | Общее число субъектов в каждой дозовой группе |
|----------------|--------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1              | 0,8 мг [N=6] | 0,01        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 2              | 2,5 мг [N=6] | 0,03        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 3              | 7,5 мг [N=6] | 0,09        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 4              | 15 мг [N=6]  | 0,18        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 5              | 30 мг [N=6]  | 0,36        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 6              | 60 мг [N=6]  | 0,72        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |
| 7              | 90 мг [N=6]  | 1,08        | Плацебо [N=2]                 | N=8                                           |

**[00386]** Лечение будет проводиться двойным слепым методом с рандомизацией при каждом уровне дозы.

**[00387]** При каждом уровне дозы субъекты будут разделены на 4 подгруппы (n=не более 2/подгруппа) с введением дозы в разные дни. Двум пробным субъектам будут первым одновременно вводить дозу (одному плацебо, другому FP2) в один и тот же день и будут наблюдать за ними в течение 72 часов для оценки безопасности, после чего дозу смогут получить следующие субъекты в DG. После анализа данных по безопасности можно вводить дозу максимум 2 дополнительным субъектам (с интервалом приблизительно 2 часа) в день до тех пор, пока всем субъектам не будет выполнено дозирование. Между последним субъектом из предыдущей группы и первым субъектом из следующей DG должно пройдет по меньшей мере 10 дней.

**[00388]** После завершения введения каждого уровня дозы спонсор и главный исследователь (PI) проанализируют данные для принятия решения о следующем планируемом уровне дозы. Каждое решение о повышении дозы будет основано на предварительных маскированных данных по безопасности, переносимости и ФК, собранных от всех субъектов данной DG в течение по меньшей мере 72 часов после введения дозы. Минимальное число оцениваемых субъектов (т. е. субъектов, которым были проведены по меньшей мере процедуры, выполняемые через 72 часа после введения дозы), требуемое для изучения возможности повышения дозы, составит N=7 для каждой DG.

**[00389]** Не будут вводить дозу, при которой прогнозируемые средние сывороточные воздействия FP2 ( $C_{\max}$  или  $AUC_{0-48hr}$ ) будут превышать воздействие при наименьшей дозе без наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL), установленной в 1-месячных токсикологических исследованиях согласно GLP у наиболее значимых видов (т. е. яванских макаков).

### **[00390] 3.1.2. Часть 2: абсолютная биодоступность**

**[00391]** Часть 2 представляет собой открытое несравнительное исследование по оценке системного воздействия и ФК введения FP2 в виде однократной в/в инфузии дозы в течение 30 минут (с постоянной скоростью) здоровым субъектам мужского и женского полов с избыточным весом (ИМТ от  $\geq 25$  до  $\leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>). Для определения абсолютной

биодоступности дозированной формы FP2 при п/к введении будут применяться данные ФК из части 2.

**[00392]** Часть 2 будет включать 6 здоровых мужчин ( $n=3$ ) и женщин ( $n=3$ ), но с избыточным весом (ИМТ от  $\geq 25$  до  $\leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>). Субъекты будут подбираться таким образом, чтобы соответствовать по полу, возрасту ( $\pm 5$  лет) и массе тела ( $\pm 5$  кг) субъектам из группы п/к дозы из части 1 (вероятно, DG 5; 30 мг, первая группа дозирования, в которой будет применяться неразбавленный состав FP2 50 мг/мл). Часть 2 может быть начата до завершения части 1 исследования после того, как спонсор и PI проведут анализ предварительных данных по безопасности и переносимости из предшествующих DG из части 1 исследования.

**[00393]** Каждый подходящий для участия в исследовании субъект в части 2 получит однократную в/в дозу FP2, вводимую в виде кратковременной инфузии с постоянной скоростью в течение 30 минут посредством постоянного катетера в приемлемой вене предплечья. В/в доза для части 2 будет выбрана на основе предварительных данных по безопасности и ФК, полученных в части 1. Выбранная в/в доза не будет превышать одну треть уже оцененной и хорошо переносимой в части 1 дозы с целью учета ожидаемых различий в максимальных уровнях воздействия при в/в введении и, возможно, неполной биодоступности состава для п/к введения. Подробная информация представлена в разделе 3.5 «Выбор дозы в части 2» в примере 21. Для контроля безопасности сначала вводят дозу 1 пробному субъекту и затем наблюдают за ним в течение 72 часов, после чего дозу смогут получить следующие субъекты. Остальные 5 субъектов будут разделены на подгруппы (дозировка с интервалом по меньшей мере 24 часа) так, чтобы в день доза была введена не более 2 субъектам (с интервалом приблизительно 2 часа).

### **[00394] 3.2. Обоснование дизайна исследования**

#### **[00395] 3.2.1. Общие вопросы, касающиеся дизайна исследования**

**[00396]** Предлагаемое исследование представляет собой двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование первого применения у человека (FII) однократных нарастающих доз

**[00397]** (SAD) у здоровых взрослых субъектов, но с избыточным весом, по оценке безопасности, переносимости, ФК, иммуногенности и ФД (т. е. потребления пищи, массы тела, уровня аппетита и вкусовой привлекательности пищи) FP2, представляющего собой полностью рекомбинантный гомодимер GDF15, слитый с HSA.

**[00398]** Исследование разработано в соответствии с действующими нормативными руководящими принципами (Руководящие принципы EMA EMEA/CHMP/SWP/28367/07 ред. 1, 2017 г.; Отраслевое руководство FDA, 2005 г.) для исследований первого применения у человека и других клинических исследований ранних фаз.

**[00399]** Относительно предполагаемой системной безопасности на основании имеющихся доклинических данных и фармакологических характеристик FP2 не считается новым биологическим соединением (NBE) с «высоким риском» в соответствии с критериями, изложенными в «Руководстве по стратегиям выявления и смягчения рисков в

клинических исследованиях первого применения у человека экспериментальных лекарственных препаратов»<sup>4</sup>.

**[00400]** Важные элементы дизайна исследования, такие как определение безопасной начальной дозы (на основании данных о минимальном предполагаемом уровне биологического эффекта [MABEL], фармакологически активной дозе [PAD] и NOAEL), стратегия повышения дозы и определение критериев остановки исследования, удовлетворяют текущим и научным, медицинским и этическим стандартам и требованиям (см. разделы 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 в примере 21) и согласуются с дизайнами других текущих исследований FHN, в которых изучают сопоставимые препараты с аналогичными целями.

**[00401]** Целевая популяция пациентов хорошо определена и будет тщательно отобрана на основании исчерпывающего набора применимых критериев включения и исключения (см. протокол, раздел 4 «Популяция субъектов»). За всеми субъектами будет осуществляться регулярное последующее наблюдение для оценки безопасности в течение 13 недель после введения дозы.

**[00402]** Исследование разработано для и будет проводиться в специальном CRU в условиях медицинского наблюдения, которые обеспечивают высокую вероятность раннего обнаружения неблагоприятных явлений и при необходимости выполнения приемлемого терапевтического вмешательства.

### **[00403] 3.2.2. Маскировка, контроль, фаза/периоды исследования, группы лечения**

#### **[00404] Часть 1**

**[00405]** Двойной слепой плацебо-контролируемый рандомизированный дизайн исследования позволяет наилучшим образом проводить практическую оценку профиля безопасности и переносимости FP2 посредством сведения к минимуму потенциальных ошибок во время сбора данных и оценки клинических конечных показателей. Контроль с плацебо будет применяться в части 1 для оценки частоты и величины изменений клинических конечных показателей, которые могут происходить в отсутствие активного лечения. Рандомизацию будут применять для того, чтобы свести к минимуму ошибки при отнесении субъектов к группам лечения, повысить вероятность того, что известные и неизвестные свойства субъекта (например, демографические и исходные характеристики) будут равномерно распределены по группам лечения.

#### **[00406] Часть 2**

**[00407]** Часть 2 имеет открытый несравнительный дизайн, который обеспечит получение не зависящих от состава ФК данных при в/в введении по распределению FP2, которые невозможно получить другим способом и которые будут применяться для оценки абсолютной биодоступности (ВА) дозированной формы FP2 при п/к введении.

#### **[00408] 3.2.3. Исследуемая популяция**

**[00409]** Обоснование для включения в исследование здоровых субъектов, но с избыточным весом, следующее:

**[00410]** FP2 будут вводить п/к способом, и характеристики всасывания

лекарственного средства из п/к тканей (т. е. скорость и степень всасывания) у разных субъектов (например, мужчин и женщин) и популяций (т. е. у худых субъектов, субъектов с избыточным весом и ожирением) могут различаться. Таким образом, целью исследования является определение исходной человеческой ФК в соответствующей популяции для обеспечения надежного прогноза ФК при многократном введении и выбора дозы в популяции, которая будет близка к целевой (-ым) популяции (-ям) до того, как подвергать воздействию лекарственного средства субъектов с избыточным весом или ожирением в более продолжительных исследованиях.

**[00411]** Риски для здоровых субъектов, но с избыточным весом, считаются сопоставимыми с рисками для худых здоровых субъектов, поскольку критерии скрининга исключают субъектов с клинически значимыми состояниями, которые, как известно, более распространены у субъектов с избыточным весом (например, сахарный диабет 2 типа, гипертензия).

**[00412]** Включение в исследование здоровых субъектов, но с избыточным весом, позволяет провести предварительную оценку безопасности FP2 и ФД эффектов (таких как потребление пищи, масса тела, уровень аппетита и вкусовая привлекательность пищи) в популяции субъектов, которая близка/сопоставима с популяцией, которая предположительно будет участвовать в фазе 2 исследования.

#### **[00413] 3.2.4. Фармакокинетика и фармакодинамика**

**[00414]** Время и продолжительность отбора проб для анализа ФК в данном исследовании основаны на доклинических ФК данных, включая прогнозы на аллометрической модели. На основе этой информации график с частым забором проб крови позволит получить полную картину ФК профиля и предоставить данные, необходимые для определения ключевых ФК параметров, необходимых для выполнения дополнительной клинической разработки.

**[00415]** Суточная оценка потребления пищи (до введения дозы и при предполагаемом  $T_{\max}$ ) и контроль массы тела на протяжении всего исследования позволят оценить снижение потребления пищи (т. е. уменьшение потребления калорий и возможное снижение веса, которые могут происходить при введении однократной дозы FP2. Частое заполнение анкет с VAS позволит охарактеризовать изменения в пищевом поведении, которые могут быть связаны со снижением потребления пищи и снижением веса при введении однократной дозы FP2.

#### **[00416] 3.2.5. Безопасность и переносимость**

**[00417]** Большинство выводов, зафиксированных в 1-месячных токсикологических исследованиях FP2 в соответствии с GLP на крысах и обезьянах, посчитали вторичными по отношению к наблюдаемому значительному снижению потребления пищи и снижению веса, что было целевой фармакологической гипотезой для данного класса лекарственных средств. В целом FP2 посчитали хорошо переносимым в токсикологических исследованиях, и не было получено никаких результатов, которые требовали бы специализированного контроля.

**[00418]** Таким образом, контроль безопасности в этом исследовании будет состоять из последовательных стандартных оценок безопасности, таких как основные показатели жизнедеятельности (частота сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление, температура тела), стандартные клинические лабораторные исследования (гематологические, биохимические исследования, анализ мочи, липиды, коагуляция), физическое обследование, контроль возникших в процессе лечения признаков и симптомов/нежелательных явлений [TEAE], включая аллергические реакции/гиперчувствительность и местные реакции в участке инъекции, а также документирование последовательных стандартных ЭКГ в 12 отведениях. В части 2 также будет проводиться непрерывный контроль ЭКГ во II отведении.

#### **[00419] 3.2.6. Иммуногенность**

**[00420]** Поскольку иммуногенный потенциал NBE является частью общего профиля безопасности, потенциальную иммуногенность FP2 будут отслеживать посредством последовательного количественного определения ADA и скрининга на антитела, которые могут образовываться к эндогенному GDF15.

#### **[00421] 3.2.9. В/в введение (часть 2)**

**[00422]** Часть 2 исследования представляет собой открытое несравнительное исследование по оценке системного воздействия и ФК введения FP2 в виде однократной в/в инфузии в течение 30 минут (с постоянной скоростью) здоровым субъектам, но с избыточным весом, по возрасту, полу и массе тела соответствующих приемлемой эталонной группе с п/к введением (первая дозовая группа в части 1, в которой будет вводиться неразбавленное исследуемое лекарственное средство). В части 2 будут получены не зависящие от состава ФК данные при в/в введении по распределению FP2, которые невозможно получить другим способом и которые будут применяться для оценки абсолютной ВА дозированной формы FP2 при п/к введении. Шесть субъектов, получавших в/в FP2 в части 2, обычно используют для оценки абсолютной ВА и в качестве эталона для оценки характеристик фармацевтического качества дозированной формы при п/к введении.

#### **[00423] 3.3. Обоснование выбора и повышения дозы для части 1**

**[00424]** Модель ФК/ФД непрямого ответа между ФК FP2 и потреблением пищи, объединенная с физиологическим представлением взаимосвязи между потреблением пищи и массой тела (BW), была разработана для одновременного описания ФК и ФД (% изменения потребления пищи и BW по сравнению с исходным уровнем) FP2 при 3 исследованных уровнях дозы в исследовании повторных доз у яванских макаков с избыточным весом (см. пример 19). В этом исследовании снижение потребления пищи было максимальным со 2-й по 3-ю неделю и продемонстрировало дозозависимое уменьшение при продолжении лечения, тогда как масса тела непрерывно снижалась до 4-й недели (в группе, получавшей 1 нмоль/кг) или до 7-й недели (в группе, получавшей 10 нмоль/кг), после чего стабилизировалась. Чтобы охарактеризовать эти наблюдения, была разработана новая физиологическая модель ФК/ФД для описания вызванных лечением изменений как в потреблении пищи (FI), так и в последующем снижении массы тела (BW),



включая термины, описывающие компенсаторные изменения в потреблении пищи и расходе энергии, которые происходят в ответ на снижение веса. Изменение BW описывали как лонгитудный эффект изменения потребления пищи наряду с изменением расхода энергии с течением времени. Эта модель ФК/ФД была способна описать траектории изменения потребления пищи и BW в течение 12 недель исследования и позволяла оценить соотношение воздействие - ответ для FP2 у яванских макаков с избыточным весом. Зависящий от снижения BW термин «компенсаторное потребление пищи» в модели позволяет параметрам, отражающим влияние лекарственного средства на потребление пищи, оставаться постоянными с течением времени при данном воздействии. Полумеханистическая модель, разработанная у яванских макаков, позволила выполнить дополнительное трансляционное моделирование на основе известных взаимосвязей между потреблением энергии и изменениями BW у человека, причем результаты показывают, что при данном % снижения потребления энергии у человека наблюдается больший % снижения BW, чем у яванских макаков. Результаты моделирования также количественно подтверждают механизмы действия FP2 и что снижение BW главным образом обусловлено индуцированным лекарственным средством снижением потребления пищи у яванских макаков с избыточным весом. Данный подход к моделированию применяли для определения PAD и эффективных клинических доз/воздействий у людей.

**[00425]** Учитывая, что соотношение ФК/ФД FP2, а также физиологически значимые параметры и п/к биодоступность аналогичны у яванских макаков и людей с избыточным весом, предварительная предполагаемая доза для человека при п/к введении один раз в неделю, которая предположительно должна обеспечить снижение потребления пищи на 20% на 12-й неделе, составляет приблизительно 0,08 мг/кг ( $\sim 0,5$  нмоль/кг). На основании опубликованных данных<sup>13,12,11</sup> и результатов моделирования доза, которая обеспечивает снижение потребления пищи на 20% на 12-й неделе после п/к введения один раз в неделю, может соответствовать снижению веса более чем на 10% после одного года лечения.

### **[00426] 3.3.1. Обоснование начальной дозы**

**[00427]** Начальная доза для данного исследования была выбрана в соответствии с применимыми нормативными руководящими принципами<sup>3,6</sup> для исследований первого применения у человека на основании токсикологических (NOAEL) и фармакологических данных (PAD).

**[00428]** Доза NOAEL у крыс и яванских макаков для 1-месячных исследований токсичности составляла 100 мг/кг у крыс и 50 мг/кг у яванских макаков. Эквивалентные дозы для человека (HED) рассчитывали путем нормализации доз к площади поверхности тела. В расчетах максимальной рекомендованной начальной дозы (MRSD) по умолчанию применяется коэффициент безопасности, равный 10, для обеспечения предела безопасности для защиты человеческих индивидов, получающих начальную клиническую дозу<sup>6</sup>. Как отражено в расчетах коэффициента воздействия, описанных ниже, при применении коэффициента безопасности, равного 10, MRSD для FP2 составляет, по расчетам, 1,6 мг/кг BW. Для человека с массой тела 80 кг расчетная доза MRSD составила 128 мг.

**[00429]** На основании фармакологических характеристик FP2 ожидается, что он будет функционировать как эндогенный GDF15, снижая потребление пищи, что приводит к снижению массы тела. Механизм действия и доклинический профиль безопасности FP2 позволяют предположить, что FP2 не соответствует критериям для препаратов высокого риска.

**[00430]** Поскольку результаты исследования у яванских макаков с многократным дозированием показали фармакологическую активность (т. е. снижение потребления пищи) при значительно более низких дозах, MRSD следует выбирать, используя основанный на PAD подход. С этой целью ФК параметры для FP2 у человека прогнозировали посредством фиксированного экспоненциального аллометрического масштабирования рассчитанных в модели ФК параметров на основании массы тела после однократного п/к введения дозы яванским макакам с избыточным весом.

**[00431]** На основании этого была разработана модель ФК/ФД FP2 с применением данных ФК и ФД по 3 исследованным уровням доз у яванских макаков, и по модели был составлен прогноз, что однократная п/к доза 0,05 мг/кг ( $\sim 0,3$  нмоль/кг) приведет к снижению максимального потребления пищи приблизительно на 10%, что считается значимой пороговой величиной, указывающей на наличие фармакологической активности. Поскольку прогнозируемый уровень снижения потребления пищи, связанный с дозой 0,05 мг/кг, не считается критическим для безопасности субъектов, и отсутствуют другие известные критические с точки зрения безопасности ФД эффекты, к рассчитанной в модели дозе 0,05 мг/кг применяют коэффициент безопасности, равный 5 (вместо коэффициента безопасности по умолчанию, равного 10). Выбор этого коэффициента безопасности также учитывает, что аффинность связывания *in vitro* FP2 с рекомбинантными гибридными белками GFRAL у человека и яванского макака находится в 2-кратном диапазоне, и наличие сопоставимых профилей экспрессии в тканях рецептора GFRAL у обезьяны и человека, и это приводит к получению MRSD, равной 0,01 мг/кг. Так как в этом исследовании будет применяться подход с постоянной дозой для массы тела 80 кг, MRSD на основе PAD составила, по расчетам, 0,8 мг (0,01 мг/кг  $\times$  80 кг). Это указывает на то, что MRSD на основе PAD приблизительно в 160 раз ниже, чем MRSD на основе NOAEL.

**[00432]** Предполагается, что MRSD на основе PAD, равная 0,01 мг/кг, обеспечит максимальную концентрацию лекарственного средства в сыворотке  $\sim 0,6$  нМ, что в 13 раз выше концентрации верхней части нормального диапазона эндогенного GDF15 (т. е.  $\sim 0,046$  нМ или  $1,15$  нг/мл)<sup>2</sup> и в 5 раз ниже медианной концентрации эндогенного GDF15, обнаруживаемого у беременных женщин без осложнений (т. е.  $\sim 3,2$  нМ или 80 000 пг/мл)<sup>20</sup>. Данное значение концентрации после коррекции на различия в: 1) аффинности связывания с человеческим рецептором GFRAL (сниженная в 11 раз аффинность связывания FP2 по сравнению с эндогенным GDF15) и 2) активности в функциональном анализе *in vitro* ( $\sim 19$ -кратное снижение значений  $EC_{50}$  для FP2 по сравнению с эндогенным GDF15 в функциональном анализе pAKT с применением клеток SK-N-AS, экспрессирующих rhGFRAL) позволяет предположить, что ожидаемая максимальная концентрация FP2 у

людей после однократной п/к дозы 0,01 мг/кг будет находиться в 1,2-кратном диапазоне по отношению к верхнему значению нормы эндогенного GDF15 у худых субъектов.

**[00433]** Кроме того, ожидается, что  $C_{\max}$  для начальной дозы 0,01 мг/кг будет ниже, чем  $EC_{10}$  по результатам функционального анализа pAKT при применении клеток, экспрессирующих rhGFRAL.

#### **[00434] 3.3.2. Максимальная доза**

**[00435]** Дозы NOAEL в 4-недельных токсикологических исследованиях по GLP у крыс или яванских макак приводили к средним значениям  $C_{\max}$ , равным 415 мкг/мл (1-4-й дни, женщины и мужчины) и 1,117 мкг/мл (22-29-й дни, женщины и мужчины) соответственно и средним значениям AUC, равным 883 мкг/мл (1-4-й дни, мужчины и женщины) и 6341 мкг·день/мл (22-29-й дни, мужчины и женщины) соответственно. Никаких очевидных различий в разграниченных по полу средних уровнях воздействия лекарственного средства (оцениваемых по  $C_{\max}$  и AUC) и других ТК параметрах между самцами и самками яванских макак не наблюдали. Наблюдала тенденцию к небольшому увеличению воздействия лекарственного средства (оцениваемого по  $C_{\max}$  и  $AUC_{\text{Day1-4}}$  после первой дозы) у самок крыс по сравнению с самцами. Предполагается, что максимальная доза 1,08 мг/кг BW, планируемая в части 1, обеспечит средние значения  $C_{\max}$  и AUC, которые будут приблизительно в 97-21 раз ниже средних значений  $C_{\max}$  и AUC соответственно при дозе NOAEL у яванского макака. В ходе части 1 настоящего исследования данные ФК для каждой последовательной DG будут использованы для моделирования, прогнозирующего системные воздействия FP2, и дополнительного уточнения этих оценок уровня воздействия. Последующие дозы можно корректировать на основании анализа новых данных по безопасности, переносимости и ФК, но они не будут превышать максимальную планируемую дозу.

**[00436]** В исследовании безопасности для сердечно-сосудистой системы у яванских макака с установленными измерительными приборами не было получено каких-либо значимых данных даже при использовании самой высокой исследуемой п/к дозы 50 мг/кг и, следовательно, отсутствовали ограничения для запланированных максимальных уровней воздействия, описанных выше.

#### **[00437] 3.4. Нарращивание дозы**

**[00438]** Запланированный диапазон доз в части 1 позволит охарактеризовать дозы, которые предположительно обеспечивают пределы безопасности ( $\geq 10$  раз) относительно ожидаемого воздействия при использовании многократных терапевтически эффективных доз, которые можно было бы исследовать в будущих исследованиях на субъектах с ожирением и позволит учесть потенциальное увеличение воздействия в особых популяциях (например, у субъектов с нарушением функций почек и печени) и в особых ситуациях (например, в исследованиях межлекарственного взаимодействия, исследованиях QT/QTc и т. д.).

**[00439]** Предлагаемая стратегия наращивания доз соответствует концепции ~3-кратного приращения дозы для первых 2 стадий повышения дозы до 3-го уровня дозы

исследования, если было показано, что предыдущие уровни дозы являются безопасными, а уровни воздействия ( $C_{\max}$  и  $AUC_{0-72 \text{ hrs}}$ ) демонстрируют приблизительно пропорциональную дозе линейную ФК (или субпропорциональное увеличение воздействия). В тех же условиях 3-я, 4-я и 5-я стадии увеличения дозы до уровней дозы 4, 5 и 6 будут состоять из ~2-кратного увеличения дозы, в то время как все последующие стадии увеличения дозы (при наличии) будут планироваться с приращениями дозы приблизительно 50% (таблица 3).

**[00440]** После завершения введения каждого уровня дозы спонсор и PI оценят данные для принятия решения о повышении дозы до следующего планируемого уровня. Каждое решение о повышении дозы будет основано на предварительных замаскированных данных по безопасности, переносимости и ФК, собранных от всех субъектов данной дозовой группы в течение по меньшей мере 72 часов после введения дозы, и предварительных данных ФК, полученных в течение по меньшей мере 72 часов после введения дозы. Минимальное число оцениваемых субъектов (т. е. субъектов, которым были проведены по меньшей мере процедуры, выполняемые через 72 часа после введения дозы), требуемое для оценки, составит  $N=7$  для каждой дозовой группы. Любая дополнительная клинически значимая информация, начиная с 72 часов после введения дозы и до проведения собрания для оценки, будет передана исследователем при проведении обзорного совещания. В ходе исследования будут регулярно оцениваться совокупные данные по безопасности от предыдущих дозовых групп, также в рамках каждого совещания для принятия решения о повышении дозы. Запланированные дозы могут быть изменены, если это подтверждается предварительными данными по ФК, безопасности и/или переносимости предыдущей (-их) дозы (доз), и могут быть уменьшены или сохранены, но не увеличены, если не была выпущена существенная поправка к протоколу исследования и передана в компетентный орган здравоохранения (НА) и Независимый комитет по этике (IEC).

**[00441]** Между последним субъектом из предыдущей дозовой группы и первым субъектом из следующей DG должно будет пройти по меньшей мере 10 дней.

**[00442]** Дозы NOAEL в 4-недельных токсикологических исследованиях у крыс или яванских макак будут применяться для определения целевого верхнего предела воздействия в данном исследовании (подробная информация представлена в разделе 3.3.2 в примере 21).

### **[00443] 3.5. Выбор дозы в части 2**

**[00444]** Дозировка для части 2 будет выбрана на основании предварительных данных по безопасности и ФК в части 1 и не будет превышать  $1/3$  дозы, которая, по оценкам, хорошо переносилась в части 1, чтобы обеспечить приблизительно 3-кратный предел безопасности FP2 ВА при п/к введении человеческим индивидам с избыточным весом, и будет существенно ниже, чем определенная для худых яванских макак (абсолютная ВА 99% при однократных в/в дозах  $1,0 \text{ мг/кг}$ ). Так как наблюдаемые значения  $C_{\max}$  при в/в введении ( $50 \text{ мг/кг BW}$ ) в 4-недельном исследовании ТК у яванских макак были только приблизительно в 2 раза выше, чем наблюдаемые при п/к введении той же дозы, ожидается,

что уменьшение хорошо переносимой п/к дозы в 3 раза также обеспечит достаточные пределы для безопасного максимального воздействия ( $C_{\max}$ ), ожидаемого при в/в инфузии FP2 с постоянной скоростью в течение 30 минут. Например, если доза 30 мг п/к, вводимая в дозовой группе 5, будет считаться безопасной и хорошо переносимой, то в/в доза для части 2 может быть выбрана на основании этой DG и составит 1/3 от 30 мг, или 10 мг. Это основано на допущении о том, что абсолютная ВА при п/к введении дозы субъектам с избыточным весом составляет лишь ~33%, и, следовательно, в/в доза 10 мг позволит гарантировать, что AUC при в/в введении не будет превышать AUC, полученную после п/к дозы 30 мг. Поскольку ВА рассчитывается по AUC (не  $C_{\max}$ ), и допущение о том, что ВА равна 33%, является консервативным, в/в доза, равная 1/3 от п/к дозы, вероятнее всего, обеспечит  $C_{\max}$  (т. е. в конце инфузии) ниже, чем при п/к введении 30 мг.

### **[00445] 3.6. Критерии прекращения введения препарата**

#### **[00446] 3.6.1. Индивидуальные критерии прекращения введения препарата - часть 1**

**[00447]** Поскольку часть 1 исследования включает только однократное п/к введение FP2, индивидуальные критерии прекращения введения исследуемого лекарственного средства (такие как прекращение дозирования) не применимы. Однако рандомизированный субъект не будет получать исследуемое лекарственное средство, если он/она исключен (-а) из исследования (см. пример 21, раздел 10.2).

#### **[00448] 3.6.2. Индивидуальные критерии прекращения введения препарата - часть 2**

**[00449]** В/в инфузия будет прекращена при возникновении, по оценке исследователя (-ей), значимых с медицинской точки зрения нежелательных явлений (НЯ), представляющих потенциальный риск для субъектов. Такие значимые с медицинской точки зрения НЯ включают в себя, без ограничений, следующие результаты.

**[00450]** Субъект имеет абсолютное значение QT, скорректированное по формуле Фридерика (QTcF),  $\geq 500$  мс или увеличение QTcF относительно исходного уровня  $>60$  мс при 2 последовательных измерениях (с интервалом в 15 минут) после первого случая.

**[00451]** Тахикардия у субъекта, определяемая как частота сердечных сокращений в положении лежа на спине в состоянии покоя  $>100$  уд./мин, сохраняющаяся в течение по меньшей мере 15 минут после первого возникновения, на основании непрерывного мониторинга частоты сердечных сокращений.

**[00452]** Брадикардия у субъекта, определяемая как частота сердечных сокращений в положении лежа на спине в состоянии покоя  $<45$  уд./мин, сохраняющаяся в течение по меньшей мере 15 минут после первого возникновения, на основании непрерывного мониторинга частоты сердечных сокращений.

**[00453]** Гипертензия у субъекта, определяемая как систолическое артериальное давление в положении лежа на спине (SBP) в состоянии покоя более 180 мм рт. ст., сохраняющаяся в течение по меньшей мере 15 минут после первого возникновения.

**[00454]** У субъекта возникло тяжелое или серьезное нежелательное явление, и

исследователь считает, что по причинам безопасности в интересах субъекта следует прекратить в/в инфузию.

**[00455]** В случае отмены лекарственного средства по одной из этих причин введение исследуемого лекарственного средства следует считать окончательно завершенным (т. е. его нельзя начать снова. Причины прекращения введения исследуемого лекарственного средства будут задокументированы).

### **[00456] 3.6.3. Критерии прекращения исследования**

**[00457]** Процесс проведения исследования (либо на стадии еще незавершенного дозирования в DG, либо при переходе к более высокому уровню дозы) будет приостановлен при возникновении в любое время следующих событий:

- 2 субъекта исключаются из исследования (независимо от группы или периода введения дозы) в связи с возникновением у них любого значимого с медицинской точки зрения или серьезного нежелательного явления (СНЯ), оцененного
- исследователем как возможно, вероятно или наиболее вероятно связанное с исследуемым лекарственным средством, или
- у 1 субъекта возникло СНЯ, оцененное исследователем как возможно, вероятно или наиболее вероятно связанное с исследуемым лекарственным средством.

**[00458]** Можно создать внутреннюю DRC независимо от специалистов клинического исследования (см. раздел 11.8). Целью DRC является изучение всех раскрытых данных о безопасности. После завершения этого подробного анализа безопасности будет предоставлена одна из следующих рекомендаций:

**[00459]** Продолжение исследования по плану (т. е. отсутствуют значимые проблемы с безопасностью).

**[00460]** Продолжение исследования с повторением текущей дозы у большего числа субъектов.

**[00461]** Продолжение исследования с дозой в диапазоне между текущей дозой и следующей запланированной дозой или с дозой в диапазоне между текущей дозой и предыдущей более низкой дозой.

**[00462]** Завершение исследования.

## **4. ПОПУЛЯЦИЯ СУБЪЕКТОВ**

**[00463]** Скрининг для поиска пригодных для участия в исследовании субъектов будет проводиться в течение 28 дней до введения исследуемого лекарственного средства.

**[00464]** В обеих частях (1 и 2) в -2-й день стационарного периода будут госпитализированы по меньшей мере 2 дополнительных резервных субъекта, которые будут проходить все исследования, необходимые для введения дозы, чтобы обеспечить рандомизацию полной дозовой группы.

**[00465]** Дополнительные субъекты могут быть включены в исследование при необходимости замены; каждый заменяемый субъект пройдет все процедуры исследования, предназначенные для субъекта, которого он заменяет, в соответствии с графиком рандомизации (см. раздел 5 протокола «Распределение исследуемого лекарственного

средства и маскировка данных»). Ни один субъект не может находиться в более чем одной дозовой группе или части данного исследования. Резервные субъекты могут проходить повторный скрининг для участия в исследовании в другой дозовой группе.

**[00466]** В части 1 четыре мужчины и 4 женщины (рандомизация: 3 субъекта будут получать активное вещество и 1 - плацебо) будут включены в первую дозовую группу, в которой планируется вводить неразбавленное исследуемое лекарственное средство (т. е. неразбавленный состав 50 мг/мл), чтобы обеспечить соответствие субъектов соответствующей группе в/в дозы в части 2 исследования.

**[00467]** Критерии включения и исключения для регистрации в исследовании субъектов описаны в следующих 2 подразделах. При наличии вопроса о приведенных ниже критериях включения или исключения исследователь будет обращаться к соответствующему представителю спонсора и решать любые проблемы перед регистрацией субъекта в исследовании. Отказы от обязательств не разрешены.

**[00468]** Обсуждение статистических методов выбора субъекта приведено в разделе 11.2 «Определение размера выборки» в примере 21.

#### **[00469] 4.1. Критерии включения**

**[00470]** Каждый потенциальный субъект будет удовлетворять всем следующим критериям для включения в исследование:

**[00471]** Мужской или женский пол.

**[00472]** Возраст: от 18 до 45 лет включительно.

**[00473]** Индекс массы тела (ИМТ) в диапазоне от 25,0 до 29,9 кг/м<sup>2</sup> (включительно) и масса тела  $\geq 80$  кг.

**[00474]** Субъект здоров по данным физического осмотра, анамнеза, основных показателей жизнедеятельности, клинических лабораторных тестов и ЭКГ в 12 отведениях при скрининге и на исходном уровне (-2-й день и/или -1-й день). Если какой-либо из результатов является аномальным, то субъект может быть включен только в том случае, если исследователь считает, что нарушения или отклонения от нормы не имеют клинического значения. Это определение будет зафиксировано в первичных документах субъекта и инициируется исследователем.

**[00475]** Будет подписана форма информированного согласия (ICF), в которой указано, что он/она понимает цели и процедуры, которые требуются для исследования, и добровольно участвует в исследовании.

**[00476]** Женщины не должны иметь репродуктивного потенциала, что определяется следующим образом.

**[00477]** Период постменопаузы

**[00478]** Период постменопаузы определяется как отсутствие менструаций в течение по меньшей мере 12 месяцев без альтернативной медицинской причины, а также как скрининговый уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), находящийся в постменопаузальном диапазоне ( $>40$  МЕ/л или мМЕ/мл). Однако если у субъекта аменорея наблюдается в течение периода менее 12 месяцев, то для подтверждения того, что он

находится в состоянии постменопаузы, требуются 2 определения ФСГ (1 может быть взято из медицинской документации субъекта). Во время скрининга у всех женщин должен быть отрицательный результат теста на беременность (сывороточный  $\beta$ -хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)) и отрицательный результат исследования мочи на беременность при госпитализации в -2-й день.

**[00479]** Необратимая стерильность

**[00480]** Способы обеспечения необратимой стерилизации включают в себя гистерэктомию, двустороннюю сальпингэктомию, процедуры двусторонней окклюзии/лигирования труб и двустороннюю овариэктомию или неспособность к беременности по другим причинам согласно данным в медицинской документации. При скрининге у всех женщин должны быть отрицательный результат теста на беременность (ХГЧ) и отрицательный результат исследования мочи на беременность при госпитализации в -2-й день.

**[00481]** Частота сердечных сокращений в покое (после нахождения субъекта в положении лежа на спине в течение 5 минут) - от 50 до 90 ударов в минуту (уд./мин). Если частота сердечных сокращений выходит за пределы указанного диапазона, допустимы до 2 повторных исследований.

**[00482]** Систолическое артериальное давление (после нахождения субъекта в положении лежа на спине в течение 5 минут) от 90 до 140 мм рт. ст., включительно, а диастолическое - не более 90 мм рт. ст. Если артериальное давление выходит за пределы указанного диапазона, допустимы до 2 повторных исследований.

**[00483]** Мужчины соглашаются применять презервативы (в том числе мужчины после вазэктомии), даже если их партнерша беременна (это гарантирует отсутствие воздействия исследуемого лекарственного средства на плод посредством вагинальной абсорбции), а также не сдавать сперму во время исследования и в течение 3 месяцев после завершения исследования. Субъекты мужского пола должны рекомендовать своим партнершам женского пола применять эффективный способ (например, рецептурные пероральные контрацептивы, контрацептивные инъекции, внутриматочные устройства, двойной барьерный способ и контрацептивный пластырь) контрацепции в дополнение к презервативу, применяемому субъектом мужского пола, проходящим исследование.

**[00484]** Готовность соблюдать указанные в протоколе исследования запреты и ограничения.

**[00485]** Субъектам нравятся и, как правило, они употребляют продукты питания, которые будут предоставлены для 24-часовой оценки потребления пищи (по меньшей мере первое блюдо и один из гарниров из меню обеда и ужина), и субъекты будут иметь привычный характер приема пищи, состоящий из 3 основных приемов пищи в день (завтрак, обед и ужин).

**[00486]** Субъекты подпишут отдельную форму информированного согласия, если он или она соглашается предоставить необязательную пробу ДНК для исследования. Отказ от предоставления согласия на взятие необязательной пробы ДНК не исключает возможности



участия субъекта в клиническом исследовании.

#### **[00487] 4.2. Критерии исключения**

**[00488]** Любой потенциальный субъект, удовлетворяющий любому из следующих критериев, будет исключен из исследования:

**[00489]** Перенесенные или активные в настоящее время значимые заболевания или медицинские расстройства, включая (без ограничений) сердечно-сосудистые заболевания (включая сердечные аритмии, инфаркт миокарда, инсульт, заболевание периферических сосудов), эндокринные или метаболические заболевания (например, диабет, гипер-/гипотиреоз, тяжелая гипертриглицеридемия [ $>400$  мг/дл]), гематологические заболевания (например, болезнь фон Виллебранда или другие коагулопатии), респираторное заболевание, заболевание печени или желудочно-кишечного тракта, неврологическое или психическое заболевание, офтальмологические расстройства (в том числе заболевания сетчатки или катаракты), неопластическое заболевание, кожное заболевание, заболевание почек или любое другое заболевание, которое, по мнению исследователя, не позволяет субъекту принимать участие в исследовании или которые могут препятствовать интерпретации результатов исследования.

**[00490]** Предшествующее хирургическое лечение ожирения или недавние изменения массы тела ( $\geq 5\%$ ) в связи с диетой, включая коммерческие программы снижения веса, или фармакологическое лечение в течение 6 месяцев до или после скрининга.

**[00491]** Наличие в анамнезе любого расстройства пищевого поведения или высокий риск наличия расстройства пищевого поведения (с помощью анкеты по оценке особенностей диеты и массы тела-5 [QEW-5]<sup>25</sup>. См. приложение 1.

**[00492]** Также будут исключены субъекты, у которых в анамнезе имеются злокачественные новообразования или в семейном анамнезе имеется предрасположенность к злокачественным новообразованиям, определяемая как выявление онкологического заболевания одного и того же типа по меньшей мере у 2 близких родственников (определяемых как родители, родные братья, дети, бабушки и дедушки, тети, дяди, племянники) по одной и той же линии или более 1 типа онкологического заболевания у одного человека, который является близким родственником, или

**[00493]** наличие близких родственников, у которых был рак в молодом возрасте ( $<50$  лет), или близкого родственника с онкологическими заболеваниями, возникшими в обоих парных органах (например, в обеих почках), или более 1 онкологического заболевания в детском возрасте у родных братьев (сестер), или рака молочной железы у родственника мужского пола, или рака, возникающего во многих поколениях (например, у дедушки, отца, сына).

**[00494]** Наличие в анамнезе аномальных или положительных результатов стандартных скрининговых тестов на рак (например, простат-специфический антиген [ПСА] для мужчин, мазок по Папаниколу [PAP] или маммограмма для женщин).

**[00495]** Генетические синдромы, которые предрасполагают к развитию онкологических заболеваний (например, BRCA1 и BRCA2, синдром Линча, врожденные

семейные полипозы, синдром Ли - Фраумени и множественные эндокринные неопластические синдромы).

**[00496]** Аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) превышает верхнюю границу нормального диапазона (ВГН) клинической лаборатории при скрининге или при госпитализации на -2-й день.

**[00497]** Общий билирубин превышает ВГН в 1,5 раза (т. е. составляет 1,5 x ВГН), чтобы учитывать несколько повышенные концентрации билирубина у пациентов с синдромом Жильбера (безвредная врожденная негемолитическая гипербилирубинемия низкой степени, обусловленная полиморфизмом UGT1A1).

**[00498]** Гемоглобин, гематокрит или эритроциты на уровне ниже нижней границы нормального диапазона клинической лаборатории при скрининге или при госпитализации на -2-й день.

**[00499]** Аномальный уровень глюкозы в крови натощак (т. е.  $>125$  мг/дл, или  $>6,9$  ммоль/л; матричная плазма из пробы венозной крови) и/или гемоглобина A1c (HbA<sub>1c</sub>) (т. е.  $>6,4\%$  [высокоэффективная жидкостная хроматография], или  $>42$  ммоль/моль Hb) при скрининге или на 2-й день. Измерения глюкозы в крови могут повторяться во время периода скрининга в случае подозрений на несоблюдение режима питания в обязательный период голодания в течение ночи.

**[00500]** Уровень креатинина в сыворотке выше ВГН нормального диапазона клинической лаборатории при скрининге или при госпитализации на -2-й день.

**[00501]** Уровни тиреотропного гормона (ТТГ) находятся за пределами нормального диапазона клинической лаборатории при скрининге.

**[00502]** Прием любых запрещенных препаратов (перед исследованием и в качестве сопутствующей терапии) в течение периода до 30 дней перед запланированной первой дозой исследуемого лекарственного средства.

**[00503]** Наличие в анамнезе наркотической зависимости или алкогольной зависимости в соответствии с критериями «Руководства по диагностике и статистическому учету психических расстройств» (5-е издание) (DSM-V) в течение 2 лет до скрининга или положительный (-ые) результат (-ы) теста на алкоголь или наркотическую зависимость (включая, без ограничений, барбитураты, опиаты, кокаин, каннабиноиды, амфетамины и бензодиазепины) на скрининге или при госпитализации на -2-й день.

**[00504]** Наличие подтвержденных аллергий, гиперчувствительности или непереносимости любого из эксципиентов FP2 (см. раздел 2.3 «Информация о составе» IV).

**[00505]** Донорство крови или препаратов крови (приблизительно 450 мл) или потеря значительного количества крови в течение 2 месяцев перед первым введением исследуемого лекарственного средства.

**[00506]** Получение экспериментального лекарственного средства (включая экспериментальные вакцины) или применение инвазивного экспериментального медицинского изделия в течение одного месяца или в течение периода времени, не превышающего 10-кратный период полужизни лекарственного средства, в зависимости от

того, что дольше, перед запланированным введением первой дозы исследуемого лекарственного средства.

**[00507]** Беременность или грудное вскармливание либо планирование беременности во время участия в данном исследовании или в течение 12 недель после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.

**[00508]** Планирование мужчиной зачатия ребенка во время участия в этом исследовании или в течение 12 недель после последней дозы исследуемого лекарственного средства.

**[00509]** Наличие в анамнезе положительного теста на поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) или антитела к гепатиту С (антитела к ВГС) либо другого клинически активного заболевания печени или положительный результат тестов на HBsAg или антитела к ВГС при скрининге.

**[00510]** Наличие в анамнезе положительного результата теста на антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) или положительный результат на ВИЧ при скрининге.

**[00511]** Крупное хирургическое вмешательство (например, требующее общей анестезии) в течение 6 месяцев перед скринингом, или отсутствие полного восстановления после вмешательства, или плановое хирургическое вмешательство в то время, когда пациент предположительно должен будет участвовать в исследовании или в течение 12 недель после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства. Примечание. К участию допускаются пациенты с плановыми хирургическими вмешательствами, которые проводятся под местной анестезией, с согласия исследователя.

**[00512]** Субъекты курят сигареты (или эквивалентные изделия) и/или применяли изделия на основе никотина в течение 3 месяцев перед введением исследуемого лекарственного средства или они продемонстрировали положительный результат теста на котинин при скрининге или при госпитализации на -2-й день.

**[00513]** Употребление в среднем более 1200 мл (т. е. 5 чашек, совокупный общий объем) чая/кофе/какао/колы/кофеин-содержащих напитков (например, энергетического напитка) в день.

**[00514]** Субъекты, которые являются вегетарианцами или веганами, имеют пищевые аллергии или непереносимости пищевых продуктов.

**[00515]** Психологические и/или эмоциональные проблемы, которые могут привести к аннулированию информированного согласия или ограничивают способность субъекта соблюдать требования исследования.

**[00516]** Субъект не может или не желает подвергаться множеству венепункций в связи с плохой переносимостью или отсутствием легкого доступа к венам.

**[00517]** Какое-либо состояние, в связи с которым, по мнению исследователя, участие не будет лучшим решением для данного пациента (например, ухудшит благополучие) или которое может препятствовать, ограничивать или искажать указанные в протоколе исследования.

**[00518]** Сотрудники спонсора, исследователя или исследовательского центра,

непосредственно участвующие в предполагаемом исследовании или в других исследованиях под руководством исследователя или исследовательского центра, а также члены семей сотрудников, исследователя или спонсора.

**[00519]** Субъект проживает в учреждении по распоряжению суда или органа власти.

**[00520]** Рандомизация в предыдущую дозовую группу данного исследования.

#### **[00521] 4.3. Запреты и ограничения**

**[00522]** Потенциальные субъекты должны будут демонстрировать готовность и способность придерживаться следующих запретов и ограничений в ходе исследования для того, чтобы иметь право на участие в нем:

**[00523]** Соглашаются соблюдать все требования, которые необходимо соблюдать во время исследования, как указано в критериях включения и исключения (например, требования по использованию противозачаточных средств).

**[00524]** Тяжелая физическая нагрузка может влиять на указанные в исследовании анализы и результаты лабораторных исследований безопасности; по этой причине следует избегать тяжелой физической нагрузки (например, бег на большие расстояния (5 км/день), подъем веса или любая физическая активность, к которой субъект не привык), начиная с 3 (трех) дней перед скринингом, на протяжении всего исследования и до завершающего посещения.

**[00525]** Субъектам будет рекомендовано не становиться донором крови в течение по меньшей мере 3 месяцев после завершения (т. е. завершающего посещения) исследования.

**[00526]** Употребление алкоголя или спиртосодержащих продуктов не допускается, начиная по меньшей мере с 24 часов перед скринингом и перед госпитализацией в CRU на -2-й день и до окончания периода госпитализации на 5-й день и, по меньшей мере, за 24 часа перед совершением всех остальных амбулаторных посещений. На протяжении остальных дней исследования потребление спирта должно составлять не более 24 грамм в день у мужчин (т. е. 0,5 л пива в день, или 0,25 л вина в день, или 3 рюмки [2 сантитра в одной рюмке] ликера в день) и 12

**[00527]** грамм в день у женщин (т. е. 0,25 л пива в день, или 0,125 л вина в день, или 1,5 рюмки [2 сантитра в одной рюмке] ликера в день).

**[00528]** Субъектам нельзя употреблять какие-либо пищевые продукты или напитки, содержащие грейпфрутовый сок, горькие апельсины (включая любой апельсиновый джем) или хинин (например, тоник), начиная с 48 часов до 1-го дня и вплоть до 5-го дня (конец периода госпитализации).

**[00529]** Субъекты будут воздерживаться от применения любых метилксантин-содержащих изделий (например, шоколадных батончиков или напитков, кофе, чая, колы или энергетических напитков), начиная с 48 часов до введения исследуемого лекарственного средства в 1-й день и вплоть до 5-го дня. В другие дни между скринингом и посещением для последующего наблюдения субъектам будет предписано не пить в среднем более 1200 мл чая/кофе/какао/колы (5 чашек, совокупный общий объем) в день.

**[00530]** Субъектам будет предписано воздержаться от употребления мака, по

меньшей мере, за 72 часа до госпитализации в CRU, поскольку это может повлиять на результаты скрининга на наркотические препараты.

**[00531]** Курение сигарет (или эквивалентных изделий) и/или применение препаратов на основе никотина не допускается, начиная с 3 месяцев перед введением исследуемого лекарственного средства и до совершения завершающего посещения.

**[00532]** Во время стационарной фазы субъекты не будут употреблять никаких продуктов питания или напитков, кроме предоставленных сотрудниками исследовательского центра.

**[00533]** Согласие на соблюдение требований к контрацепции, как указано в критериях включения. Отсутствуют сведения о влиянии FP2 на сперму или ее продукцию в организме, а также о влиянии на развитие плода. Важно, чтобы субъект или партнерши субъекта не забеременели в ходе исследования или в течение 3 месяцев после исследования. Субъекты должны сообщить исследователю в случае, если их партнерша забеременела в ходе исследования или в течение 3 месяцев после завершения исследования (т. е. до завершающего посещения).

## 5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МАСКИРОВКА

### **[00534]** Часть 1

**[00535]** Все субъекты, пригодные для участия в исследовании, будут рандомизированы перед введением исследуемого лекарственного средства в 1-й день. Сформированный компьютером график рандомизации будет предоставлен спонсором и храниться в аптеке CRU.

**[00536]** В пределах каждой DG субъекты будут случайным образом распределены в группу активного лечения (FP2) или плацебо на основании сформированного компьютером графика рандомизации, подготовленного спонсором или под его руководством перед исследованием. Рандомизация будет сбалансирована посредством применения рандомизации внутри блоков. В пределах каждой DG всего 6 субъектов получают FP2 и 2 субъекта получают плацебо. В случае DG в части 1, которая будет соответствовать части 2, будут включены 4 женщины и 4 мужчины с рандомизацией 3 : 1 (3 FP2 и 1 плацебо) для каждого пола.

**[00537]** В каждой DG субъекты будут разделены на 4 подгруппы ( $n$ =не более 2/подгруппа) с введением дозы в разные дни. В 1-й день в каждой DG первую подгруппу (пробная группа) из 2 субъектов случайным образом распределят для получения FP2 или плацебо в соотношении 1 : 1, и им введут дозу приблизительно в одно и то же время в один и то же день для оценки безопасности и переносимости в течение 72 часов. Информация о любых НЯ, зарегистрированных/наблюдаемых у субъектов, получивших дозу в первой подгруппе, которые могут повлиять на введение дозы остальным субъектам в DG, будет передана спонсору перед рандомизацией и введением дозы дополнительным субъектам. Остальные 6 субъектов (1 плацебо, 5 FP2) будут случайным образом распределены либо в группу FP2, либо в группу плацебо в соотношении 5 : 1 (5 FP2 и 1 плацебо). После введения дозы пробным субъектам в каждой DG остальные 6 субъектов получают дозу в течение

приблизительно 3 дней (с интервалом по меньшей мере 24 часа) в группах по 2 (введение дозы с интервалом приблизительно 2 часа).

**[00538]** Фармацевт в CRU, которому известна информация о рандомизации, подготовит дозы исследуемого препарата для отдельных субъектов в соответствии со схемой рандомизации, прикрепит замаскированную этикетку перед введением и замаскирует шприц для предотвращения случайной демаскировки по цвету раствора. Введение исследуемого лекарственного средства будет выполнять персонал исследования, не принимающий участия ни в каких оценках безопасности в рамках исследования. Исследователю будет предоставлен запечатанный код рандомизации для каждого субъекта, содержащий кодированные данные об исследуемом лекарственном средстве. Эти запечатанные коды будут храниться вместе в зоне с ограниченным доступом, в которую можно попасть в любое время суток. Все коды рандомизации, открытые или запечатанные, будут собраны после завершения участия субъекта в исследовании.

**[00539]** Обращение с данными, которые могут потенциально раскрыть распределение исследуемого лекарственного средства (т. е. концентрации исследуемого лекарственного средства в сыворотке, данные об антителах к лекарственному средству FP2, данные о подготовке/учете исследуемого лекарственного средства, назначение лечения), будет осуществляться с особой осторожностью, чтобы сохранить маскировку и свести к минимуму вероятность ошибки. Это может включать соблюдение специальных норм, таких как сокрытие представляющих интерес данных от исследователей, специалистов клинического исследования или других лиц в случае необходимости до времени блокировки базы данных и раскрытия сведений. Любой доступ к ФК данным исследовательского центра или специалистов исследования будет анонимизирован (т. е. в случае запроса данных отдельных субъектов будут получены только данные на уровне группы и/или фиктивные номера субъектов).

**[00540]** При нормальных обстоятельствах сведения не должны раскрываться до тех пор, пока все субъекты не завершат исследование и база данных не будет окончательно завершена. В противном случае сведения по отдельному субъекту исследования могут быть раскрыты, только если от информации о статусе лечения субъекта будет зависеть конкретное неотложное лечение/порядок действий. В таких случаях исследователь может в экстренном порядке идентифицировать исследуемое лекарственное средство, открыв запечатанный код. Рекомендуется, чтобы исследователь по возможности связывался со спонсором или его представителем для обсуждения конкретной ситуации, прежде чем раскрывать сведения. Телефонный разговор со спонсором или его представителем будет доступен 24 часа в сутки, 7 дней в неделю. В случае раскрытия замаскированных сведений спонсор будет проинформирован как можно скорее. Дата, время и причина демаскировки будут зарегистрированы в первичном документе.

**[00541]** Субъекты, для которых было раскрытое назначенное им исследуемое лекарственное средство, должны продолжать совершать посещения для выполнения плановых оценок.

**[00542]** В целом, коды рандомизации будут полностью раскрыты только после завершения исследования и закрытия клинической базы данных. Тем не менее для открытого анализа DRC коды рандомизации и, при необходимости, расшифровка кодов рандомизации для получения информации о группах лечения и группах плацебо будут раскрываться уполномоченным лицам.

## **[00543] Часть 2**

**[00544]** Поскольку часть 2 является открытой с одним типом лечения, а все субъекты получают одну и ту же в/в дозу FP2, рандомизация или другие специальные условия для назначения лечения не требуются.

**[00545]** Субъекты будут выбраны так, чтобы они соответствовали отдельным субъектам из эталонной группы п/к дозы в части 1 исследования в отношении пола, возраста ( $\pm 5$  лет) и массы тела ( $\pm 5$  кг).

## **[00546] Части 1 и 2**

**[00547]** В обеих частях 1 и 2 и в каждой DG на -2-й день будут госпитализированы по меньшей мере 2 дополнительных резервных субъекта, которые будут проходить все исследования, необходимые для дальнейшего введения дозы, чтобы обеспечить рандомизацию полной дозовой группы.

**[00548]** Номера рандомизации будут последовательно назначены пригодным для участия субъектам, начиная с 1001 в части 1 и 3001 в части 2. В качестве замены в исследование могут быть включены дополнительные субъекты, чтобы обеспечить, что в части 1 по меньшей мере 7 субъектов в каждой дозовой группе по меньшей мере завершат процедуры, выполняемые в течение 72 часов после введения дозы исследуемого препарата, а в части 2 6 субъектов завершат процедуры исследования в течение периода времени, эквивалентного по меньшей мере 2 периодам полужизни FP2 (определяемым на основе ФК данных для предыдущих дозовых групп в части 1). Сменные субъекты будут получать такое же лечение, что и заменяемые ими субъекты, и им будет присвоен новый номер рандомизации, который будет идентичен номеру рандомизации заменяемого субъекта, но первая цифра будет заменена на «2» в части 1 и на «4» в части 2. Например, субъект 1004 будет заменен на субъекта 2004 в части 1, а субъект 3006 будет заменен на субъекта 4006 в части 2. В части 2 все субъекты будут получать FP2 без маскировки.

## **6. ДОЗА И СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ**

### **[00549] 6.1. Исследуемое лекарственное средство**

**[00550]** FP2 поставляется в виде стерильного раствора для инъекций, который будет храниться при температуре  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  и будет защищен от света. Раствор имеет желто-коричневый цвет, а концентрация FP2 составляет 50 мг/мл в 10 мМ фосфата натрия, 8% сахарозы и 0,04% полисорбата 20 при pH 6,5. FP2 поставляется в замороженном виде в стеклянных флаконах R2 объемом 1,2 мл (таблица 68).

**[00551]** Буферный раствор, применяемый в составе FP2, будет поставляться для данного исследования для применения в качестве плацебо и также в качестве разбавителя при получении начальных доз FP2 для п/к введения (DG 1-DG 4). Это стерильный

прозрачный раствор, содержащий 10 мМ фосфата натрия, 8,0% сахарозы и 0,04% полисорбата 20. Буферный раствор будет применяться для получения инъекций плацебо. Буферный раствор поставляется в замороженном виде в стеклянных флаконах R2 объемом 1,2 мл.

**[00552]** Таблица 68. Описание исследуемых лекарственных средств

|                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Активное соединение:</b> | FP2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <b>Дозированные формы</b>   | Раствор 50 мг/мл для п/к инъекции и кратковременной в/в инфузии.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Разбавитель:</b>         | Буферный раствор, содержащий 10 мМ фосфата натрия, 8,0% сахарозы и 0,04% полисорбата 20.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Концентрации:</b>        | Для п/к введений состав FP2 будут восстанавливать соответствующим объемом буферного раствора с получением разведений 0,5 мг/мл (DG 1), 5,0 мг/мл (DG 2 и DG 3) и 10,0 мг/мл (DG 4); также будет применяться неразбавленный состав с концентрацией 50 мг/мл (DG 5, DG 6, DG 7).<br>Для в/в введения состав FP2 будут разводить соответствующим объемом буферного раствора с получением разведения 10,0 мг/мл. |
| <b>Плацебо (часть 2):</b>   | Буферный раствор, содержащий 10 мМ фосфата натрия, 8,0% сахарозы и 0,04% полисорбата 20.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

**[00553]** Из-за различий во внешнем виде лекарственного препарата FP2 (желто-коричневый раствор) и плацебо (прозрачный бесцветный раствор) фармацевт, который владеет информацией о рандомизации, будет следовать инструкциям в руководстве по обращению с исследуемым лекарственным препаратом (IMP) для поддержания слепого дизайна исследования и предотвращения визуального контакта с препаратом персонала исследования и субъектов в части 1.

**[00554]** Подробные инструкции по подготовке дозы, процедурам дозирования и условиям хранения исследуемого лекарственного средства будут предоставлены исследовательскому центру отдельно в дополнительном руководящем документе.

**[00555] Дозирование во время части 1**

**[00556]** Исследуемое лекарственное средство будет вводиться назначенным, обученным и квалифицированным специалистом исследовательского центра, который не зависит от специалистов клинического исследования и не участвует в каком-либо другом аспекте проведения клинического исследования. После голодания в течение ночи (по меньшей мере 10 часов) исследуемое лекарственное средство (FP2 или плацебо) будут вводить с применением инсулиновых шприцев объемом 1,0 мл (DG 1, DG 2 и DG 5) или шприцев объемом 2,0 мл (DG 3, DG 4, DG 6 и DG 7) в виде однократной п/к дозы (максимальный объем 2 мл) в правый нижний квадрант живота в 1-й день. В каждой



дозовой группе субъекты будут разделены на 4 подгруппы ( $n$ =не более 2/подгруппа) с введением дозы в разные дни. Двум пробным субъектам будут первым вводить дозу (1 плацебо, 1 FP2) в один и тот же день в примерно одно и то же время и будут наблюдать за ними в течение 72 часов для оценки безопасности, после чего дозу смогут получить следующие субъекты в DG. После анализа маскированных данных по безопасности введение дозы может выполняться максимум 2 дополнительным субъектам в день с разнесением по времени (с интервалом приблизительно 2 часа, введение дозы одному субъекту в ~7 часов утра, а второму субъекту - в ~9 часов утра) до тех пор, пока не будет завершено введение дозы всем субъектам в дозовой группе.

**[00557]** Нулевой (0) момент времени представляет собой момент инъекции исследуемого лекарственного средства.

**[00558]** Все п/к инъекции будут выполнены на передней брюшной стенке, избегая области размером 2 дюйма ( $\square$ 5 см) вокруг пупка. Перед выполнением инъекции ответственный персонал исследовательского центра будет проверять/пальпировать планируемый участок инъекции. Инъекции не следует выполнять в область брюшной стенки с признаками патологии.

**[00559]** Во время введения исследуемого лекарственного средства в кабинете, в котором выполняется инъекция, постоянно будет находиться врач, специализирующийся и имеющий опыт работы в сфере реаниматологии и реанимационного оборудования (в том числе готовые к применению лекарственные средства для купирования анафилактических реакций).

#### **[00560] Дозирование во время части 2**

**[00561]** Однократную дозу FP2 будут вводить в виде инфузии с постоянной скоростью в течение 30 минут с помощью автоматического инфузионного устройства (Braun Perfusor® Compact S или эквивалентного устройства) посредством постоянного катетера в приемлемую вену предплечья посредством отдельной магистрали с применением инфузионной системы с фильтром. Дозирование будет выполняться приблизительно в одно и то же время каждый день, но с разнесением по времени (один субъект в день в ~7 часов утра и один субъект в ~9 часов утра). Сначала доза будет введена двум пробным субъектам, а следующим 2 субъектам доза будет введена по меньшей мере через 24 часа после введения 2 пробным субъектам, после чего через 24 часа лечение получат последние 2 субъекта. Сначала дозу вводят одному пробному субъекту, а затем наблюдают за ним в течение 72 часов, после чего дозу смогут получить следующие субъекты. Остальные 5 субъектов будут разделены на подгруппы (дозировка с интервалом по меньшей мере 24 часа) так, чтобы в день доза была введена не более 2 субъектам (с интервалом приблизительно 2 часа).

**[00562]** Нулевой (0) момент времени представляет собой время начала в/в инфузии исследуемого лекарственного средства.

**[00563]** Поскольку для в/в введения FP2 не предусмотрено сравнения с плацебо, не требуются меры по маскировке исследуемого лекарственного средства.

**[00564]** Во время введения исследуемого лекарственного средства в кабинете, в котором выполняется инъекция, постоянно будет находиться врач, специализирующийся и имеющий опыт работы в сфере реаниматологии и реанимационного оборудования (в том числе готовые к применению лекарственные средства для купирования анафилактических реакций).

**[00565]** Возможны технические проблемы, требующие временного прекращения введения исследуемого лекарственного средства (например, неисправность постоянного катетера и необходимость установки нового катетера). В этом случае инфузию можно возобновить как можно быстрее, а время прекращения и соответствующую причину необходимо зарегистрировать в документации.

## 7. СОБЛЮДЕНИЕ РЕЖИМА ЛЕЧЕНИЯ

**[00566]** Исследуемое лекарственное средство будет вводить квалифицированный персонал исследовательского центра в виде п/к инъекции (часть 1) или в виде в/в инфузии (часть 2), и подробные сведения о каждом введении будут по мере необходимости регистрировать в электронной системе сбора данных [часть 1 п/к: дата инъекции, время инъекции, объем вводимой дозы, участок инъекции; часть 2 в/в: время начала и окончания в/в инфузии и объем инфузии].

## 8. ПРЕДШЕСТВУЮЩАЯ И СОПУТСТВУЮЩАЯ ТЕРАПИЯ

**[00567]** Будут фиксироваться предшествующие виды терапии, проводимые в течение 30 дней перед введением первой дозы исследуемого лекарственного средства. В исследовании запрещены любые виды лекарственного лечения (рецептурные или безрецептурные лекарственные средства, включая вакцины, витамины, минеральные добавки, пищевые добавки, растительные добавки [включая зверобой, чесночный экстракт и травяные чаи]) в течение 30 дней до запланированной первой дозы исследуемого лекарственного средства и во время исследования, за исключением парацетамола. Если в ходе исследования возникнет необходимость получения субъектом рецептурных или безрецептурных лекарственных средств, он может быть включен в исследование или может продолжить участие в исследовании с согласия и одобрения спонсора (или назначенного им лица) и главного исследователя.

**[00568]** Если возникнет необходимость в назначении какой-либо сопутствующей терапии, это будет указано в соответствующем разделе электронной индивидуальной регистрационной карты (eCRF). Зафиксированная информация будет включать описание лекарственного средства, продолжительности лечения, схемы дозирования, способа введения и показание.

**[00569]** В течение 3 дней перед введением каждого исследуемого лекарственного средства допускается применение парацетамола. В течение всего исследования для лечения головной боли или другого вида боли будет разрешено принимать максимум три дозы по 500 мг парацетамола в день, но не более 3 г в неделю.

**[00570]** Сопутствующие виды терапии будут регистрироваться на протяжении всего исследования, начиная с введения первой дозы исследуемого лекарственного средства и до

завершающего посещения. Сопутствующие виды терапии также следует регистрировать после завершающего посещения, если они назначаются в связи с появлением новых или ухудшением существующих нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений, которые соответствуют критериям.

## 9. ОЦЕНКИ В РАМКАХ ИССЛЕДОВАНИЯ

### [00571] 9.1. Процедуры исследования

#### [00572] 9.1.1. Обзор

[00573] В графике мероприятий приведена сводная информация о частоте и времени измерений ФК, иммуногенности, ФД, поискового биомаркера, фармакогеномных параметров и показателей безопасности, применимых к данному исследованию.

[00574] Время приема пищи и заполнения анкет с VAS указаны в графике мероприятий «Прием пищи и анкетирование по VAS».

[00575] Если на один и тот же момент времени запланировано множество исследований и/или если на тот же момент времени, что и прием пищи, запланированы одно или более исследований, рекомендуется выполнять процедуры в следующей последовательности: основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, ФК, забор крови, анкеты с VAS для оценки аппетита, анкеты с VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи (после первого куса пищи). Забор крови для оценок ФК следует выполнять как можно ближе к установленному времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени, что и оценку ФК, образец для ФК необходимо брать сразу же после завершения ЭКГ. При необходимости другие измерения могут быть выполнены раньше установленных моментов времени. Порядок выполнения множества исследований в один и тот же момент времени должен быть одинаковым на протяжении всего исследования. Фактические даты и время проведения исследований будут зарегистрированы в первичной документации и eCRF.

[00576] Когда это возможно, основные показатели жизнедеятельности (т. е. артериальное давление [АД], частота сердечных сокращений [ЧСС]) должны регистрироваться на противоположной руке по отношению к той, из которой берут пробы крови (за исключением времени в/в инфузии).

[00577] Исследование на беременность будет выполняться у всех женщин при скрининге и на протяжении всего исследования. Исследование сыворотки на беременность при скрининге и исследование мочи на беременность будут выполняться во все другие моменты времени по графику мероприятий.

[00578] **Таблица 69. Объем крови, отбираемый у каждого субъекта (часть 1 и часть 2 исследования)**

| Тип пробы                           | Приблизительный объем пробы (мл) | Количество проб субъекта | Приблизительный общий объем крови (мл) <sup>a</sup> |       |
|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
|                                     |                                  |                          | на проб                                             | общий |
| Лабораторные параметры безопасности |                                  |                          |                                                     |       |
| - Гематология                       | 3                                | 14                       |                                                     | 42    |

|                                                                       |     |    |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|----|-----|
| - Биохимическое исследование                                          | 5   | 14 | 70  |
| - Коагуляция                                                          | 3   | 14 | 42  |
| - Липидная панель                                                     | 3   | 5  | 15  |
| Биохимические показатели сыворотки <sup>b</sup>                       |     |    |     |
| - Серологические показатели (ВИЧ, гепатит)                            | 5   | 1  | 5   |
| - Исследование сыворотки на беременность ( $\beta$ -ХГЧ) <sup>c</sup> | 5   | 1  | 5   |
| ТТГ                                                                   | 3   | 1  | 3   |
| ФСГ <sup>c</sup>                                                      | 3   | 1  | 3   |
| НbA1 <sub>c</sub>                                                     | 3   | 1  | 3   |
| Фармакокинетические пробы                                             | 3   | 20 | 60  |
| Иммуногенность                                                        | 7,5 | 4  | 30  |
| Пробы поискового биомаркера                                           | 3   | 9  | 27  |
| Фармакогеномная проба <sup>a</sup>                                    | 10  | 1  | 10  |
| Приблизительный общий объем <sup>e</sup>                              |     |    | 315 |

<sup>a</sup> Рассчитывается как число проб, умноженное на объем крови на пробу.

<sup>b</sup> Биохимические исследования сыворотки включают серологические показатели (HbAg, антитела к ВГС, антитела к ВИЧ 1 и 2) и исследования сыворотки на беременность ( $\beta$ -ХГЧ).

<sup>c</sup> Только у субъектов женского пола.

<sup>d</sup> Пробы крови собирают только у субъектов, которые согласились предоставить необязательную пробу ДНК для исследования.

<sup>e</sup> Повторные или незапланированные пробы можно брать из соображений безопасности или из-за технических проблем с пробами. Примечание. Для сбора проб крови можно применять постоянную внутривенную канюлю. [При применении мандрена (обтуратора) потеря крови из-за извлечения не ожидается.]

**[00579]** Эти объемы можно корректировать в конечных лабораторных руководствах, но максимальное количество крови, взятой у каждого субъекта в данном исследовании, не должно превышать 500 мл (что позволяет изменять размер или доступность трубки для взятия крови). При необходимости можно собирать дополнительные пробы крови для дополнительной оценки безопасности, иммуногенности или ФК на основании новых данных, но общий объем крови, собранный у отдельного пациента во время данного исследования, не будет превышать количества, указанного в данном протоколе исследования, без предварительного одобрения Независимого комитета по этике (ИЕС) и органа здравоохранения. По соображениям безопасности или в связи с техническими проблемами с пробами повторные или внеплановые пробы могут быть взяты без предварительного одобрения ИЕС и органов здравоохранения.

**[00580]** Для каждого субъекта максимальное количество крови, взятой в данном исследовании, не будет превышать 500 мл. Общий объем крови, собранный у каждого субъекта, будет составлять приблизительно 315 мл.

**[00581] 9.1.2. Период скрининга (части 1 и 2)**

**[00582]** Потенциальные субъекты совершат скрининговое посещение в течение 28 дней перед введением исследуемого лекарственного средства в 1-й день для определения пригодности субъектов к участию в исследовании. Если субъект удовлетворяет критериям регистрации в исследовании, он/она будет госпитализирован (-а) в CRU на -2-й день.

**[00583]** До проведения любой процедуры исследования PI (или назначенный сотрудник исследования) ознакомит с письменной ICF каждого субъекта и предоставит разъяснения. Процедуры исследования (включая голодание перед проведением лабораторных исследований) нельзя выполнять до тех пор, пока субъект не подпишет ICF. Во время скрининговых посещений все субъективные оценки следует проводить перед любыми тестами, процедурами или консультациями, чтобы отсеять субъектов, не соответствующих какому-либо из этих критериев регистрации.

**[00584]** Исследователь (или назначенный персонал исследования) также ознакомит с письменной ICF и предоставит разъяснения в отношении необязательных генетических исследовательских проб перед взятием проб крови для фармакогеномного анализа.

**[00585]** Информация обо всех нежелательных явлениях, серьезных или несерьезных, будет передаваться с момента получения подписанной и датированной формы информированного согласия и до последней процедуры исследования во время завершающего посещения, а также путем прямого опроса в определенные моменты времени. (См. график мероприятий).

**[00586]** Повторное тестирование в случае получения аномальных значений, которые могут привести к исключению из исследования, можно проводить только один раз. Повторную проверку можно проводить во время незапланированного посещения. Если какие-либо скрининговые тесты повторяются, их результаты будут соответствовать требованиям к пригодности к участию и будут доступны исследователю перед госпитализацией в CRU (например, -2-й день).

**[00587] 9.1.3. Период стационарного лечения (части 1 и 2)****[00588] -2-й и -1-й дни (исходный уровень)**

**[00589]** Подходящие субъекты будут госпитализированы в CRU на -2-й день, и им будут выполнены исследования на исходном уровне для оценки безопасности (-2-й день) и снята ЭКГ исходного уровня (согласованное по времени с ЭКГ в 1-й день) в -1-й день, как установлено в графике мероприятий. В -1-й день у субъектов также в течение 24 часов будут измерять потребление пищи, и они будут заполнять анкеты с VAS для оценки аппетита и вкусовой привлекательности пищи.

**[00590] День 1/рандомизация и дозирование**

**[00591]** После подтверждения того, что все критерии для участия в исследовании были соблюдены, пригодные для участия субъекты будут рандомизированы в 1-й день непосредственно перед введением исследуемого лекарственного средства.

**[00592]** Исследуемое лекарственное средство будут вводить под наблюдением PI или уполномоченного им лица. Подробные сведения и время выполнения процедур

исследования представлены в графике мероприятий.

**[00593]** При каждом уровне дозы в части 1 и в части 2) субъекты будут разделены на подгруппы, и им будут вводить дозу в разные дни так, что в день дозу получают не более 2 субъектов. Сначала доза будет введена двум пробным субъектам в части 1 (1 плацебо, 1 FP2) и 1 пробному субъекту в части 2 (FP2)), и за ними будет вестись наблюдение для оценки безопасности в течение 72 часов, после чего доза будет введена другим субъектам в данной дозовой группе. После анализа данных по безопасности доза будет вводиться максимум 2 дополнительным субъектам с разнесением по времени (с интервалом приблизительно 2 часа) в день до тех пор, пока всем субъектам не будет выполнено дозирование.

**[00594] 3-й-5-й дни**

**[00595]** В 3-й день измерение потребления пищи в течение 24 часов и проведение анкетирования по VAS будут повторены.

**[00596]** Субъекты будут оставаться в CRU для оценки безопасности, переносимости, ФК и ФД до утра 5-го дня, в который после завершения анализов исследования их можно будет выписывать.

**[00597] 9.1.4. Амбулаторный период (части 1 и 2)**

**[00598]** Субъекты возвратятся в CRU после периода голодания (по меньшей мере 10 часов) для оценки безопасности, переносимости, ФК, ФД и иммуногенности, как подробно описано в графике мероприятий. Совершение завершающего посещения является окончанием участия субъекта в исследовании. Следует предпринимать все разумные усилия, чтобы проводить амбулаторные посещения в установленные графиком моменты времени (т. е. в конкретный день для каждого посещения), но до посещения на 4-й неделе (28-й день) допустимо использование окна в пределах  $\pm 1$  день, а для оставшихся амбулаторных посещений до завершающего посещения допустимо окно в пределах  $\pm 3$  дня. Все последующие посещения следует планировать относительно даты первого введения дозы исследуемого лекарственного средства (1-й день), а не даты предыдущего запланированного посещения.

**[00599] Досрочное прекращение участия**

**[00600]** Если субъект выйдет из исследования по любой причине до окончания амбулаторного периода, следует выполнить исследования в рамках завершающего посещения.

**[00601] 9.2. Фармакокинетика и иммуногенность**

**[00602]** Периодически будут собирать пробы венозной крови, как указано в графиках мероприятий. Время отбора проб для оценки ФК можно скорректировать на основании предварительных данных по ФК из предшествующих дозовых групп (например, отбор проб в позднее время можно пропустить, если концентрации FP2 в сыворотке ниже нижнего предела количественного анализа [(LLOQ)]). Фактические дата и время каждого сбора проб крови для оценки иммуногенности (ADA) и ФК будут зарегистрированы в eCRF в электронной системе сбора данных. У преждевременно завершивших участие в

исследовании субъектов необходимо собрать пробы крови для завершающего исследования в момент выхода из исследования.

#### **[00603] 9.2.1. Оценки**

**[00604]** Пробы, собранные для анализа концентрации FP2 в сыворотке и антител к FP2, можно дополнительно применять для оценки аспектов безопасности или эффективности, позволяющих решить проблемы, возникающие во время или после периода исследования, для дополнительного изучения иммуногенности или для оценки соответствующих биомаркеров. Конфиденциальность субъекта будет сохранена.

#### **[00605] 9.2.2. Аналитические процедуры**

##### **[00606] Фармакокинетика**

**[00607]** Пробы сыворотки будут проанализированы для определения концентраций FP2 с помощью прошедшего валидацию, специфического и чувствительного способа иммуноанализа спонсором или под его наблюдением.

##### **[00608] Иммуногенность**

**[00609]** Обнаружение и определение характеристик антител к FP2 и потенциальных антител к эндогенному GDF15 в сыворотке будут проводиться с применением прошедшего валидацию способа анализа спонсором или под его наблюдением. Во всех пробах, собранных для обнаружения ADA, также будут оценивать сывороточную концентрацию FP2, чтобы обеспечить интерпретацию данных по антителам.

#### **[00610] 9.2.3. Фармакокинетические параметры**

**[00611]** Фармакокинетические параметры FP2 будут рассчитывать по графикам зависимости концентрации в сыворотке от времени, применяя некомпартментные анализы. Фармакокинетические параметры после однократного введения FP2 будут включать, помимо прочего, следующие:

**[00612]**  $C_{\max}$ : максимальная наблюдаемая концентрация в сыворотке.

**[00613]**  $T_{\max}$ : время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в сыворотке.

**[00614]**  $AUC_{\text{inf}}$ : площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нуля до бесконечности с экстраполяцией конечной фазы.

**[00615]**  $AUC_{\text{last}}$ : площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени от нуля до момента, соответствующего последней поддающейся количественному определению концентрации.

**[00616]**  $T_{1/2}$ : конечный период полужизни.

**[00617]** CL: общий системный клиренс (только для в/в введения).

**[00618]** CL/F: кажущийся общий системный клиренс после внесосудистого введения (только для п/к введения).

**[00619]**  $V_z$ : объем распределения, основанный на конечной фазе (только для в/в введения).

**[00620]**  $V_z/F$ : кажущийся объем распределения на основании конечной фазы после внесосудистого введения (только для п/к введения).

**[00621]** F (%): абсолютная п/к биодоступность, которая будет рассчитываться как доля введенной дозы, присутствующая в системном кровотоке, выраженная в процентах. Абсолютная биодоступность рассчитывается с применением приведенного ниже уравнения:

$$\text{[00622]} \text{ (}\% \text{)} = \text{ , } \times \times \%$$

**[00623]** ,

#### **[00624] 9.2.4. Оценки иммуногенности**

**[00625]** Антитела к FP2 будут оценивать в пробах крови, взятых у всех субъектов по графику мероприятий. Кроме того, пробы крови также следует отбирать во время завершающего посещения у субъектов, которые выбыли из исследования. Эти пробы будут исследованы спонсором или лицом, назначенным спонсором.

**[00626]** Будет проведен скрининг проб крови на наличие антител, связывающихся с FP2, и будет зафиксирован титр подтвержденных положительных проб. Для дополнительного определения характеристик иммуногенности FP2 можно проводить другие анализы.

#### **[00627] 9.3. Фармакодинамические исследования**

**[00628]** Массу тела будут измерять дважды утром, до завтрака и после мочеиспускания, как подробно указано в графике мероприятий. Определение массы тела субъектов будет выполняться на калиброванных весах в больничной рубашке или легкой одежде без обуви.

**[00629]** Суточное потребление пищи будут оценивать в -1-й день и 3-й день на основании 4 приемов пищи (завтрак, обед, полдник и ужин), которые будут организованы одновременно в оба дня. Прием пищи будет стандартизирован в оба дня (идентичные приемы пищи в -1-й день и 3-й день). Приемы пищи также будут стандартизованы для разных субъектов таким образом, чтобы композиция и размер порции были одинаковыми для всех субъектов и были основаны на местных предпочтениях и рекомендациях согласно оценке диетологов исследования. Каждый элемент пищи будут взвешивать до и после употребления и рассчитывать и регистрировать в граммах потребление каждого пищевого продукта. Потребленные калории будут рассчитывать на основании потребленного количества в граммах каждого продукта питания и его пищевой ценности. Будут оценивать изменение суточного потребления калорий в с -1-го дня по 3-й день. В дни, когда потребление пищи не регистрируется (-2-й, 1-й, 2-й, 4-й и 5-й дни), каждый прием пищи (включая завтрак и полдник) должен отличаться от приема пищи, предоставленного в -1-й и 3-й дни.

**[00630]** Анкетирование по VAS для оценки аппетита (голод, жажда, тошнота и сытость) будут проводить каждый час в период бодрствования в -1-й день и 3-й день, каждые 3 часа в период бодрствования в 1-й, 2-й, 4-й и 5-й дни и непосредственно перед и в конце каждого приема пищи (с -1-го дня по 5-й день). Анкеты с VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи (которые могут указывать на возможное отвращение к пище) будут включать вопросы относительно приятности запаха, вкуса и текстуры пищи и будут



заполняться субъектами сразу же после того, как они съедят первый кусок основного блюда в каждом приеме пищи (с -1-го дня по 5-й день). Подробное описание моментов времени, в которые будут заполняться анкеты с VAS, см. в графике мероприятий «Прием пищи и анкетирование по VAS».

#### **[00631] 9.6. Оценки безопасности**

##### **[00632] 9.6.2. Клинические лабораторные тесты**

**[00633]** Будут собраны пробы крови натошак для определения биохимических, гематологических показателей, параметров свертывания крови, уровня липидов и пробы мочи для анализа мочи. Субъекты будут голодать в течение по меньшей мере 10 часов перед сбором всех проб для лабораторных исследований. Время проведения клинических лабораторных исследований указано в графике мероприятий. Исследователь изучит результаты лабораторных анализов, составит отчет по результатам и зарегистрирует любые клинически значимые изменения, возникшие в ходе исследования, в разделе «Нежелательные явления» в eCRF. Лабораторные отчеты будут поданы вместе с первичными документами.

**[00634]** В местной лаборатории будут выполнены следующие анализы:

##### **[00635] Гематологическая панель**

**[00636]** - гемоглобин - число тромбоцитов

**[00637]** - гематокрит - процент ретикулоцитов

**[00638]** - количество эритроцитов (RBC)

**[00639]** - количество лейкоцитов (WBC) с лейкоцитарной формулой

**[00640]** Примечание. Анализ лейкоцитов может включать в себя любые аномальные клетки, которые будут указаны лабораторией в заключении. Анализ эритроцитов может включать в себя патологические изменения количества эритроцитов, параметров эритроцитов или морфологии эритроцитов, которые будут указаны лабораторией в заключении. Кроме того, в заключении также будут указаны любые другие аномальные клетки, обнаруженные в мазке крови.

##### **[00641] Коагуляционная панель**

**[00642]** - активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) - протромбиновое время (ПТВ)

##### **[00643] Биохимическая панель**

|                |                                      |                                |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| <b>[00644]</b> | - натрий                             | - щелочная фосфатаза           |
| <b>[00645]</b> | - калий                              | - креатинфосфокиназа<br>(КФК)  |
| <b>[00646]</b> | - хлорид                             | - лактатдегидрогеназа<br>(ЛДГ) |
| <b>[00647]</b> | - бикарбонат                         | - мочевая кислота              |
| <b>[00648]</b> | - азот мочевины крови (АМК)- кальций |                                |
| <b>[00649]</b> | - креатинин                          | - фосфат                       |

- [00650] - глюкоза - альбумин
- [00651] - аспартатаминотрансфераза (АСТ)- общий белок
- [00652] - аланинаминотрансфераза (АЛТ) - магний
- [00653] - гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ)
- [00654] - общий билирубин
- [00655] - прямой билирубин\*
- [00656] \* Только в случае повышения общего билирубина
- [00657] **Липидная панель**
- [00658] - общий холестерин - холестерин липопротеинов высокой плотности  
(ЛПВП)
- [00659] - триглицериды - холестерин липопротеинов низкой плотности  
(ЛПНП)

**[00660] Общий анализ мочи**

Тест-полоска

- удельный вес
- pH
- глюкоза
- белок
- кровь
- кетоны
- билирубин
- уробилиноген
- нитрит
- лейкоцитарная эстераза

Осадок (при аномальном результате анализа с помощью тест-полоски)

- эритроциты
- лейкоциты
- эпителиальные клетки
- соли
- цилиндры
- бактерии

**[00661]** Если результат анализа с помощью тест-полоски является аномальным, для оценки осадка будет применяться микроскопия.

**[00662]** При микроскопическом исследовании в заключении лаборатории также могут быть указаны другие данные помимо наличия лейкоцитов, эритроцитов и цилиндров.

**[00663] Другие лабораторные исследования**

**[00664]** Следующее лабораторное исследование будет проведено в моменты времени, указанные на графике мероприятий:

**[00665]** Исследование мочи и сыворотки на беременность ( $\beta$ -ХГЧ) будет проводиться у всех женщин

**[00666]** ФСГ (только женщины), ТТГ и HbA1c

**[00667]** Серологические исследования (антитела к ВИЧ 1 и 2, HBsAg и антитела к ВГС

**[00668]** Исследование мочи на наркотические вещества (амфетамин, барбитураты, бензодиазепины, каннабиноиды, кокаин, опиаты, метадон) и котинин

**[00669]** Тест на алкоголь в выдыхаемом воздухе

### **[00670] 9.6.3. Электрокардиограмма**

**[00671]** Будут получены стандартные ЭКГ в 12 отведениях, как указано в графике мероприятий. Каждая ЭКГ будет распечатана и сохранена в медицинской карте субъекта в исследовательском центре. Кроме того, данные ЭКГ будут переданы в электронной форме в специализированную лабораторию ЭКГ (Nabios GmbH, г. Мюнхен) для централизованного анализа в соответствии с рекомендациями ICH E14. Информация о методе анализа ЭКГ, времени регистрации, доставке и формате результатов для совещаний по повышению дозы будет подробно представлена в отдельном руководстве по ЭКГ.

**[00672]** ЭКГ в 12 отведениях будут снимать трижды с интервалом менее 2 минут в каждый момент времени после нахождения субъектов в покое в положении лежа на спине в течение по меньшей мере 5 минут, не разговаривая и не двигая руками или ногами. Во время проведения ЭКГ субъекты должны пребывать в спокойном состоянии без отвлекающих факторов (например, телевидение, мобильные телефоны). Если на один и тот же момент времени запланировано множество исследований и/или если на тот же момент времени, что и прием пищи, запланированы одно или более исследований, рекомендуется выполнять процедуры в следующей последовательности: основные показатели жизнедеятельности, ЭКГ, ФК, забор крови, анкеты с VAS для оценки аппетита, анкеты с VAS для оценки вкусовой привлекательности пищи (после первого куса пищи). Забор крови для оценок ФК следует выполнять как можно ближе к установленному времени. При выполнении ЭКГ в тот же момент времени, что и оценку ФК, образец для ФК необходимо брать сразу же после завершения ЭКГ. При необходимости другие измерения могут быть выполнены раньше установленных моментов времени. Порядок выполнения множества исследований в один и тот же момент времени должен быть одинаковым на протяжении всего исследования.

**[00673]** ЭКГ будут выполнять трижды в каждый запланированный момент времени для более точных оценок изменения интервала QTc. ЭКГ, полученные в -1-й день, должны быть согласованы по времени с ЭКГ, полученными в 1-й день. В каждый момент времени, в который требуется выполнять ЭКГ трижды, необходимо последовательно с наименьшим возможным интервалом, не более 2 минут, получить 3 отдельных ЭКГ. Полный набор трехкратных ЭКГ должен быть получен менее чем за 4 минуты.

**[00674]** Среднее значение трех измерений в каждый момент времени в -1-й день будет являться согласованным по времени исходным значением для каждого субъекта для соответствующих параметров в 1-й день.

**[00675]** Помимо процесса центральной расшифровки ЭКГ за пределами исследовательского центра каждая ЭКГ должна быть проанализирована после получения квалифицированным врачом исследовательского центра для выявления данных, возможно, имеющих значение с точки зрения клинической безопасности (например, удлинение интервала QTc). Любые патологические результаты и соответствующие медицинские вмешательства (при наличии) будут зарегистрированы в eCRF.

### **[00676] 9.6.4. Непрерывный мониторинг ЭКГ во II отведении (только часть 2)**

**[00677]** Непрерывный контроль ЭКГ во II отведении будет проводиться только в части 2 в 1-й день с 30 минут до начала в/в инфузии и в течение 2 часов после завершения инфузии. На усмотрение исследователя (или представителя) продолжительность непрерывного мониторинга ЭКГ во II отведении может быть увеличена. Эти данные предназначены для визуального мониторинга в режиме реального времени, и любая патология, обнаруженная устройством мониторинга ЭКГ или исследователем, будет распечатана и сохранена в виде первичных данных. Внеплановое измерение ЭКГ в 12 отведениях также следует выполнять как можно скорее после выявления аномалии. Любые клинически значимые патологические изменения будут регистрироваться как нежелательные явления.

#### **[00678] 9.6.5. Основные показатели жизнедеятельности**

**[00679]** Измерения артериального давления и ЧСС будут проводиться в положении лежа на спине с помощью полностью автоматизированного осциллометрического устройства. Ручные методы будут применяться только в случае отсутствия автоматизированного устройства. Основные показатели жизнедеятельности должны измеряться на противоположной руке по отношению к той, из которой берут пробы крови (за исключением времени в/в инфузии).

**[00680]** Перед измерением артериального давления и ЧСС следует находиться в спокойном состоянии без отвлекающих факторов (например, телевидение, мобильные телефоны) по меньшей мере в течение 5 минут. Во все моменты времени будут выполняться и регистрироваться однократные измерения АД и ЧСС.

**[00681]** Для всех измерений у всех субъектов в течение всего периода исследования будет применяться один и тот же способ измерения температуры тела (т. е. тимпанический).

**[00682]** Моменты времени для проведения этих исследований указаны в графике мероприятий.

#### **[00683] 9.6.6. Физический осмотр**

**[00684]** Полный физический осмотр представляет собой обычный медицинский осмотр, включающий: общий внешний вид, неврологический статус, обследование глаз, уха/горла/носа, щитовидной железы, сердечно-сосудистой системы, дыхательной системы, живота/желудочно-кишечного тракта, печени, скелетно-мышечной системы и кожи.

**[00685]** Краткий физический осмотр включает оценку кожи, дыхательной системы, сердечно-сосудистой системы, органов брюшной полости (печени, селезенки) и ЦНС.

**[00686]** Моменты времени для проведения этих исследований указаны в графике мероприятий. Новые клинически значимые данные (по мнению исследователя), не отмеченные при скрининге, будут зарегистрированы как нежелательные явления (НЯ).

#### **[00687] 9.6.7. Аллергические реакции/общие реакции гиперчувствительности**

**[00688]** За всеми субъектами будут наблюдать и тщательно отслеживать развитие любой аллергической реакции во время исследования и наличие любой реакции на инфузию во время в/в введения лекарственного средства в части 2.

**[00689]** Врач будет всегда находиться в исследовательском центре при каждом

введении исследуемого лекарственного средства.

**[00690]** За всеми субъектами будут тщательно наблюдать на предмет наличия симптомов реакции на инфузию во время и после в/в введения, как указано в графике мероприятий. Исследователь должен определять интенсивность любых реакций на инфузию на основании клинической оценки.

**[00691]** При обнаружении реакции на инфузию можно назначать лечение, такое как введение парацетамола перорально, и/или антигистаминного препарата перорально или в/в, и/или  $\beta$ -агонистов ингаляционно, и/или кортикостероидов в/в, и/или эпинефрина в/в, в зависимости от характера аллергической реакции и степени тяжести симптомов. При в/в введении исследуемого лекарственного средства в части 2 следует принять следующие меры предосторожности.

**[00692]** Перед началом инфузии будет доступен соответствующий персонал, лекарственные средства (например, эпинефрин, ингаляционные  $\beta$ -агонисты, антигистаминные препараты и кортикостероиды) и другие необходимые средства, такие как инфузионные растворы для лечения аллергических реакций, включая анафилаксию.

**[00693]** Если у субъекта развилась умеренная или тяжелая реакция на инфузию, то инфузию следует немедленно прекратить, а субъекту следует провести надлежащее лечение в соответствии с рекомендациями, принятыми в учреждении.

**[00694]** Субъектам, которым было прекращено введение исследуемого лекарственного средства из-за реакции на инфузию, будет предложено приходить в исследовательский центр для выполнения требуемых исследований, совершив все запланированные посещения вплоть до завершающего посещения.

**[00695]** Реакции после введения исследуемого лекарственного средства могут развиваться в период от 1 до 21 дня после инфузии или инъекции, и проявления могут различаться по признакам и симптомам и не всегда очевидны (включая, без ограничений, миалгию и/или артралгию с лихорадкой и/или сыпью [которые не являются признаками и симптомами других известных клинических синдромов] и могут сопровождаться другими симптомами, такими как зуд, отек лица, рук или губ, дисфагия, крапивница, боль в горле и/или головная боль). Любую аллергическую реакцию или реакцию гиперчувствительности следует регистрировать как НЯ и следует указывать тип реакции. Если у субъекта развивается отсроченная реакция на инфузию или инъекцию, субъекту будет предложено сдать дополнительные внеплановые пробы (моча, сыворотка и плазма для оценки наличия маркеров воспаления). Следует приложить все возможные усилия, чтобы собрать эти пробы как можно скорее после начала нежелательного (-ых) явления (-ий), указывающего (-их) на замедленную реакцию гиперчувствительности. Эти пробы будут применяться для того, чтобы предпринять попытку определить этиологию симптомов. При выявлении кожной реакции (т. е. сыпи) субъекта попросят дать разрешение на взятие кожных биоптатов, опять же, чтобы применять их для лучшего понимания причины сыпи.

#### **[00696] 9.6.8. Местная реакция в участке инъекции (часть 1)**

**[00697]** Будет проводиться оценка участка инъекции после п/к введения

лекарственного средства на наличие местной реакции в участке исследования в моменты времени, указанные в графике мероприятий.

**[00698]** Любая нежелательная реакция (например, боль, эритема и/или уплотнение) должна быть зарегистрирована в документации и должна быть описана так, как указано в разделе «Шкала оценки токсичности у здоровых взрослых добровольцев и добровольцев подросткового возраста, участвующих в профилактических клинических исследованиях вакцины<sup>7</sup>» на основании следующих 4 параметров: 1) степень болевого синдрома, 2) болезненность при надавливании, 3) эритема/покраснение, 4) уплотнение/припухлость. Подробная информация представлена в таблице 70 ниже.

**[00699] Таблица 70. Шкала оценки токсичности для реакций на инфузии и местных реакций в участке инъекции**

| Местная реакция на инъекционный препарат | Легкая (степень 1)                                                          | Средняя (степень 2)                                                                                                               | Сильная (степень 3)                                                                                             | Потенциально угрожающая жизни (степень 4) |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Боль                                     | Отсутствуют затруднения при выполнении повседневной деятельности            | Повторное применение ненаркотического обезболивающего средства >24 часов или затруднения при выполнении повседневной деятельности | Любое применение наркотического обезболивающего средства или невозможность выполнения повседневной деятельности | Посещение ER или госпитализация           |
| Болезненность при надавливании           | Легкий дискомфорт при прикосновении                                         | Дискомфорт при движении                                                                                                           | Значительный дискомфорт в состоянии покоя                                                                       | Посещение ER или госпитализация           |
| Эритема/покраснение <sup>a</sup>         | 2,5-5 см                                                                    | 5,1-10 см                                                                                                                         | >10 см                                                                                                          | Некроз или эксфолиативный дерматит        |
| Уплотнение/припухлость <sup>b</sup>      | 2,5-5 см и отсутствуют затруднения при выполнении повседневной деятельности | 5,1-10 см или затруднения при выполнении повседневной деятельности                                                                | >10 см или невозможность выполнения повседневной деятельности                                                   | Некроз                                    |

ER=кабинет неотложной помощи

<sup>a</sup> Помимо определения степени измеренной местной реакции при наибольшем одиночном диаметре измерение следует регистрировать как непрерывную переменную. <sup>b</sup> Оценку и определение степени уплотнения/припухлости выполнять с помощью функциональной шкалы и фактических измерений.

**[00700]** Все реакции в участке инъекции, зафиксированные в виде НЯ с визуальными признаками (например, покраснением, уплотнением, припухлостью), будут сфотографированы с приложенной метрической линейкой для последующей оценки.

#### **[00701] 9.7. Сбор и обработка проб**

**[00702]** Фактические даты и время сбора проб будут зарегистрированы в eCRF. Если пробы крови собирают посредством постоянной канюли, соответствующее количество (1 мл) сукровицы, несколько превышающее объем мертвого пространства фиксирующего элемента, будет удаляться из канюли и утилизироваться перед взятием каждой пробы крови. После сбора проб крови канюля будет промывта 0,9% раствором хлорида натрия и заполнена объемом, равным объему мертвого пространства фиксирующего элемента. При применении мандрена (обтуратора) потеря крови из-за извлечения не ожидается. Промывка гепарином не разрешается.

**[00703]** Время и частоту сборов всех проб указаны в графике мероприятий.

**[00704]** Инструкции по сбору, обработке, хранению и транспортировке проб находятся в руководстве по лабораторным исследованиям, которое будет предоставлено. Сбор, обработка, хранение и транспортировка проб будут осуществляться в установленных условиях и, там, где это применимо, с контролируемой температурой, как указано в руководстве по лабораторным исследованиям.

### **10. ЗАВЕРШЕНИЕ УЧАСТИЯ СУБЪЕКТА/ОТМЕНА ИССЛЕДУЕМОГО ЛЕЧЕНИЯ/ИСКЛЮЧЕНИЕ ИЗ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **[00705] 10.1. Завершение участия**

**[00706]** Субъект будет считаться завершившим исследование, если ему или ей были выполнены исследования в рамках завершающего посещения.

#### **[00707] 10.2. Отмена исследуемого лечения/исключение из исследования**

**[00708]** Субъект будет автоматически исключен из исследования по любой из следующих причин:

**[00709]** невозможность последующего наблюдения;

**[00710]** отзыв согласия;

**[00711]** летальный исход.

**[00712]** Если субъект выйдет из исследования по любой причине до окончания амбулаторного периода, следует выполнить исследования в рамках завершающего посещения. Если субъект согласен совершать любые посещения вплоть до завершающего посещения, будет собрана любая дополнительная информация и будут выполнены любые процедуры, на которые будет получено разрешение.

**[00713]** В случае невозможности последующего наблюдения за субъектом персонал исследовательского центра приложит все разумные усилия, чтобы связаться с субъектом и определить причину отмены лечения/исключения из исследования. Меры, принятые для осуществления последующего наблюдения, будут зафиксированы в документации.

**[00714]** Если субъект выходит из исследования до его завершения, то причина исключения должна быть отражена в индивидуальной регистрационной карте (CRF) и в

первичном документе. Исследуемое лекарственное средство, предназначенное для выбывшего субъекта, не может быть назначено другому субъекту. Для выбывших субъектов может быть предусмотрена замена.

**[00715]** Если PI или спонсор полагает (например, по причинам безопасности или переносимости), что для субъекта лучше всего прекратить дальнейшее участие в исследовании, то это разрешено, но субъекту все же следует выполнить анализы исследования вплоть до завершающего посещения.

## 11. СТАТИСТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ

**[00716]** Статистический анализ будет проведен спонсором или под руководством спонсора.

**[00717]** В связи с поисковым и описательным характером исследования формальная проверка гипотезы не запланирована.

### **[00718] 11.1. Информация о субъекте**

**[00719]** Все субъекты, которые получают по меньшей мере частичную дозу исследуемого лекарственного средства, будут включены в описательный статистический анализ и анализы безопасности.

### **[00720] 11.2. Определение размера выборки**

**[00721]** Отсутствуют доступные данные ФК для FP2 у человека, поэтому для данного начального исследования фазы 1 F1H расчет размера выборки не проводили. Число субъектов, запланированных для каждой дозовой группы, согласуется с обычными размерами выборки в исследованиях новых лекарственных средств фазы 1 с однократными нарастающими дозами, где основной целью исследования является безопасность и переносимость, а одной из вторичных целей является оценка профиля ФК. В каждой дозовой группе 6 субъектов будут рандомизированы в группу FP2, а 2 субъекта будут рандомизированы в группу плацебо; таким образом, отношение активного исследуемого лекарственного средства к плацебо будет составлять 3 : 1 в пределах каждой дозовой группы. Предполагается, что запланированное число субъектов позволит получить достаточную информацию о безопасности, переносимости и фармакокинетике FP2, чтобы можно было оценить потенциальные возможности для дальнейшей клинической разработки. Двух субъектов, получающих плацебо, в каждой дозовой группе должно быть достаточно, чтобы позволить выполнить оценку безопасности и переносимости при каждом уровне дозы, и при необходимости субъекты, получающие плацебо, будут объединены при завершении исследования для целей анализа данных. Если объединять субъектов, получавших плацебо, нецелесообразно в связи с такими проблемами, как неоднородная дисперсия, можно изучить альтернативные статистические способы (логарифмическое преобразование и т. д.), так чтобы в анализе можно было применять все данные.

**[00722]** Размер выборки 6 субъектов, получавших FP2, на уровень дозы достаточен для оценки вероятности сигнала безопасности (например, реакции гиперчувствительности). Если допустить, что истинный риск сигнала безопасности составляет ~10%, то при наличии 6 субъектов, получающих активное лекарственное средство, можно обнаружить по



меньшей мере одно событие с вероятностью ~47%; а если допустить, что риск составляет ~50%, то вероятность обнаружения по меньшей мере одного события равна приблизительно 98%.

**[00723]** Что касается фармакокинетических параметров, то 6 субъектов (3 мужчин; 3 женщины), получающих в/в FP2 в части 2, предположительно, позволят обеспечить достаточную точность для оценки абсолютной биодоступности. Ожидается, что размер выборки 6 субъектов обеспечит достаточную точность для оценки AUC FP2 при в/в введении и будет являться стандартом для оценки показателей фармацевтического качества дозированной формы для п/к введения.

### **[00724] 11.3. Фармакокинетические анализы**

**[00725]** Все субъекты, получившие по меньшей мере одну дозу исследуемого лекарственного средства и у которых взяли по меньшей мере одну пробу для оценки ФК и иммуногенности после введения дозы, будут включены в анализы и отчеты о данных ФК. Субъекты будут исключены из анализа ФК, если их данные не позволяют точно оценить ФК (например, неполное введение исследуемого лекарственного средства; отсутствует информация о времени введения дозы и взятия пробы; данных о концентрации недостаточно для расчета параметра ФК).

**[00726]** Для обобщенного представления сывороточных концентраций FP2 в каждый момент времени взятия пробы, а также параметров ФК FP2 для каждой DG будут применяться методы описательной статистики (средние значения, медиана, среднеквадратичные отклонения и коэффициенты вариации). В сводных статистических данных всем концентрациям в сыворотке ниже низшей поддающейся количественному определению концентрации (BLQ) будет присвоено нулевое значение, а все субъекты и пробы, исключенные из анализов ФК, будут четко задокументированы. Сводные параметры ФК также будут представлены по DG.

**[00727]** Будут построены графики зависимости средних и/или медианных сывороточных концентраций FP2 от времени на полном профиле после введения исследуемого лекарственного средства. Для графиков средних значений значения BLQ будут приняты равными нулю. Для отдельных графиков зависимости сывороточной концентрации от времени значения BLQ до первой измеренной концентрации будут приняты равными нулю, а после последней измеренной концентрации будут исключены из анализа.

**[00728]** Статистический анализ данных ФК будет выполнен для всех субъектов, получавших по меньшей мере одну дозу FP2. Для визуальной оценки пропорциональности дозы будут построены графики геометрических средних  $C_{\max}$  и AUC. Пропорциональность дозы после п/к введения FP2 можно исследовать с помощью анализов линейной регрессии данных  $C_{\max}$  и AUC после натурального логарифмического преобразования (степенная модель). При необходимости можно выполнять дополнительные анализы данных.

**[00729]** Абсолютная п/к биодоступность будет рассчитана как доля введенной дозы, присутствующая в системном кровотоке, выраженная в процентах. Для анализа

индивидуальной биодоступности будет рассчитано и выражено в процентах отношение индивидуальной нормализованной по дозе  $AUC_{inf}$  после п/к введения к геометрическому среднему нормализованной по дозе  $AUC_{inf}$  при в/в введении. Если это будет сочтено целесообразным, вместо  $AUC_{inf}$  можно применять частичную  $AUC_{(0-4 \text{ weeks})}$ . Абсолютная п/к биодоступность FP2 будет получена путем вычисления среднего значения индивидуальной абсолютной п/к биодоступности, описанной выше. Также можно оценить девяностопятипроцентные доверительные интервалы и графики индивидуальной абсолютной п/к биодоступности.

#### **[00730] 11.4. Анализы иммуногенности**

**[00731]** Частота появления антител анти-FP2 будет обобщенно представлена для всех субъектов, получивших по меньшей мере 1 дозу FP2 и имеющих подходящие пробы для обнаружения антител к FP2 (т. е. для субъектов, у которых по меньшей мере 1 проба была получена после введения FP2).

**[00732]** Будет приведен перечень субъектов с положительным результатом анализа на антитела к FP2. Также будут представлены максимальные титры антител к FP2 у субъектов с положительным результатом анализа на антитела к FP2.

**[00733]** Частота появления нейтрализующих антител (NAb) к FP2 будет обобщенно представлена для субъектов с положительным результатом анализа на антитела к FP2, у которых пробы можно оценить на NAb к FP2.

#### **[00734] 11.5. Фармакодинамические анализы (масса тела, потребление пищи) и поисковые**

##### **[00735] оценки ФД (VAS) и биомаркеры**

**[00736]** Фармакодинамические анализы будут проведены для всех субъектов, которые получили по меньшей мере 1 дозу исследуемого лекарственного средства (FP2 или плацебо) для которых была выполнена по меньшей мере 1 оценка ФД после лечения. Для каждой дозы будут рассчитаны параметры описательной статистики в каждый момент времени для каждого конечного показателя ФД (например, веса, потребления пищи) и поисковых показателей ФД (VAS) и биомаркера. Параметры могут быть отображены графически 1) для каждого субъекта и 2) в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение (или других подходящих сводных показателей) для каждой дозы по отношению к запланированному времени взятия проб для каждого конечного показателя для визуальной оценки эффектов, связанных с дозой. Дополнительные анализы методами описательной статистики могут включать изменение и процентное изменение относительно значений исходного (т. е. до введения дозы) уровня выбранных фармакодинамических и поисковых биомаркеров.

**[00737]** Фармакодинамические и поисковые биомаркеры можно анализировать с помощью модели со смешанными эффектами, подходящей для дизайна с однократными нарастающими дозами и последовательной панелью. Модель со смешанными эффектами может включать в качестве фиксированных факторов - лечение, посещение, взаимодействие факторов лечения и посещения, исходный уровень, взаимодействие

факторов исходного уровня и посещения, а в качестве случайного фактора - субъекта. В модель также могут быть включены исходные ковариаты (например, возраст, пол, вес и т. д.). При необходимости могут быть получены различия (лечение - объединенное плацебо) в изменениях относительного исходного уровня среднеквадратических средних значений и 90%-х доверительных интервалов для различий в средних значениях с применением среднеквадратической ошибки по отношению к линейной модели и со ссылкой на  $t$ -распределение. Также по группам лечения могут быть рассчитаны среднеквадратические средние значения, 90%-е доверительные интервалы для изменения относительно исходного уровня таких конечных показателей, как ФД/биомаркер (перед введением дозы).

**[00738]** При необходимости могут быть выполнены дополнительные поисковые анализы. Перед анализом в линейной модели со смешанными эффектами, описанной выше, параметры ФД, такие как VAS, могут быть обобщенно представлены во время посещения с применением площади под кривой (трапецеидальный способ) или средневзвешенного по времени значения.

#### **[00739] 11.6. Фармакокинетический/фармакодинамический анализы**

**[00740]** Могут быть изучены взаимосвязи между данными ФК и ФД. При необходимости можно построить график сывороточных концентраций лекарственного средства и соответствующих измерений ФД для оценки их взаимосвязи. Если это будет сочтено целесообразным, для описания зависимости эффекта от воздействия можно применять приемлемую модель.

**[00741]** Зависимость ФК/ФД можно представить графически, и, если это будет сочтено целесообразным, то ее можно дополнительно проанализировать с помощью приемлемого статистического способа. Можно графически представить зависимость воздействий ФК ( $C_{\max}$  и/или  $AUC_{\inf}$ ) от переменных ФД (например, веса, потребления пищи, VAS). Если графическое представление зависимости будет сочтено целесообразным, то с этими данными можно провести статистический анализ с помощью приемлемой модели.

**[00742]** Можно графически представить зависимость воздействий ФК ( $C_{\max}$  и/или  $AUC_{\inf}$ ) от переменных безопасности (например, реакция ЭКГ). Если графическое представление зависимости будет сочтено целесообразным, то с этими данными можно провести статистический анализ с помощью приемлемой модели.

#### **[00743] 11.7. Анализы безопасности**

**[00744]** Отчет о данных безопасности для всех субъектов, получивших по меньшей мере 1 дозу FP2 или плацебо, будет включать частоту и тип нежелательных явлений, а также абсолютные значения и изменения: артериального давления, частоты сердечных сокращений, клинических лабораторных данных и данных ЭКГ в 12 отведениях от момента перед введением дозы до конечного момента времени после введения дозы.

#### **[00745] Нежелательные явления**

**[00746]** Дословные термины, применяемые в eCRF исследователями для определения нежелательных явлений, будут закодированы с помощью Медицинского словаря для регуляторной деятельности (MedDRA). Нежелательные явления, возникающие

в процессе приема исследуемого лекарственного средства, представляют собой нежелательные явления, которые начались в фазу вмешательства или являются следствием ранее существовавшего состояния, которое ухудшилось по сравнению с исходным уровнем. В анализ будут включены все отмеченные нежелательные явления. Для каждого нежелательного явления будут суммировать процент субъектов, у которых наблюдался по меньшей мере 1 эпизод данного явления, по группе вмешательства. Кроме того, при необходимости будут проведены сравнения между группами вмешательства.

**[00747]** Сводные данные, перечни, наборы данных или описания состояния субъектов могут быть при необходимости предоставлены в отношении субъектов, которые умерли, прекратили прием исследуемого лекарственного средства из-за нежелательного явления или у которых развилось тяжелое или серьезное нежелательное явление.

#### **[00748] Клинические лабораторные тесты**

**[00749]** Лабораторные данные будут обобщенно представлены по типу лабораторных тестов. В обобщенных лабораторных данных будут применяться референтные диапазоны и заметно аномальные результаты (указанные в плане статистического анализа). Параметры описательной статистики будут рассчитываться для каждого лабораторного анализа на исходном уровне и для наблюдаемых значений и изменений относительно исходного уровня в каждый запланированный момент времени. Изменения результатов относительно исходного уровня будут представлены в перекрестных таблицах до и после вмешательства (с классами ниже, в пределах и выше нормальных диапазонов). Будет предоставлен перечень субъектов, у которых результаты каких-либо лабораторных тестов выходят за пределы референтных диапазонов. Также будет приведен перечень субъектов с любыми заметно отклоняющимися от нормы лабораторными результатами.

#### **[00750] Электрокардиограмма (ЭКГ)**

**[00751]** Анализируемыми показателями ЭКГ являются частота сердечных сокращений, интервал PR, интервал QRS, интервал QT и скорректированный интервал QT (QTc) с применением следующих способов коррекции: коррекция QT по формуле Базетта (QTcB), коррекция QT по формуле Фридеричиа (QTcF)<sup>1,19,14,16</sup>.

**[00752]** Описательные статистические данные для интервалов QTc и изменений относительно исходного уровня будут обобщенно представлены для каждого запланированного момента времени. Будут обобщенно представлены процентные доли субъектов с интервалом QTc >450 мс, >480 мс или >500 мс, а также процентные доли субъектов с удлинением интервала QTc относительно исходного уровня >30 мс или >60 мс.

**[00753]** Будут зафиксированы все клинически значимые аномалии в форме сигнала ЭКГ, которые являются изменениями относительно исходных показателей (например, изменения морфологии Т-волн или появление U-волн).

**[00754]** Взаимосвязь между концентрациями в сыворотке JNJ-64379090 и основным конечным показателем  $\Delta\Delta\text{QTc}$  (скорректированное по плацебо изменение относительно согласованного по времени QTc исходного уровня) может быть количественно определено

с применением линейного или нелинейного подхода к моделированию со смешанными эффектами, если применимо.

**[00755] Основные показатели жизнедеятельности**

**[00756]** В каждый запланированный момент времени будут обобщенно представлены описательные статистические данные для ЧСС и артериального давления (систолического и диастолического) (в положении лежа на спине) и изменения относительно исходного уровня. Будут обобщенно представлены процентные доли субъектов со значениями, выходящими за пределы клинически значимых границ.

**[00757] Физический осмотр**

**[00758]** Описательные статистические данные изменений относительно исходного уровня будут обобщенно представлены для каждого запланированного момента времени.

**[00759] 11.8. Промежуточный анализ/Комитет по анализу данных**

**[00760]** Промежуточный анализ выполнять не планируется. Тем не менее исследовательской группой может быть проведен заслепленный анализ данных после завершения лечения в каждой дозовой группе для принятия решения о повышении дозы.

**12. ОТЧЕТНОСТЬ О НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫХ ЯВЛЕНИЯХ**

**[00761]** Представление своевременной, точной и полной отчетности и анализ информации о безопасности, полученной в ходе клинических исследований, имеют решающее значение для защиты субъектов, исследователей и спонсора и являются обязательным требованием регулирующих органов по всему миру. Спонсор установил стандартные операционные процедуры в соответствии с нормативными требованиями во всем мире, чтобы обеспечить надлежащее представление отчетности с информацией о безопасности; все клинические исследования, проводимые спонсором или его аффилированными лицами, будут проводиться в соответствии с этими процедурами.

**[00762] Способ обнаружения нежелательных явлений и серьезных нежелательных явлений**

**[00763]** При обнаружении НЯ или СНЯ будет соблюдаться осторожность, чтобы не внести ошибку. Предпочтительным способом выяснения факта развития нежелательного явления является открытый и ненаводящий устный опрос субъекта.

**[00764] Запрашиваемые нежелательные явления**

**[00765]** Запрашиваемые НЯ представляют собой определенные местные и системные явления, о которых субъекта специально спрашивают. В данном исследовании информация о местных реакциях в участке инъекции (такие как боль или зуд) будет запрашиваться по графику мероприятий.

**[00766] Незапрашиваемые нежелательные явления**

**[00767]** Незапрашиваемые НЯ представляют собой все нежелательные явления, информация о которых поступает спонтанно (т. е. о которых субъекта специально не спрашивают).

**[00768] 12.1. Определения**

**[00769] 12.1.1. Определения и классификации нежелательных явлений**

**[00770] Нежелательное явление**

**[00771]** Нежелательным явлением является любое неблагоприятное медицинское явление у субъекта клинического исследования, которому вводят лекарственный (экспериментальный или не экспериментальный) препарат. Нежелательное явление необязательно имеет причинно-следственную связь с вмешательством. Таким образом, нежелательное явление может представлять собой любой неблагоприятный и непреднамеренный признак (включая аномальный результат), симптом или заболевание, связанные по времени с применением лекарственного (исследуемого или не исследуемого) продукта, независимо от того, связаны они с данным лекарственным (исследуемым или не исследуемым) продуктом или нет. (Определение согласно Международной конференции по гармонизации [ICH]).

**[00772]** Это определение включает любое событие, которое является новым с точки зрения наступления либо усугубляется с точки зрения тяжести или частоты относительно состояния на исходном уровне или представляет собой аномальные результаты диагностических процедур, включая аномалии в лабораторных тестах.

**[00773]** Спонсор собирает нежелательные явления, начиная с момента подписания ICF.

**[00774] Серьезное нежелательное явление**

**[00775]** Серьезным нежелательным явлением, согласно Руководствам ICH и EU по фармакологическому надзору за лекарственными препаратами для применения у людей, является любое неблагоприятное медицинское явление, которое при любой дозе:

**[00776]** Приводит к летальному исходу.

**[00777]** Угрожает жизни.

**[00778]** (Субъект подвергался риску наступления летального исхода во время события. Термин не относится к явлению, которое гипотетически могло бы привести к летальному исходу, если бы оно было более тяжелым.)

**[00779]** Требуется госпитализации в стационаре или продления срока текущей госпитализации.

**[00780]** Приводит к постоянной или значительной нетрудоспособности/недееспособности.

**[00781]** Является врожденной аномалией/дефектом при рождении.

**[00782]** Предполагается, что посредством лекарственного препарата переносятся любые возбудители инфекций.

**[00783]** Является важным с медицинской точки зрения\*.

**[00784]** \* При принятии решения о том, является ли экспресс-отчетность целесообразной также и в других ситуациях, например, в случае важных медицинских явлений, которые могут непосредственно не представлять угрозу для жизни или не приводить к летальному исходу, но могут подвергать субъекта опасности или могут требовать вмешательства для предотвращения одного из других результатов, перечисленных в определении выше, следует прибегать к медицинской и научной оценке.

Как правило, их следует рассматривать как серьезные.

**[00785]** В случае развития серьезного и неожиданного нежелательного явления, предполагающего наличие причинно-следственной связи между исследуемым вмешательством и явлением (например, летальный исход в результате анафилактического шока), явление будет регистрироваться как серьезная и непредвиденная предполагаемая нежелательная реакция, даже если оно является компонентом конечного показателя исследования (например, смертность по любой причине).

**[00786] Незарегистрированное (непредвиденное) нежелательное явление/справочная информация о безопасности**

**[00787]** Нежелательное явление считается незарегистрированным, если характер или степень тяжести не соответствует применимой справочной информации о безопасности препарата. В случае FP2 «прогнозируемость» нежелательного явления будет определяться тем, зафиксировано ли оно в брошюре исследователя.

**[00788] Нежелательное явление, связанное с применением вмешательства**

**[00789]** Нежелательное явление считается связанным с применением вмешательства, если такая связь является возможной, вероятной или очень вероятной согласно определениям, перечисленным в разделе 12.1.2 «Определения для установления связи».

**[00790]** Клинические исследования с FP2 не проводились, поэтому данные о влиянии FP2 на людей отсутствуют.

**[00791] 12.1.2. Определения для установления связи**

**[00792] Не связано**

**[00793]** Нежелательное явление, которое не связано с применением вмешательства.

**[00794] Сомнительно**

**[00795]** Нежелательное явление, для которого более вероятно альтернативное объяснение, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующие заболевания или временная взаимосвязь позволяют предположить, что причинно-следственная связь маловероятна.

**[00796] Возможно**

**[00797]** Нежелательное явление, которое может быть связано с применением вмешательства. Альтернативное объяснение, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующее (-ие) заболевание (-я), является недостаточным. Временная взаимосвязь является рациональной; следовательно, причинно-следственную связь исключить невозможно.

**[00798] Вероятно**

**[00799]** Нежелательное явление, которое может быть связано с применением вмешательства. Временная взаимосвязь указывает на наличие причинной связи (например, подтверждена пробной отменой). Альтернативное объяснение является менее вероятным, например, сопутствующий (-ие) лекарственное (-ые) средство (-а), сопутствующее (-ие) заболевание (-я).

**[00800] Очень вероятно**

**[00801]** Нежелательное явление, которое указано как возможная нежелательная реакция и которое невозможно рационально объяснить альтернативными причинами, например, сопутствующим (-и) лекарственным (-и) средством (-ами), сопутствующим (-и) заболеванием (-ями). Временная взаимосвязь четко указывает на наличие причинной связи (например, подтверждена пробными отменой и возобновлением лечения).

**[00802] 12.1.3. Критерии тяжести**

**[00803]** Оценку степени тяжести будут выполнять с применением следующих общих ключевых слов для категорий.

**[00804] Легкая:** Наличие симптомов, которые легко переносятся, вызывая минимальный дискомфорт и не мешая повседневной деятельности.

**[00805] Умеренная:** Наличие достаточного дискомфорта, препятствующего выполнению повседневной деятельности.

**[00806] Тяжелая:** Максимальный дистресс, приводящий к существенному нарушению функционирования или к недееспособности. Мешает нормальной повседневной деятельности.

**[00807]** Исследователь должен определить тяжесть явлений, не ощущаемых субъектом непосредственно (например, аномальные результаты лабораторных исследований), на основании клинической оценки.

**[00808] 12.1. Ситуации, требующие специальной отчетности**

**[00809]** Представляющие интерес связанные с безопасностью явления, относящиеся к исследуемому вмешательству спонсора, которые могут требовать представления экспресс-отчетности или оценки безопасности, включают, без ограничений:

**[00810]** передозировку в результате исследуемого вмешательства спонсора;

**[00811]** предположение о злоупотреблении/неправильном применении исследуемого вмешательства спонсора;

**[00812]** случайное или связанное с профессиональной деятельностью воздействие исследуемого вмешательства спонсора;

**[00813]** ошибка в применении, связанная с препаратом спонсора (с воздействием на субъекта/пациента исследуемого вмешательства спонсора или без такого воздействия, например, перепутанные имена).

**[00814]** Ситуации, требующие специальной отчетности, следует регистрировать в eCRF. Любую ситуацию, требующую специальной отчетности, которая соответствует критериям серьезного нежелательного явления, следует регистрировать на странице серьезных нежелательных явлений eCRF.

**[00815] 12.3. Процедуры**

**[00816] 12.3.1. Все нежелательные явления**

**[00817]** Все нежелательные явления и ситуации, требующие специальной отчетности, серьезные или несерьезные, будут регистрироваться с момента получения подписанной и датированной ICF и до завершения последней связанной с исследованием



процедуры у субъекта (которая может включать контакты для последующего наблюдения для оценки безопасности). Серьезные нежелательные явления, включая спонтанно переданную исследователю информацию о них во время завершающего посещения, будут регистрироваться с применением формы регистрации серьезных нежелательных явлений. Спонсор проведет оценку всей информации о безопасности, которая будет спонтанно передана исследователем, в сроки, указанные в протоколе.

**[00818]** Все явления, которые соответствуют определению серьезного нежелательного явления, будут регистрироваться как серьезные нежелательные явления, независимо от того, являются ли они определенными в протоколе оценками.

**[00819]** Все нежелательные явления, независимо от серьезности, тяжести или предполагаемой взаимосвязи с исследуемым вмешательством, будут регистрироваться с применением медицинской терминологии в первичном документе и eCRF. По возможности диагнозы будут ставиться тогда, когда признаки и симптомы имеют общую этиологию (например, кашель, насморк, чиханье, боль в горле и заложенность носа следует регистрировать как «инфекция верхних дыхательных путей»). Исследователи будут регистрировать в eCRF свое заключение о взаимосвязи нежелательного явления с исследуемой терапией. Все меры, необходимые для купирования нежелательных явлений, будут фиксироваться в первичном документе и информация о них будет передаваться в соответствии с инструкциями спонсора.

#### 14. ИНФОРМАЦИЯ ОБ ИССЛЕДУЕМОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ

##### **[00820] 14.1. Физическое описание исследуемых лекарственных средств**

**[00821]** FP2, поставляемый для настоящего исследования, представляет собой стерильный желто-коричневый раствор с концентрацией 50 мг/мл в 10 мМ фосфата натрия, 8% сахарозы и 0,04% полисорбата 20 с pH 6,5.

**[00822]** FP2 поставляется в замороженном виде в стеклянном флаконе объемом 1,2 мл.

**[00823]** Буферный раствор, поставляемый для данного исследования, представляет собой стерильный прозрачный раствор, содержащий 10 мМ фосфата натрия, 8,0% сахарозы и 0,04% полисорбата 20. Буферный раствор будет применяться для приготовления инъекций плацебо и в качестве разбавителя для получения начальных доз FP2 для п/к инъекций.

**[00824]** Буферный раствор поставляется в замороженном виде в стеклянном флаконе объемом 1,2 мл.

**[00825]** Ответственность за его изготовление и предоставление будет нести спонсор. Перечень эксципиентов приведен выше.

##### **[00826] 14.2. Упаковка**

**[00827]** Исследуемое лекарственное средство (FP2 и буферный раствор для разведения FP2 и в качестве плацебо) будет предоставлено в нефасованном виде. Исследуемое лекарственное средство будет храниться в аптеке под замком и передаваться только представителю исследовательской группы с приемлемой квалификацией для

введения после подготовки к в/в инфузии (часть 2) или замаскированной подготовки к п/к инъекции (часть 1).

**[00828] 14.3. Маркировка**

**[00829]** Этикетки исследуемого лекарственного средства будут содержать информацию согласно применимым нормативным требованиям.

**[00830] 14.4. Подготовка, обращение и хранение**

**[00831]** Все исследуемые лекарственные средства будут храниться при контролируемых температурах в диапазоне от -30 °C до -40 °C и в защищенном от света месте.

**[00832]** Для первых четырех запланированных групп п/к введения доз лекарственный препарат перед применением будут разводить до требуемой концентрации (DG 1 0,5 мг/мл; DG 2 и DG 3 5,0 мг/мл; DG 4 10,0 мг/мл) с применением буферного раствора. Лекарственный препарат для в/в введения будут разводить до концентрации 10 мг/мл и вводить посредством проточной фильтрации.

**ССЫЛКИ**

1. Bazett HC (1920). An analysis of the time-relationship of electrocardiograms. Heart. 1920;7:353-380.
2. Breit SN (2011), Johnen H, Cook AD, Tsai VW, Mohammad MG, Kuffner T, et al. The TGF- $\beta$  superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: A pleiotrophic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. Growth Factors. 2011;29(5):187-195.
3. EMA Guidance. EMEA CHMP SWP 28367 07 Rev. 1 (2017). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products. European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 20 July 2017.
4. EMA Guidance. EMEA/CHMP/SWP/28367/07 (2007). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. European Medicines Agency; Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 19 July 2007.
5. Emmerson PJ (2017), Wang F, Du Y, Liu Q, Pickard RT, Gonciarz MD, et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. Nat. Med. 2017;(10):1215-1219.
6. FDA Guidance for Industry (2005). Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. US Dep of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER, July 2005).
7. FDA Guidance for Industry (2007). Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials. US Dep of Health and Human Services. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER, September 2007).
8. Fejzo MS (2018), Sazonova OV, Sathirapongsasuti JF, Hallgrimsdóttir IB, 23andMe Research Team, Vacic V, et al. Placenta and appetite genes GDF15 and IGFBP7 are associated with hyperemesis gravidarum. Nature Communications. 2018;9:1178-1186.

9. Fisher BL (2002) and Schauer P. Medical and surgical options in the treatment of severe obesity. *Am J Surg.* 2002;184:9S-16S.
10. Fryar CD (2012), Carroll MD, Ogden CL. Prevalence of overweight, obesity, and extreme obesity among adults: United States, trends 1960-1962 through 2009-2010, 2012. National Center for Health Statistics.  
Available from [http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity\\_adult\\_09\\_10/obesity\\_adult\\_09\\_10.htm](http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_adult_09_10/obesity_adult_09_10.htm) Accessed 23 May 2018
11. Gennemark P (2017), Tragardh M, Linden D, Ploj K, Johansson A, Turnbull A, et al. Translational modeling to guide study design and dose choice in obesity exemplified by AZD1979, a melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonist. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6:458-468.
12. Gobel B (2014), Sanghvi A, and Hall KD. Quantifying energy intake changes during obesity pharmacotherapy. *Obesity.* 2014;22(10):2105-2108.
13. Hall KD (2011), Sacks G, Chandramohan D, Chow C, Wang YC, Gortmaker SL, and Swinburn BA. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet.* 2011;378:826-837.
14. Hodges M (1983), Salerno D, Erlie D. Bazett's QT correction reviewed: evidence that a linear QT correction for heart rate is better. *J Am Coll Cardiol.* 1983;1:694.
15. Hsu JY (2017), Crawley S, Chen M, Ayupova DA, Lindhout DA, et al. Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature.* 2017;550(7675):255-259.
16. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline E14: Clinical evaluation of QT/QTc interval prolongation and proarrhythmic potential for non-antiarrhythmic drugs. ICH 12 May 2005.
17. Mullican SE (2017), Lin-Schmidt X, Chin C-N, Chavez JA, Furman JL, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat. Med.* 2017;(10):1150-1157.
18. Rueda-Clausen CF (2015), Ogunleye AA, and Sharma AM. Health benefits of long-term weight-loss maintenance. *Annu. Rev. Nutr.* 2015;35:475-516.
19. Sagie A (1992), Larson MG, Goldberg RJ, Bengtson JR, Levy D. An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol.* 1992;70:797-801.
20. Sugulle M (2009), Dechend R, Herse F, Weedon-Fekjaer SM, Johnsen GM, et al. Circulating and placental Growth-Differentiation Factor 15 in preeclampsia and in pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Hypertension.* 2009;54:106-112.
21. The GBD Obesity Collaboration (2013). Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014;384:766-781.

22. Wolfe BM (2016), Kvach E, and Eckel RH. Treatment of obesity: weight loss and bariatric surgery. *Circ Res.* 2016;118:1844-1855.

23. World Health Organization (2012), Blood Donor Selection: Guidelines on Assessing Donor Suitability for Blood Donation. Geneva. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138212/> Accessed 21 June 2018.

24. Yang L (2017), Chang C, Sun Z, Madsen D, Zhu H, Padkjaer S, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat. Med.* 2017;(10):1158-1166.

25. Yanovski SZ (2015), Marcus MD, Wadden TA, Walsh BT. The Questionnaire on Eating and Weight Patterns5 (QEWP-5): An Updated Screening Instrument for Binge Eating Disorder. *Int J Eat Disord.* 2015; 48(3): 259- 261

#### [00833]

Пример 22. Результаты клинических исследований

**[00834]** Клиническое исследование проводили в соответствии с протоколом, описанным в примере 21, со следующими исключениями: (1) часть 2 исследования (абсолютная биодоступность) проведена не была; (2) критерий включения, определяющий возраст участника, был изменен так, чтобы увеличить допустимый верхний возрастной предел до 55 лет; (3) критерий исключения, основанный на наличии у участника положительного результата теста на котинин в моче, был изменен таким образом, чтобы можно было включать курильщиков, которые курят мало или периодически и хотят воздержаться от курения на период госпитализации. Введение дозы для когорт 1-6 завершено, а введение дозы для когорты 7 продолжается. Сорок восемь субъектов, разделенных на шесть когорт по восемь субъектов в каждой (когорты 1-6), получали либо однократные дозы FP2, либо соответствующее плацебо. В каждой когорте 6 субъектам вводили FP2 и 2 субъектам вводили соответствующее плацебо. Ниже приведена сводная информация по дозам FP2 (или соответствующего плацебо), введенным каждой когорте 1-6 (таблица 71).

#### [00835] Таблица 71. Введение дозы когортам 1-6

| Когорта   | Доза   |
|-----------|--------|
| Когорта 1 | 0,8 мг |
| Когорта 2 | 2,5 мг |
| Когорта 3 | 7,5 мг |
| Когорта 4 | 15 мг  |
| Когорта 5 | 30 мг  |
| Когорта 6 | 60 мг  |

**[00836]** Замаскированная информация о безопасности и переносимости доступна

для всех получивших дозу субъектов (когорты 1-6). Сводные фармакокинетические (ФК) и фармакодинамические (ФД) результаты по группам доступны для когорт 1-5.

**[00837]** *Безопасность и переносимость.* Лечение было по существу сочтено безопасным и хорошо переносимым.

**[00838]** *Фармакокинетика*

**[00839]** Фармакокинетические данные были доступны для когорт 1-5. При введении нарастающих доз FP2 воздействия возрастали приблизительно пропорционально дозе.  $T_{max}$  был достигнут на 6-й день, а  $T_{1/2}$  составил приблизительно 12 дней, что подтверждает необходимость еженедельного введения дозы.

**[00840]** **Таблица 72. Фармакокинетика однократных нарастающих доз FP2**

| Параметры ФК             | 0,8 мг (n=6)<br>Среднее (CO) | 2,5 мг (n=6)<br>Среднее (CO) | 7,5 мг (n=6)<br>Среднее (CO) | 15 мг (n=6)<br>Среднее<br>(CO) | 30 мг<br>(n=6)<br>Среднее |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| $AUC_{72}$<br>(мкг*ч/мл) | 3,36 (2,94)                  | 9,71 (5,33)                  | 27,3 (5,31)                  | 46,1 (20,2)                    | 128,9                     |
| $C_{72}$ (мкг/мл)        | 0,0691 (0,0572)              | 0,208 (0,0935)               | 0,592 (0,0975)               | 1,05 (0,456)                   | 2,65                      |

$C_{72}$  составляет 72% от  $C_{max}$

**[00841]** *Фармакодинамика*

**[00842]** Оценку потребления пищи проводили на исходном уровне (-1-й день) и еще раз на 3-й день после введения исследуемого лекарственного средства.  $T_{max}$ , наблюдаемый в первых 4 когортах этого исследования SAD, составляет ~6 дней, а концентрация FP2 в плазме в день 3 составляет ~70-80% от концентрации, достигнутой на 6-й день.

**[00843]** Для оценки потребления пищи субъектам предлагали четыре стандартизованных приема пищи (завтрак, обед, полдник, ужин); каждый субъект получал одинаковое питание (одинаковые продукты питания и в одинаковых количествах) в оба дня (т. е. в -1-й и 3-й дни). Калории, потребленные за 4 приема пищи, суммировали для получения общего количества калорий, потребленных на исходном уровне (-1-й день) и на 3-й день. Изменения потребления пищи за период от исходного уровня до 3-го дня применяли в качестве поискового показателя фармакодинамического механизма действия FP2.

**[00844]** Изменения потребления пищи варьировали как у субъектов, получавших плацебо, так и у получавших активное лекарственное средство, при этом изменения на 3-й день относительно исходного уровня составляли приблизительно  $\pm 20\%$  в когортах 1-4. Тем не менее у 4 из 6 субъектов, получавших FP2 в дозе 30 мг (когорта 5), потребление пищи уменьшалось более чем на 50% (диапазон 55-96%). Для сравнения, ни одна из объединенных групп плацебо (10 субъектов) не достигла снижений потребления пищи  $>30\%$ . В этой же дозовой группе (когорта 5, 30 мг) 2 субъекта, у которых наблюдалось наибольшее уменьшение потребления пищи (снижения потребления пищи -85% и -96%), также были субъектами, у которых были достигнуты наибольшие воздействия FP2). Медианное значение процентного изменения потребления пищи относительно исходного уровня до 3-го дня после введения дозы для субъектов, получавших плацебо или FP2,

представлено в таблице 73.

**[00845]** Таблица 73. Изменения потребления пищи относительно исходного уровня (-1-й день) до 3-го дня у субъектов, получавших плацебо или нарастающие дозы FP2

| <b>Когорта (число субъектов)</b>      | <b>Медианное значение % изменения потребления пищи относительно исходного уровня до 3-го дня (5-й, 95-й процентиль)</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Плацебо (N=10)                        | <b>-11,7 (-28,6, 15,6)</b>                                                                                              |
| Когорта 1 (N=6)                       | <b>2,3 (-17,7, 14,8)</b>                                                                                                |
| Когорта 2 (N=6)                       | <b>0,7 (-24,0, 16,1)</b>                                                                                                |
| Когорта 3 (N=6)                       | <b>-9,9 (-26,3, 11,8)</b>                                                                                               |
| Когорта 4 (N=6)                       | <b>-10,8 (-29,8, 5,8)</b>                                                                                               |
| Когорта 5 (N=6)                       | <b>-33,7 (-92,1, 14,8)</b>                                                                                              |
| Когорта 6<br>(замаскированная)* (N=8) | <b>-35,1 (-68,4, 1,9)</b>                                                                                               |

**[00846]**

**[00847]** Хотя изобретение включает подробное описание со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, среднему специалисту в данной области будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации, без отступления от сущности и объема изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

2. Способ по п. 1, в котором субъект имеет избыточный вес.

3. Способ по п. 2, в котором ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

4. Способ по п. 3, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

5. Способ по п. 1, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

6. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

7. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

8. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

9. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

10. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

11. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

12. Способ по п. 5, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

13. Способ по п. 1, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

14. Способ по п. 1, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

15. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанный гибридный белок вводят в дозе в диапазоне от 0,8 мг до 90 мг, и при этом вес субъекта составляет 80 кг или более.

16. Способ по п. 15, в котором субъект имеет избыточный вес.

17. Способ по п. 16, в котором ИМТ субъекта составляет 25 кг/м<sup>2</sup> или более.

18. Способ по п. 17, в котором ИМТ субъекта находится в диапазоне от 25 кг/м<sup>2</sup> до 29,9 кг/м<sup>2</sup>.

19. Способ по п. 15, в котором гибридный белок вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,8 мг, 2,5 мг, 7,5 мг, 15 мг, 30 мг, 60 мг и 90 мг.

20. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 0,8 мг.

21. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 2,5 мг.

22. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 7,5 мг.

23. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 15 мг.

24. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 30 мг.

25. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 60 мг.

26. Способ по п. 19, в котором гибридный белок вводят в дозе 90 мг.

27. Способ по п. 15, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

28. Способ по п. 15, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

29. Способ уменьшения массы тела у субъекта, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанную композицию вводят в дозе в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

30. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

31. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,01 мг/кг.

32. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,03 мг/кг.

33. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,09 мг/кг.

34. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,18 мг/кг.

35. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,36 мг/кг.

36. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,72 мг/кг.

37. Способ по п. 29, в котором указанную композицию вводят в дозе 1,08 мг/кг.

38. Способ по п. 29, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

39. Способ по п. 29, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

40. Способ уменьшения потребления пищи субъектом, включающий введение композиции, содержащей гибридный белок, содержащий SEQ ID NO: 92, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель, причем указанную композицию вводят в дозе в диапазоне от 0,01 мг/кг до 1,08 мг/кг.

41. Способ по п. 40, в котором указанную композицию вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из: 0,01 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,18 мг/кг, 0,36 мг/кг, 0,72 мг/кг и 1,08 мг/кг.

42. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,01 мг/кг.

43. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,03 мг/кг.

44. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,09 мг/кг.

45. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,18 мг/кг.

46. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,36 мг/кг.

47. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 0,72 мг/кг.

48. Способ по п. 41, в котором указанную композицию вводят в дозе 1,08 мг/кг.

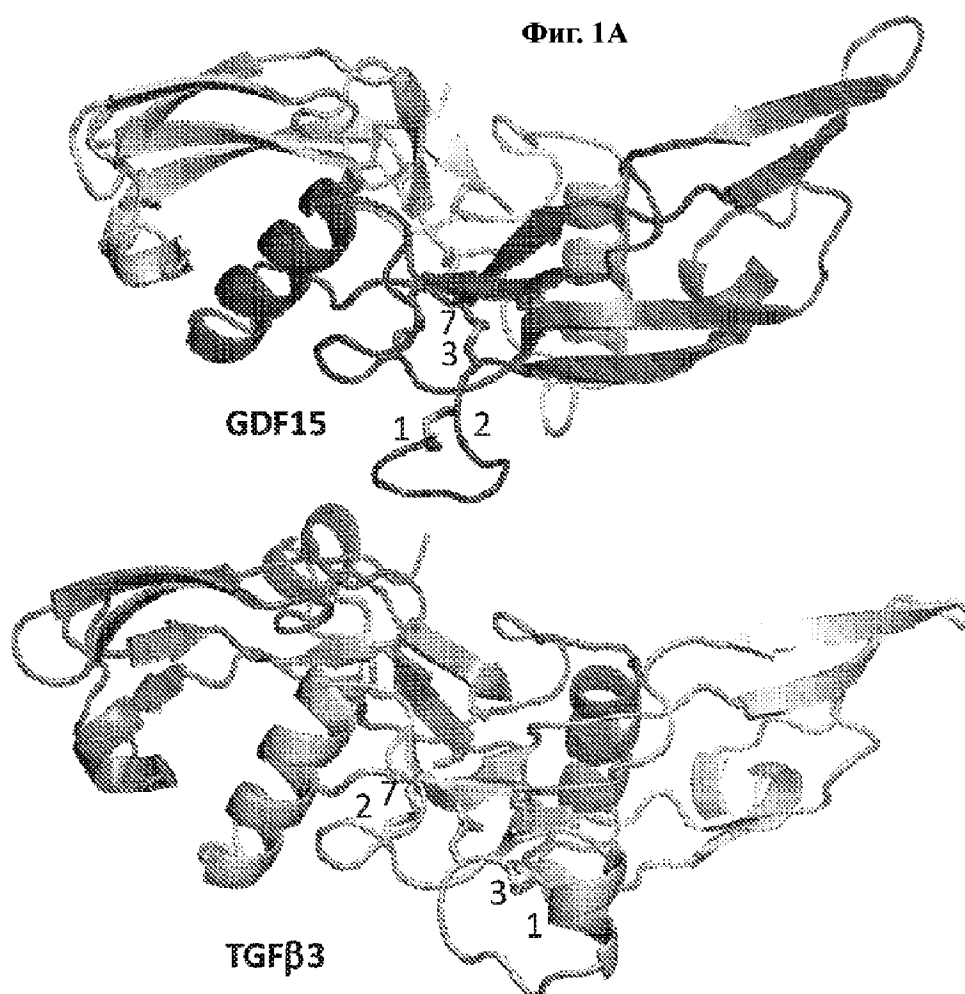
49. Способ по п. 41, в котором гибридный белок вводят посредством подкожной инъекции.

50. Способ по п. 41, в котором композицию вводят субъекту один раз в неделю.

По доверенности

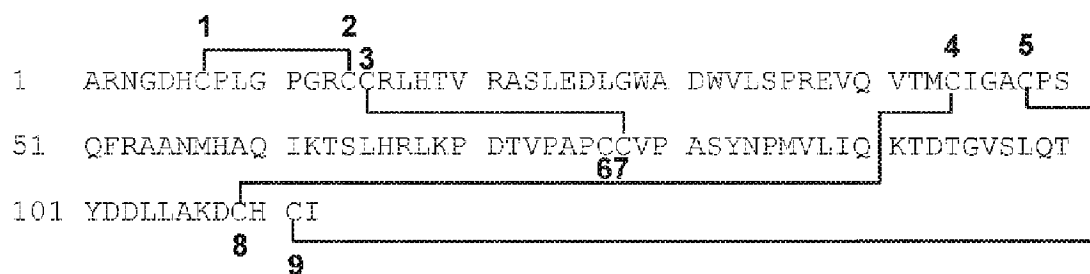


Фиг. 1А

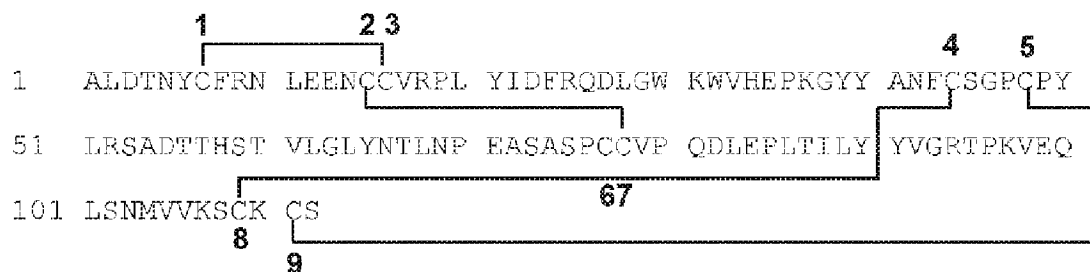


Фиг. 1В

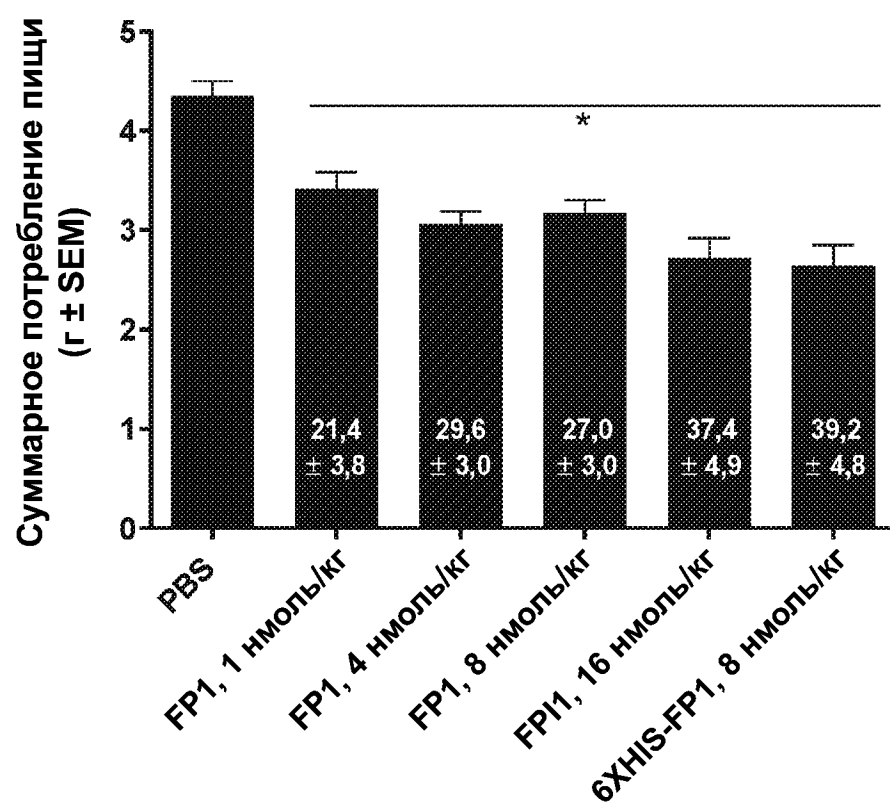
GDF15



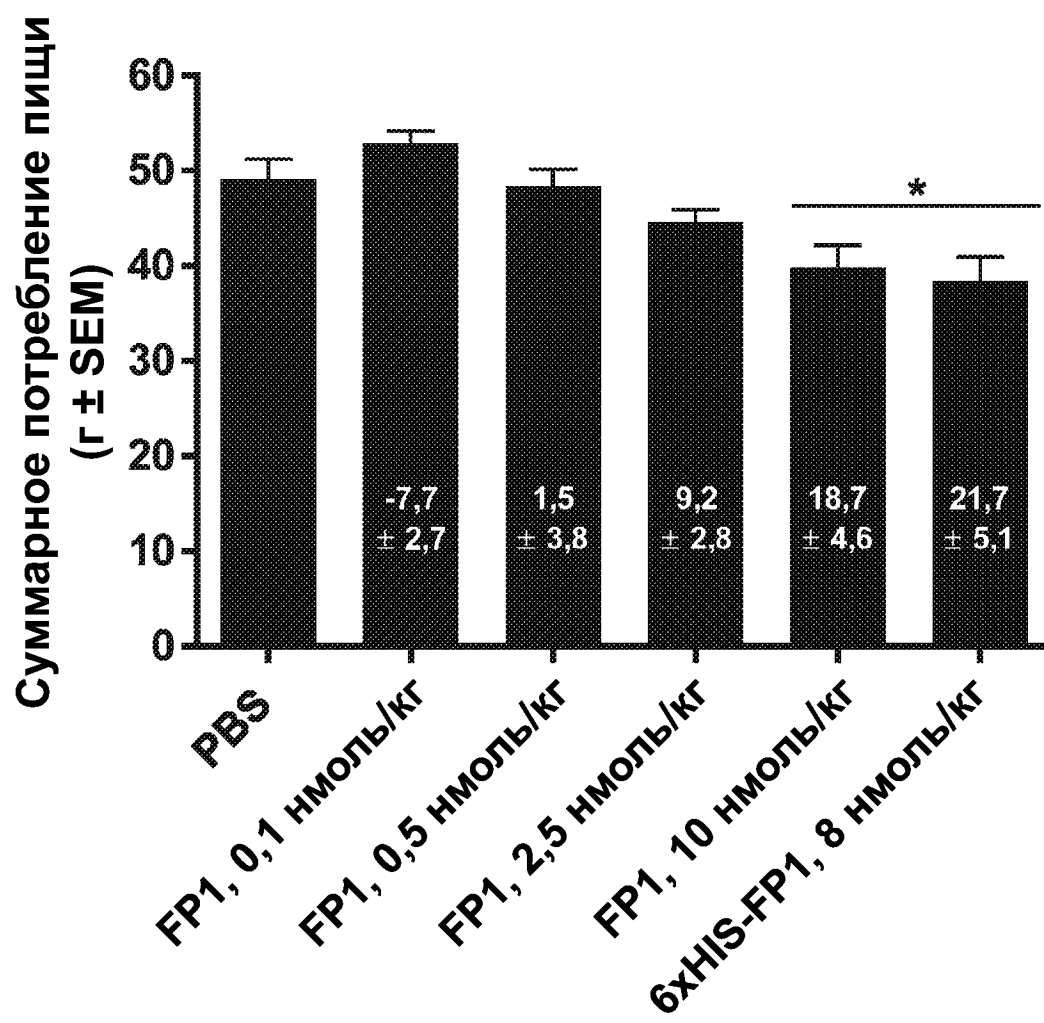
TGFB3



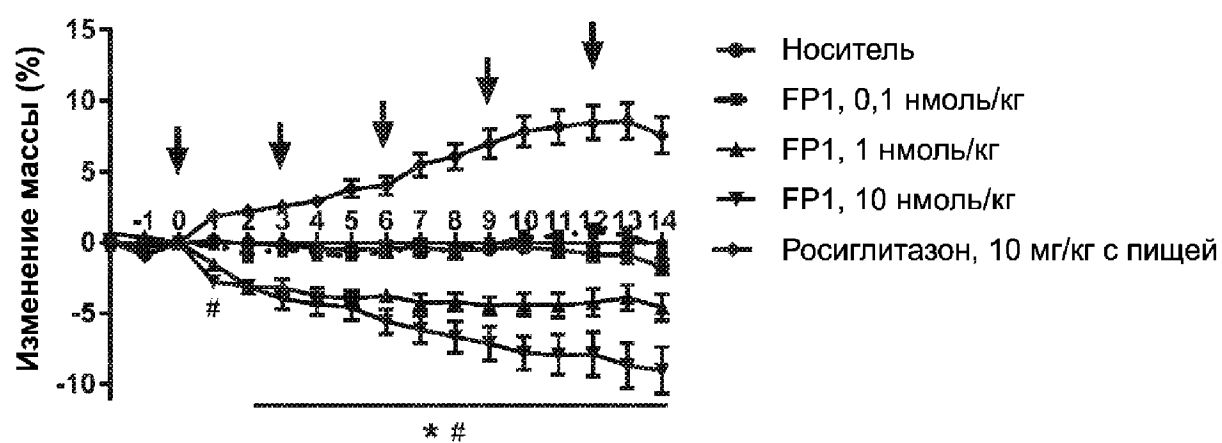
Фиг. 2



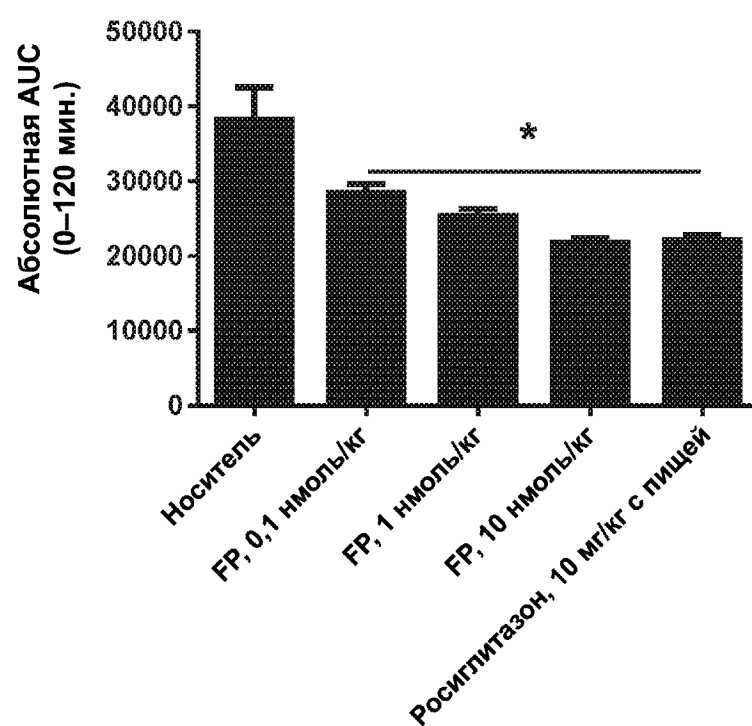
Фиг. 3



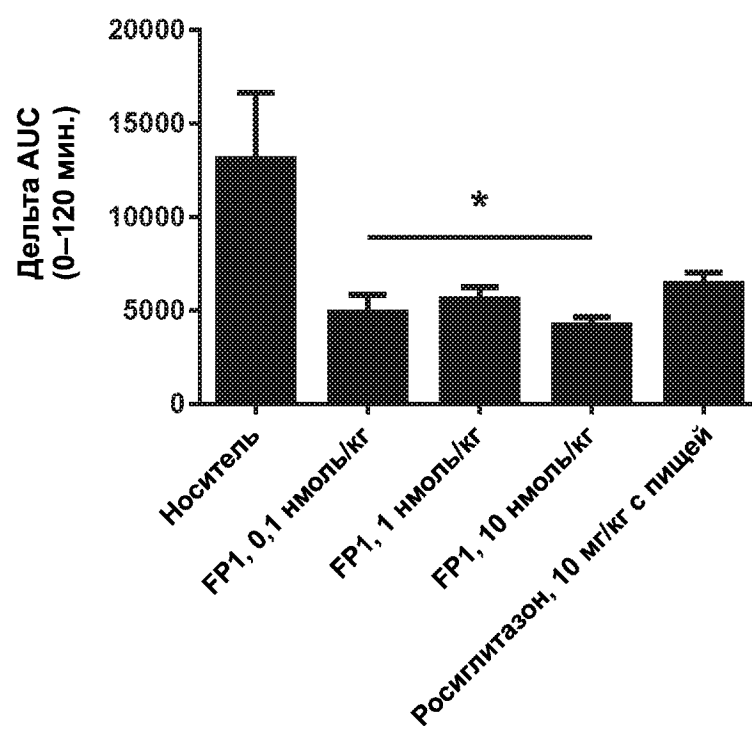
Фиг. 4



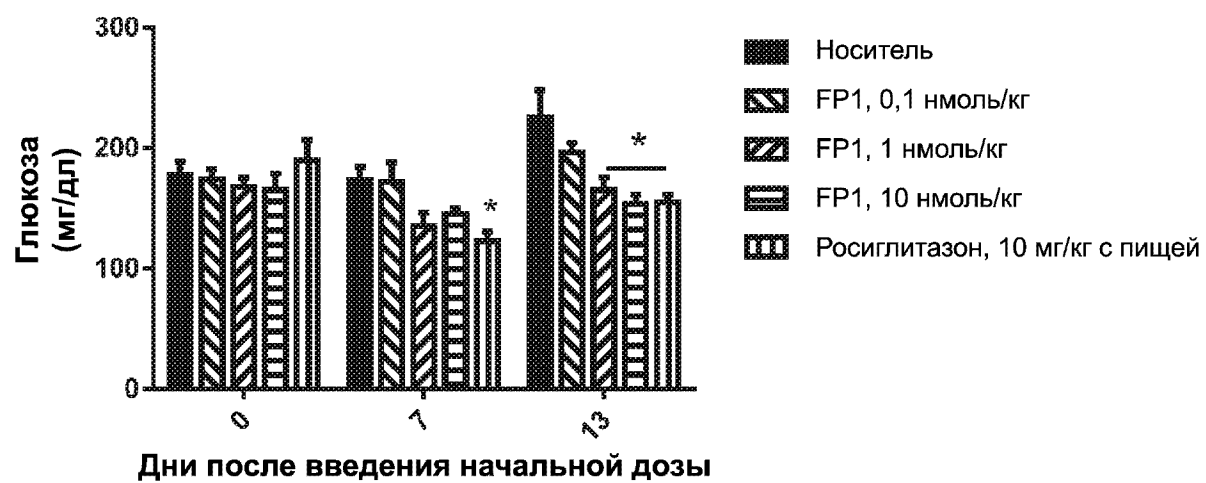
Фиг. 5А



Фиг. 5В

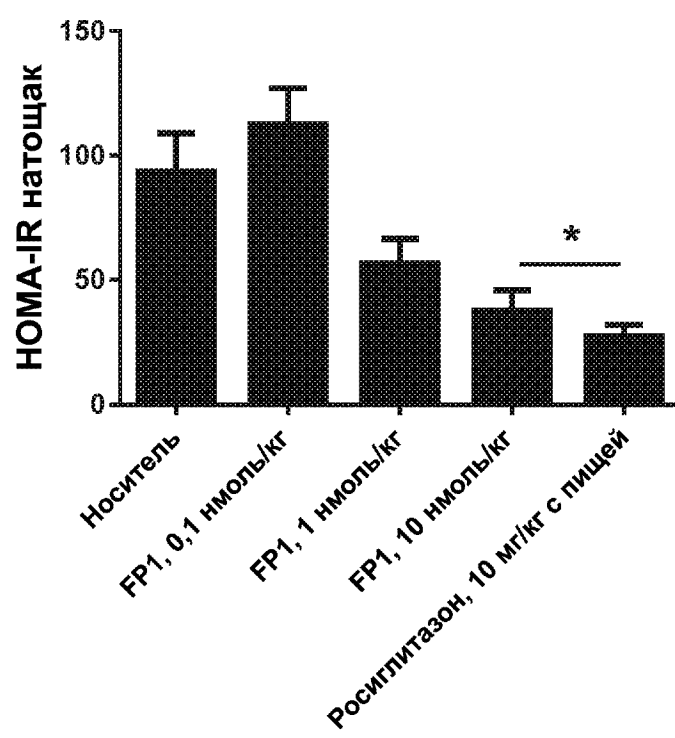


Фиг. 6

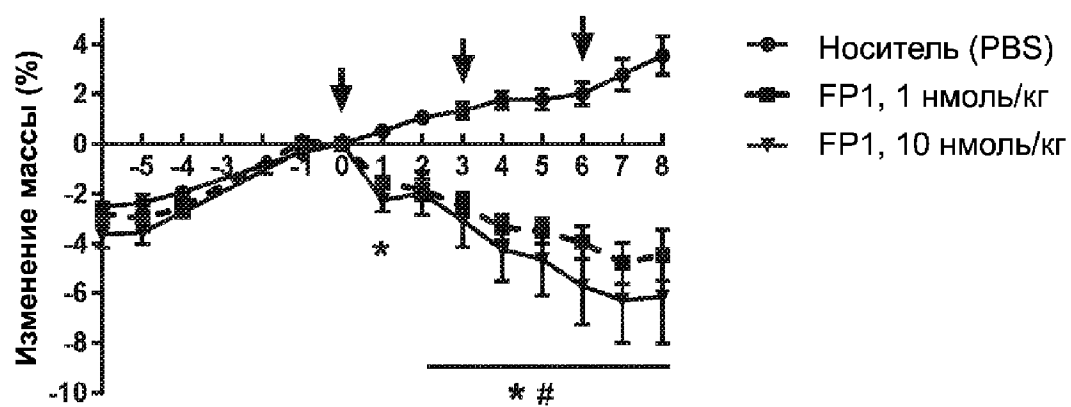




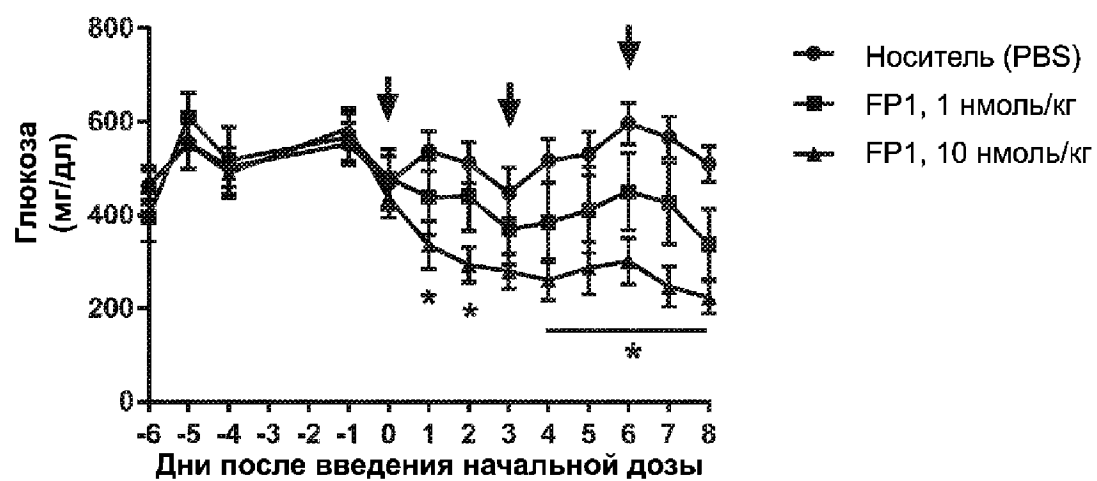
Фиг. 7



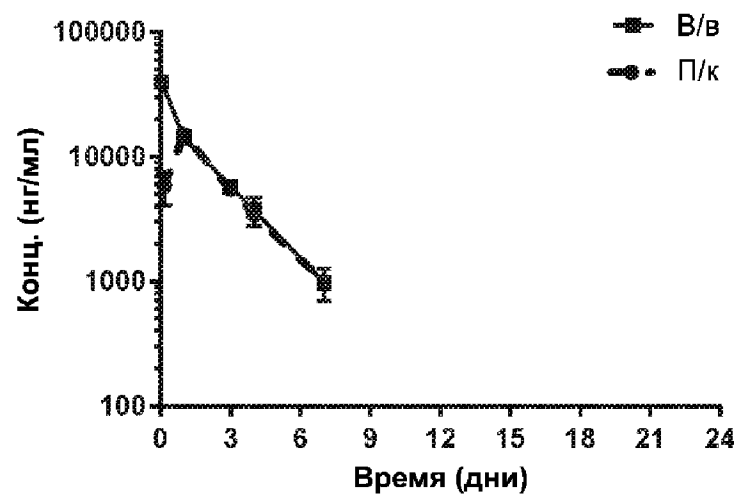
Фиг. 8



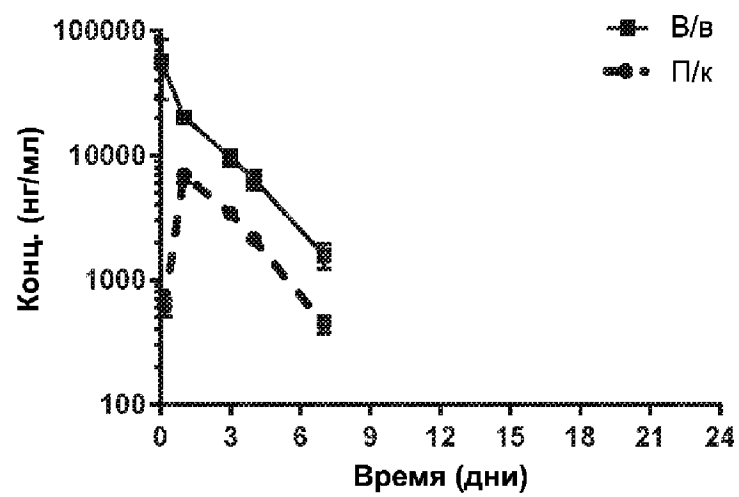
Фиг. 9



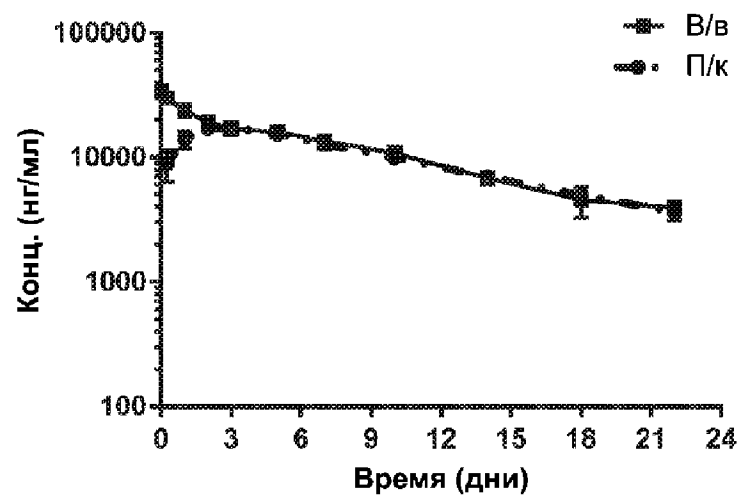
Фиг. 10



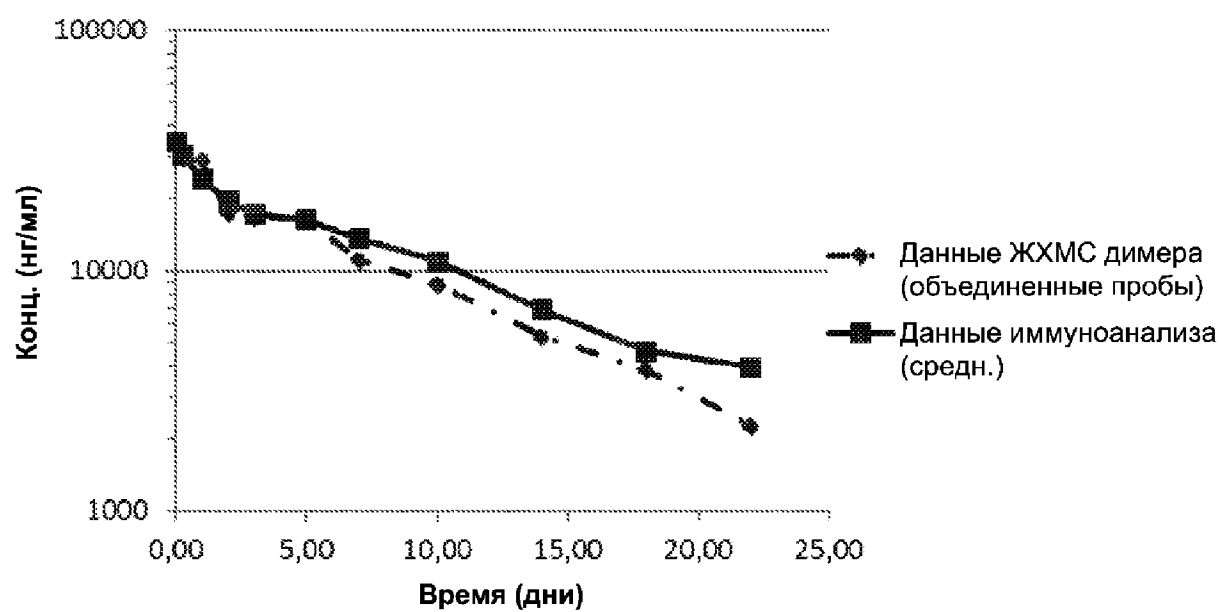
Фиг. 11



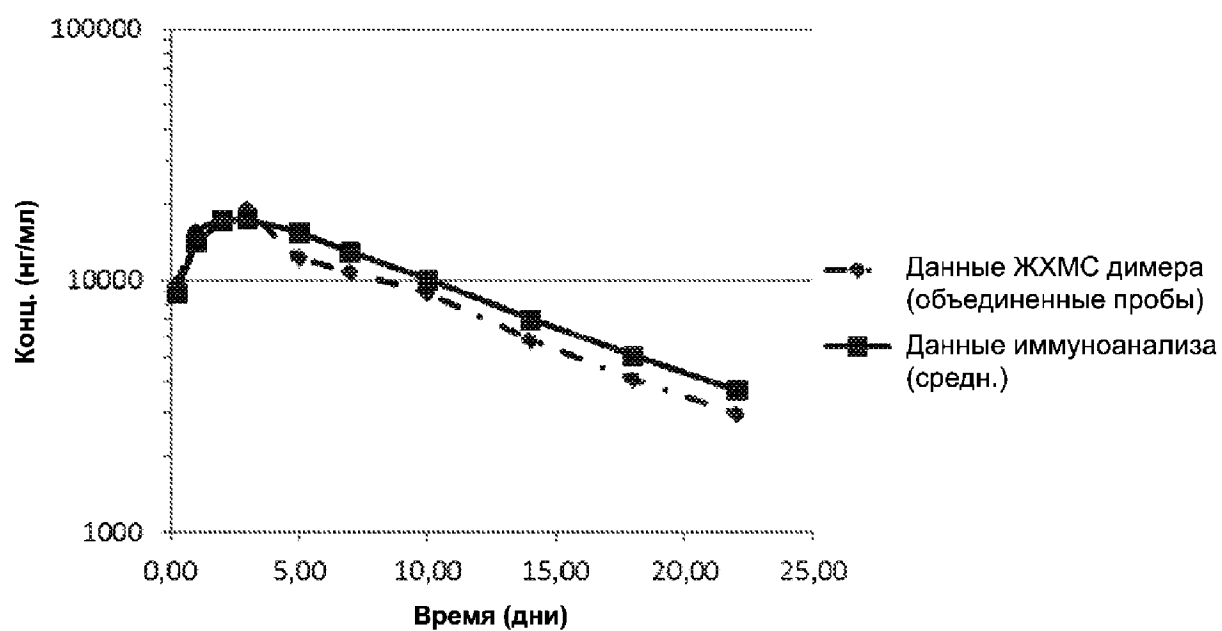
Фиг. 12



Фиг. 13

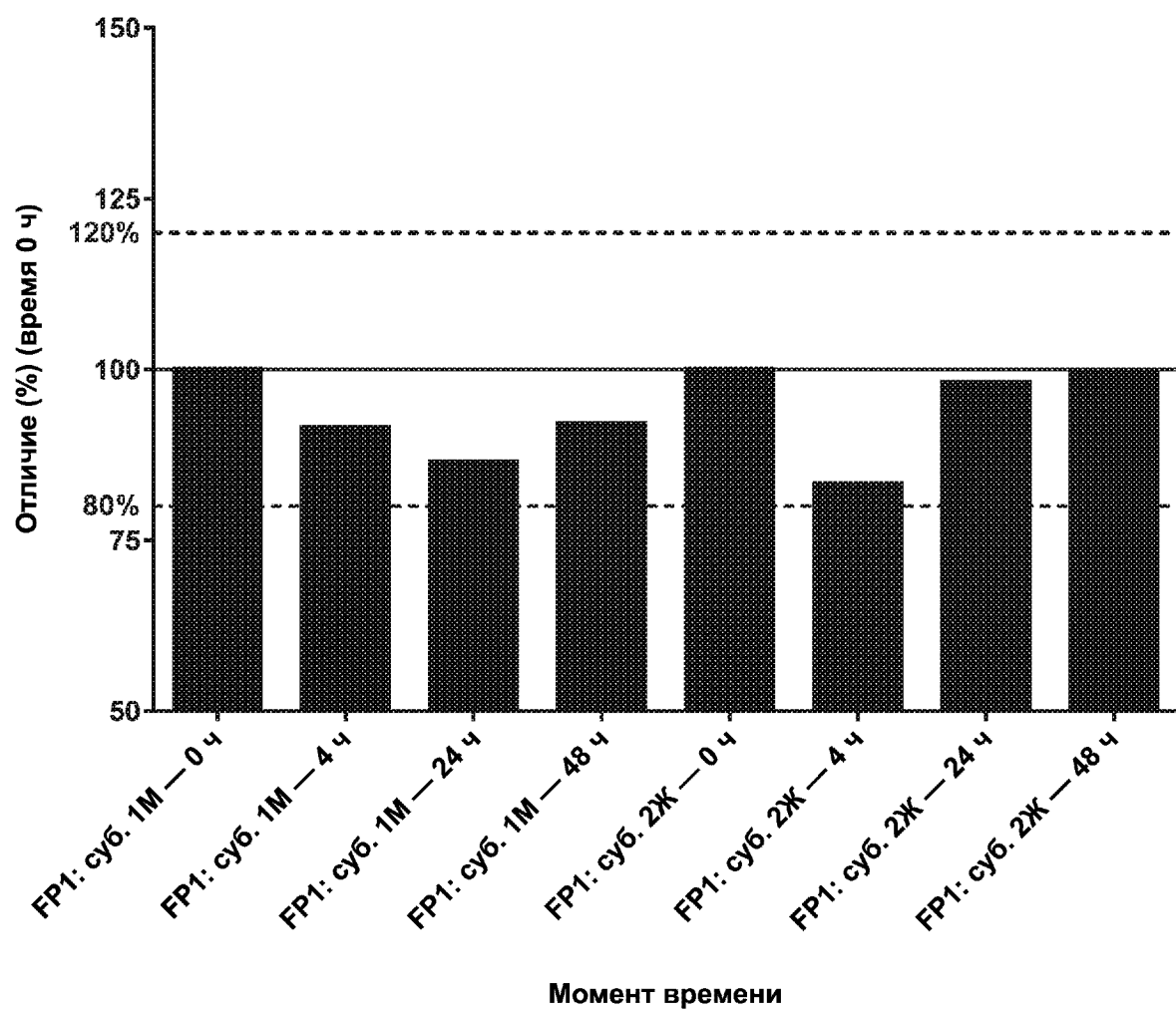


Фиг. 14

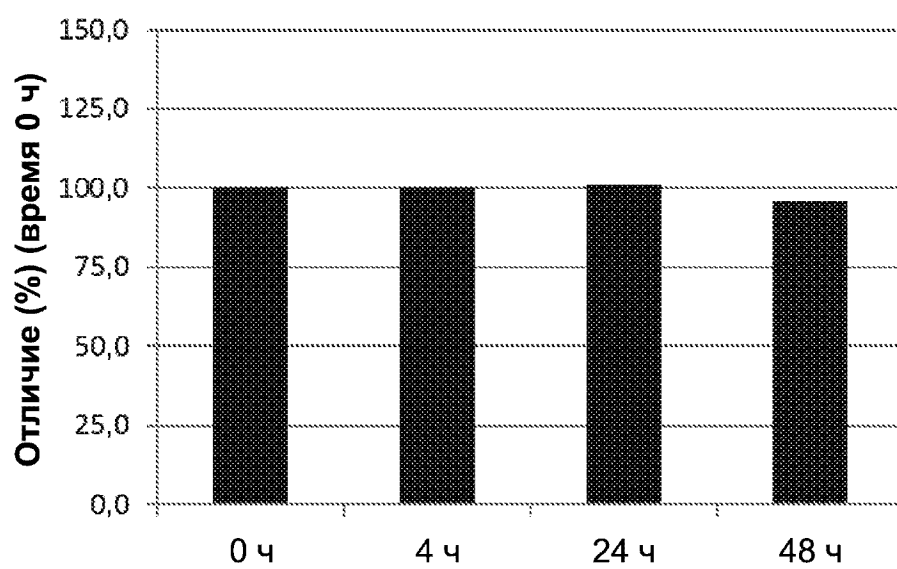




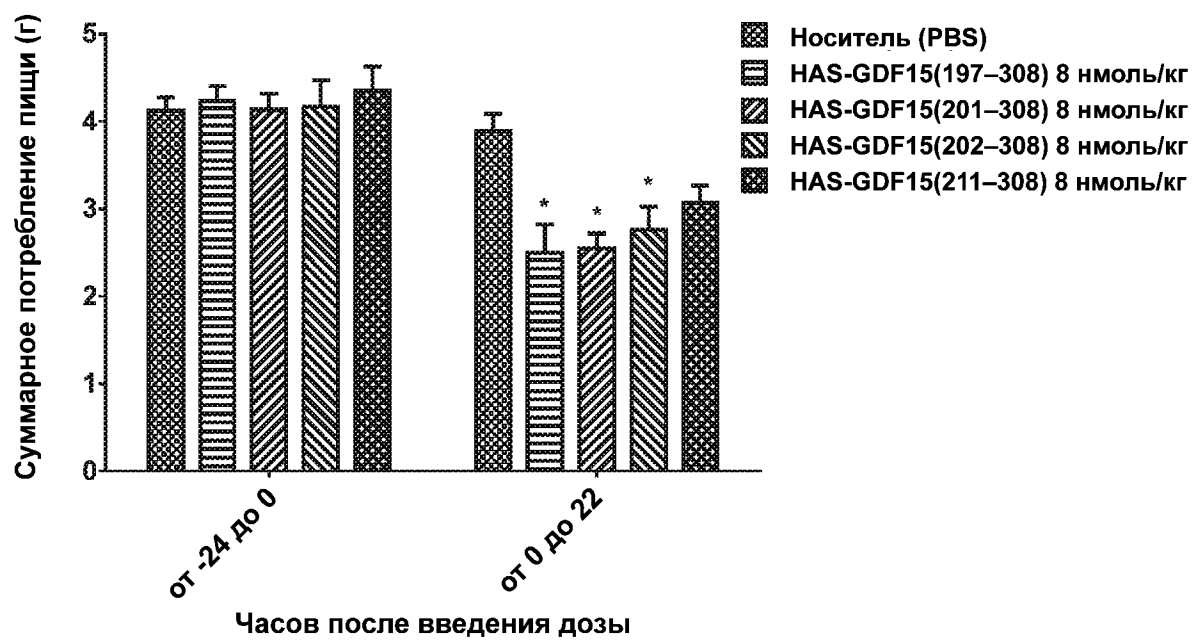
Фиг. 15



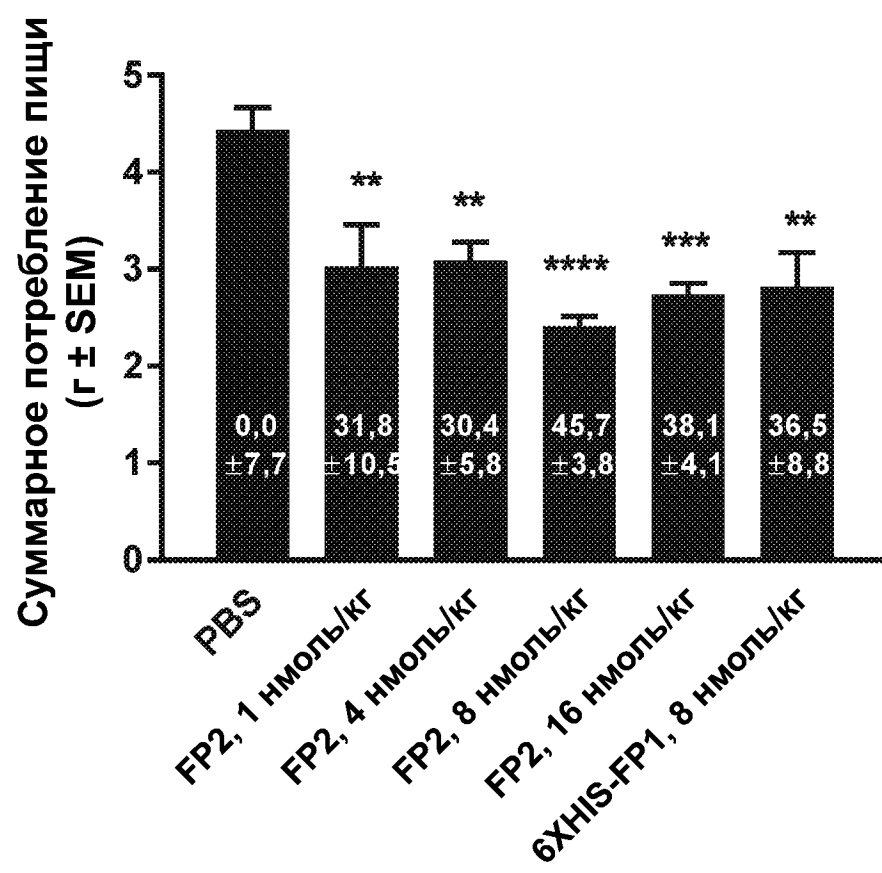
Фиг. 16



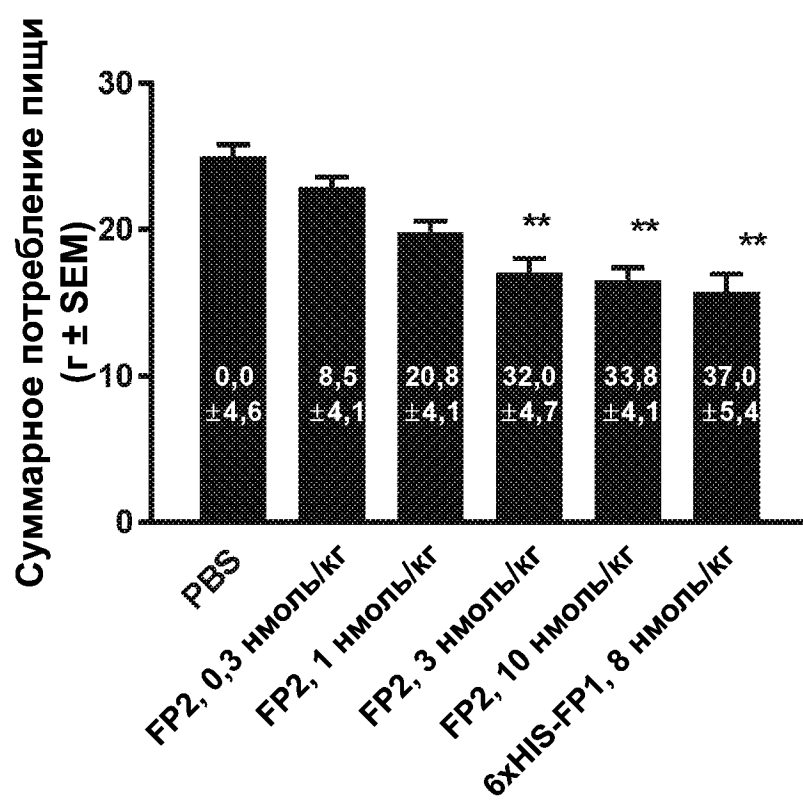
Фиг. 17



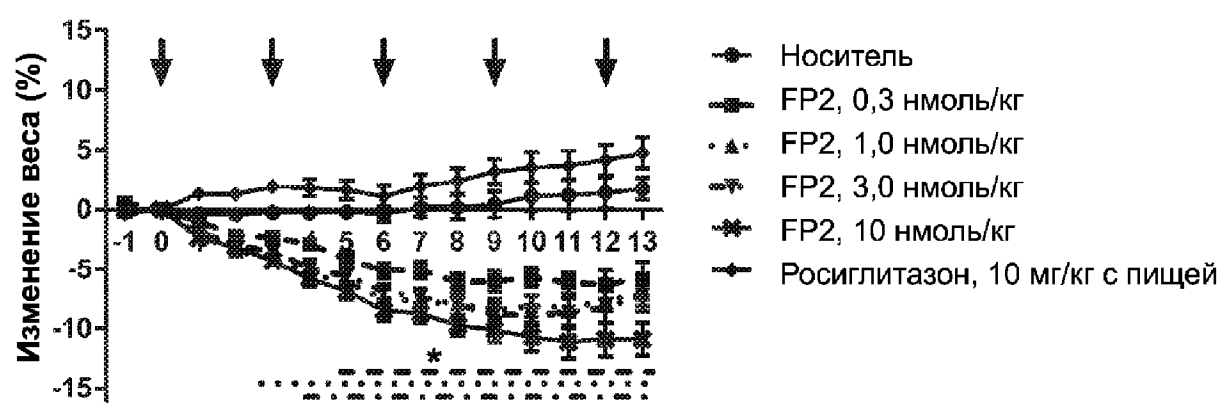
Фиг. 18



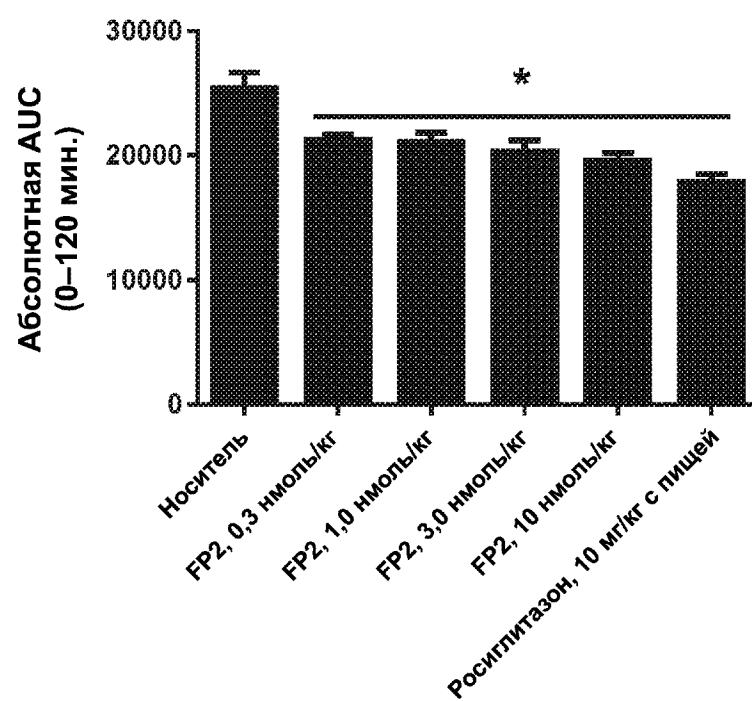
Фиг. 19



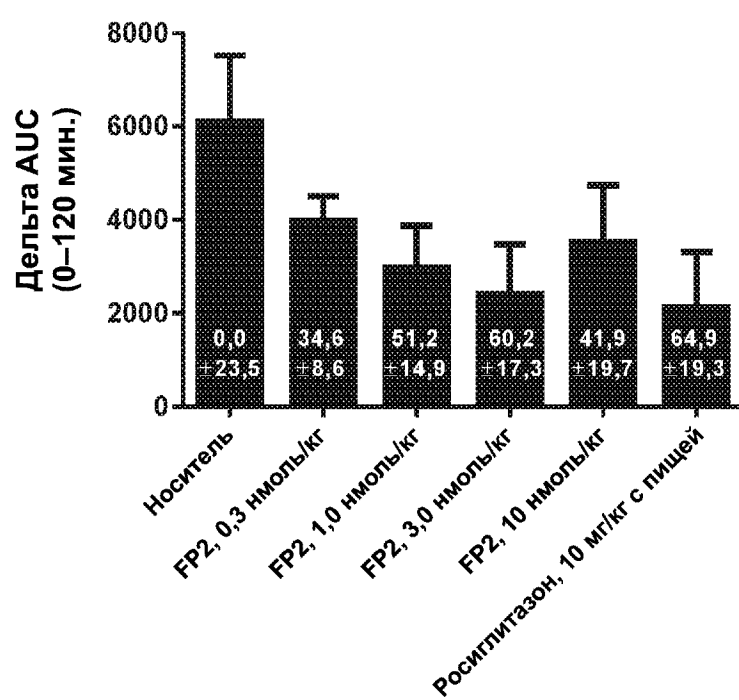
Фиг. 20



Фиг. 21А

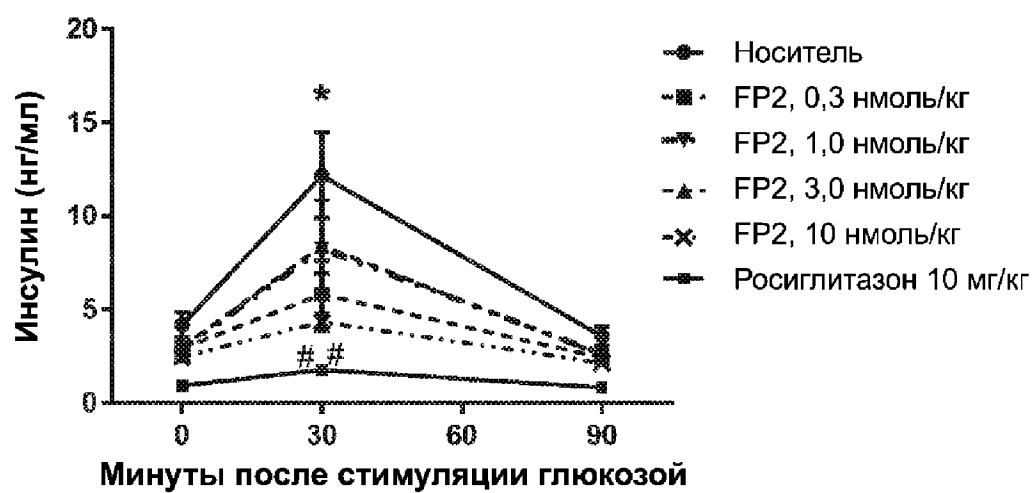


Фиг. 21В

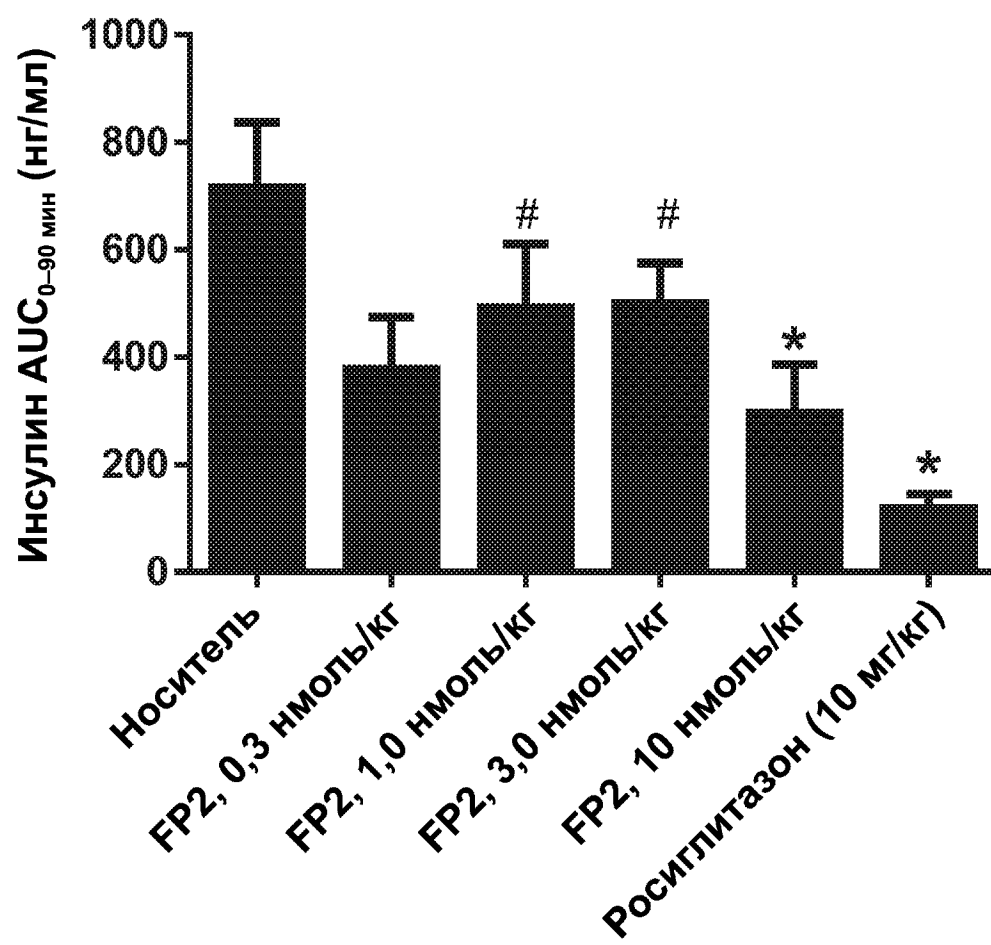




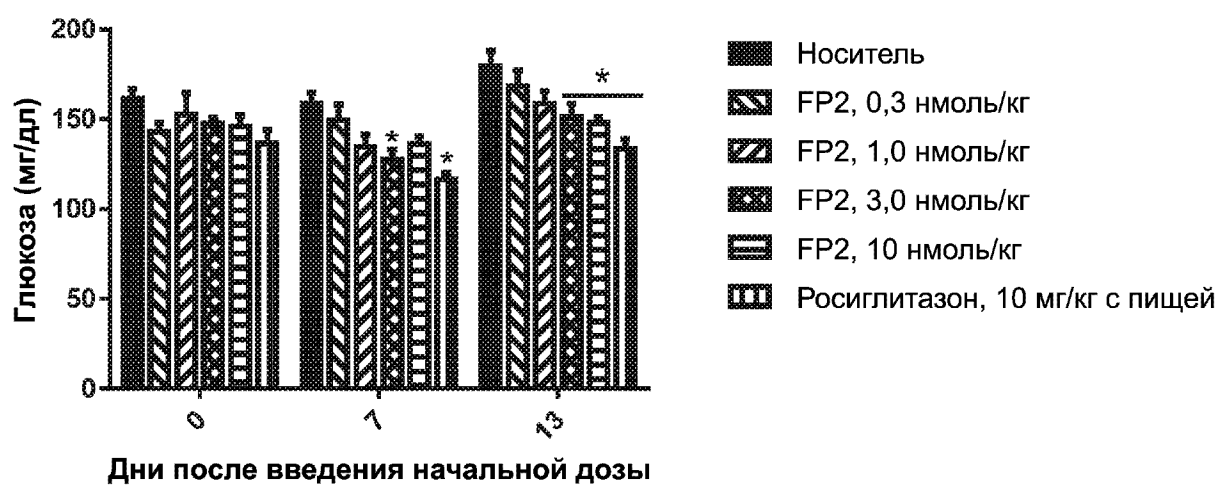
Фиг. 22А



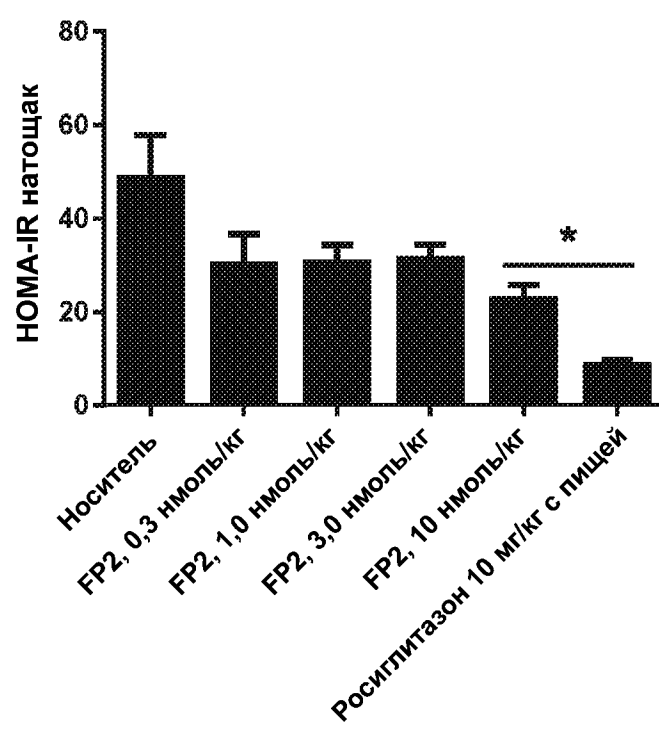
Фиг. 22В



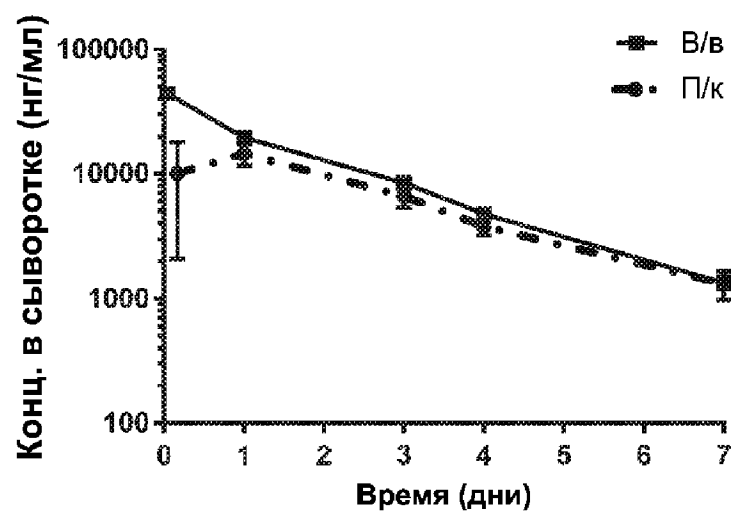
Фиг. 23



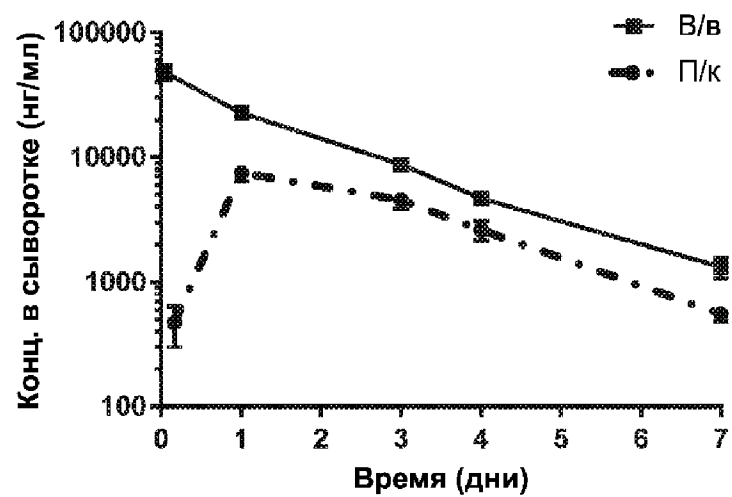
Фиг. 24



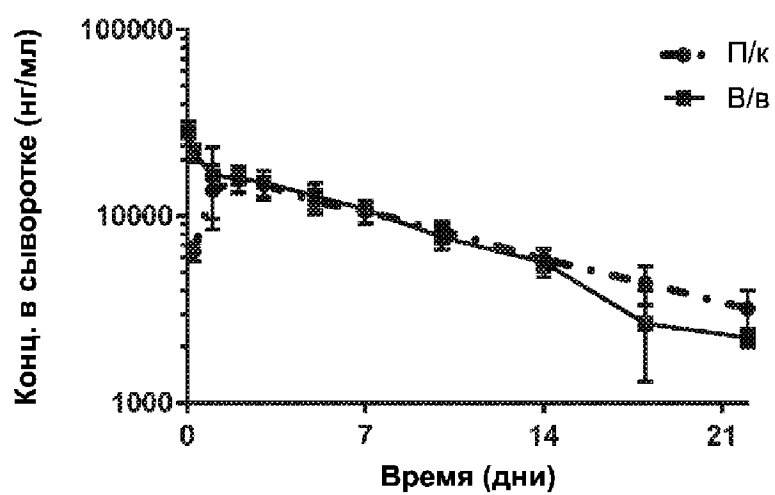
Фиг. 25



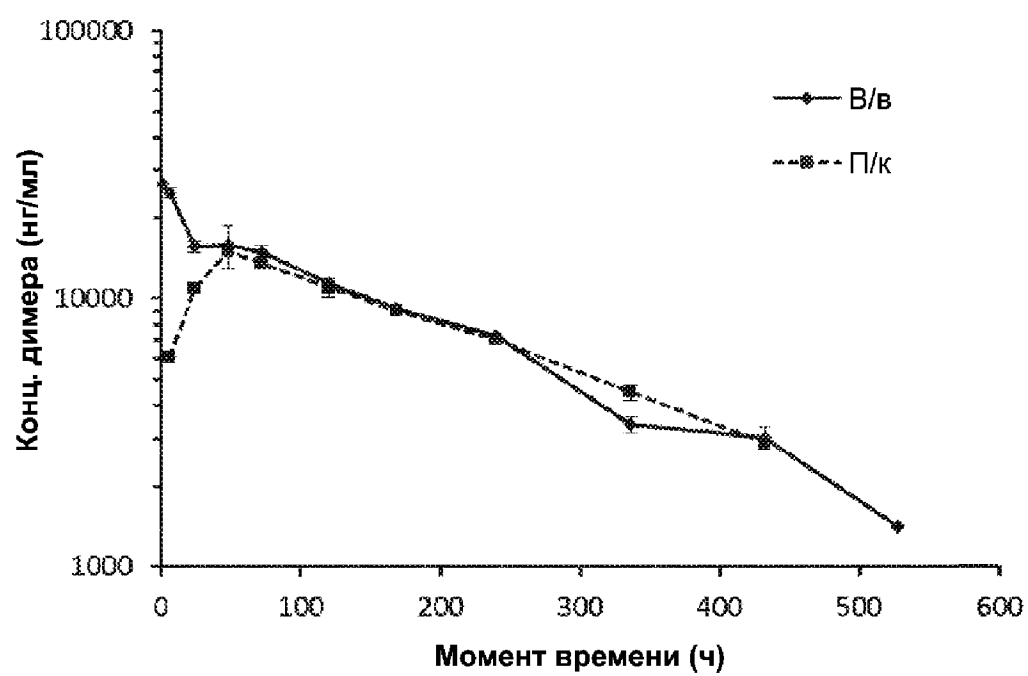
Фиг. 26



Фиг. 27

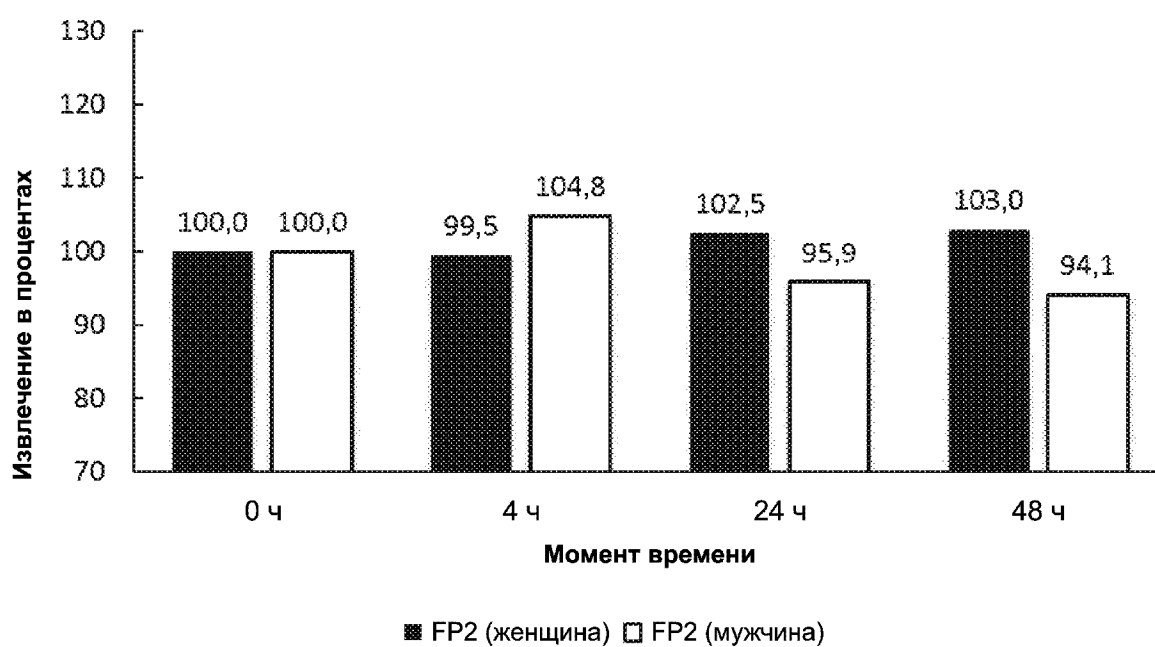


Фиг. 28

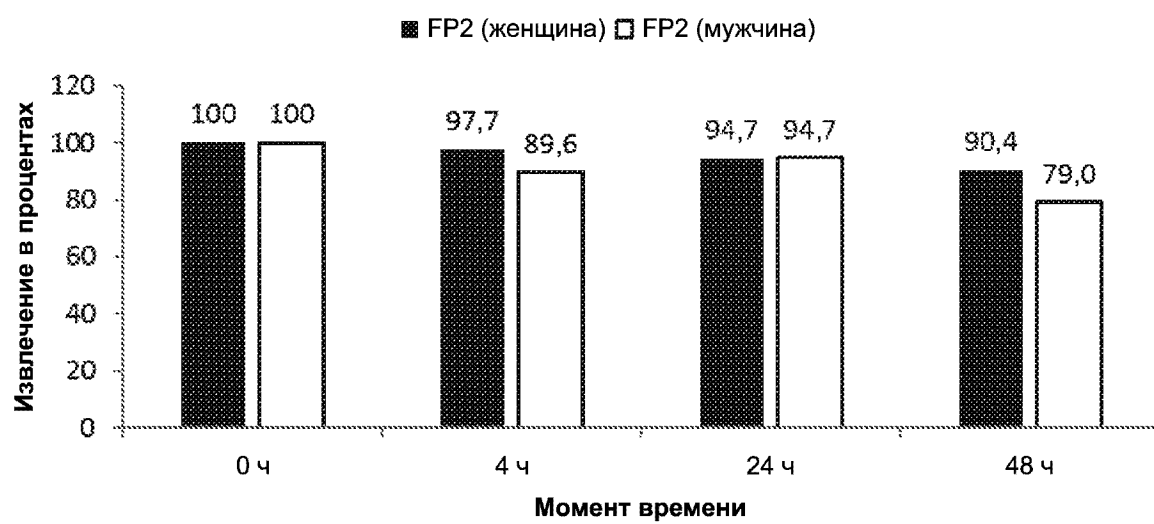




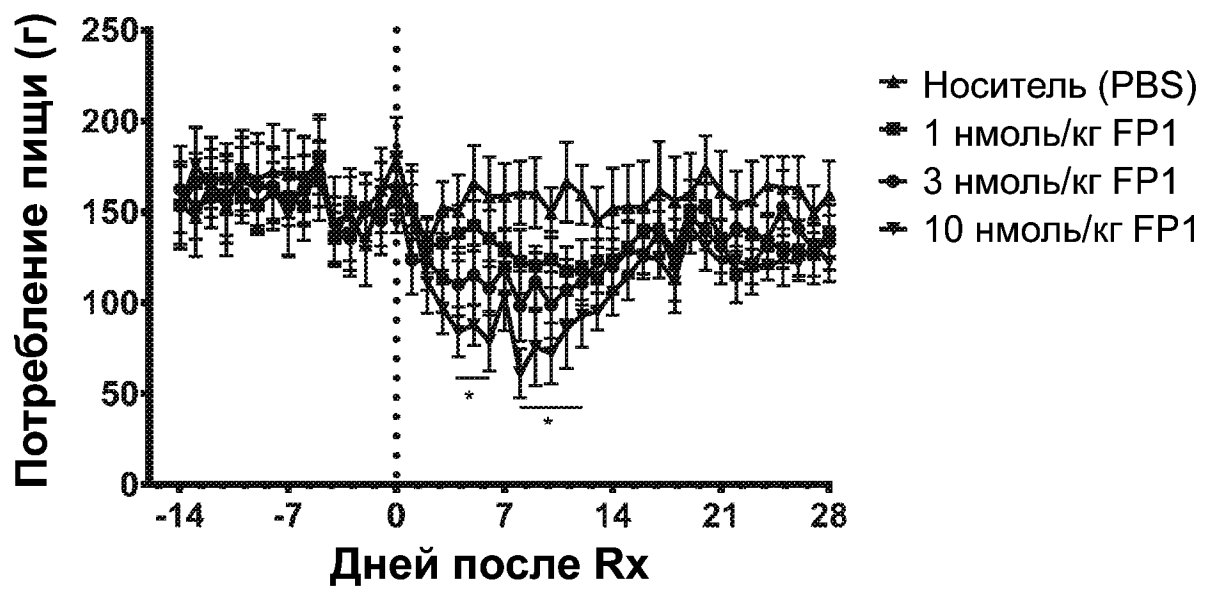
Фиг. 29



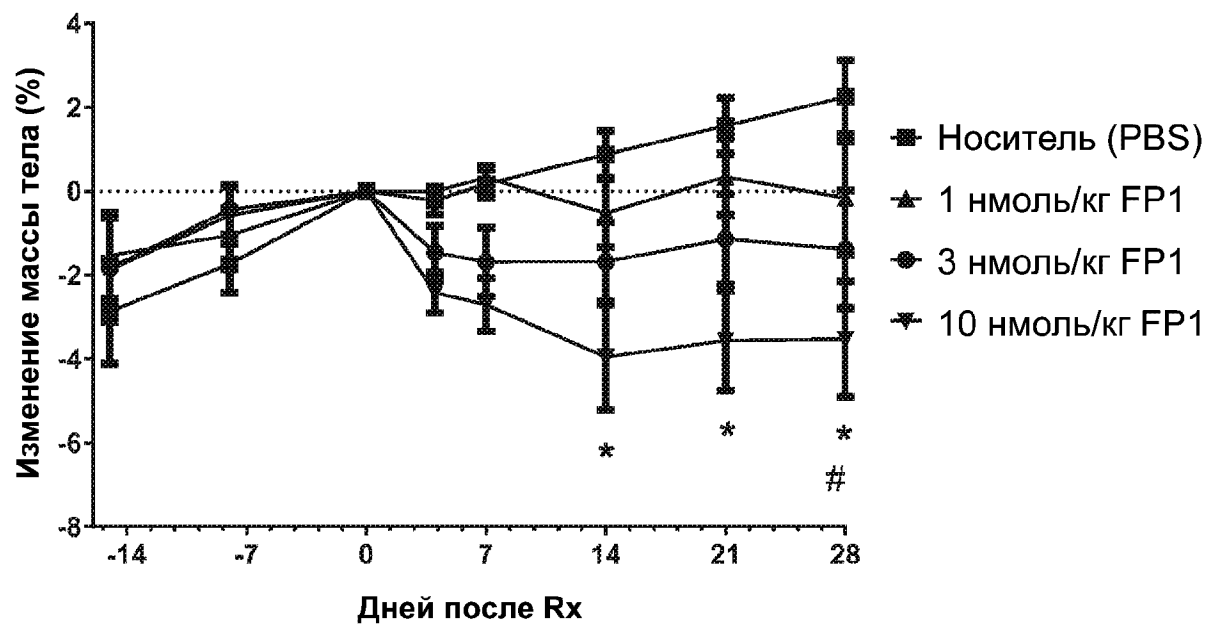
Фиг. 30



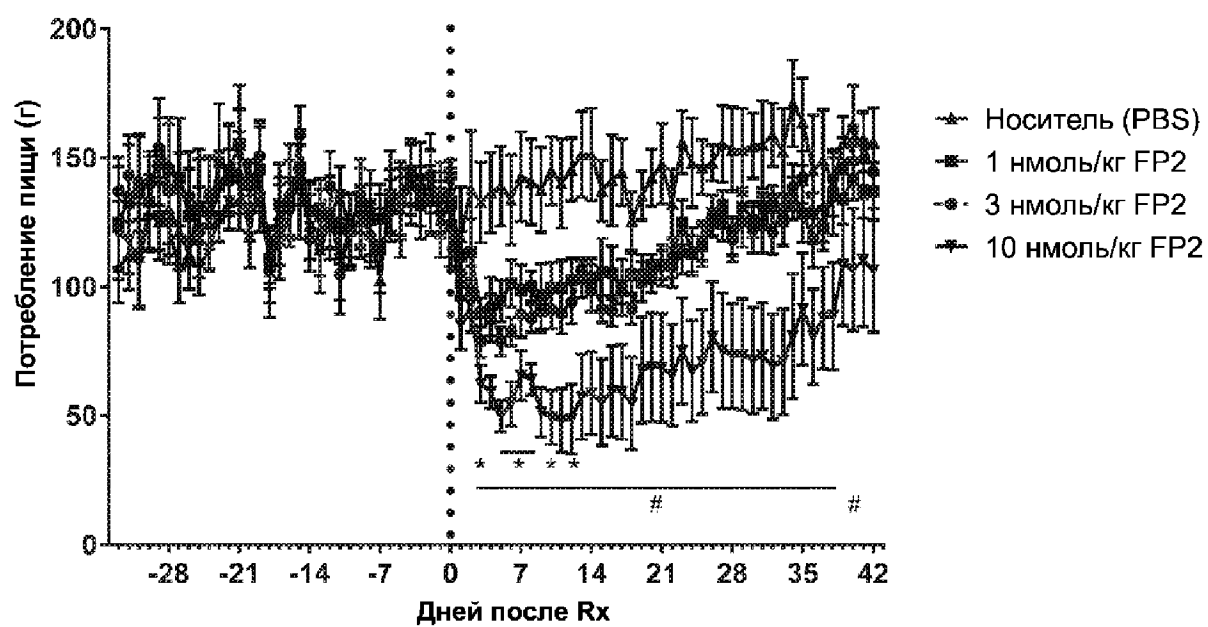
Фиг. 31



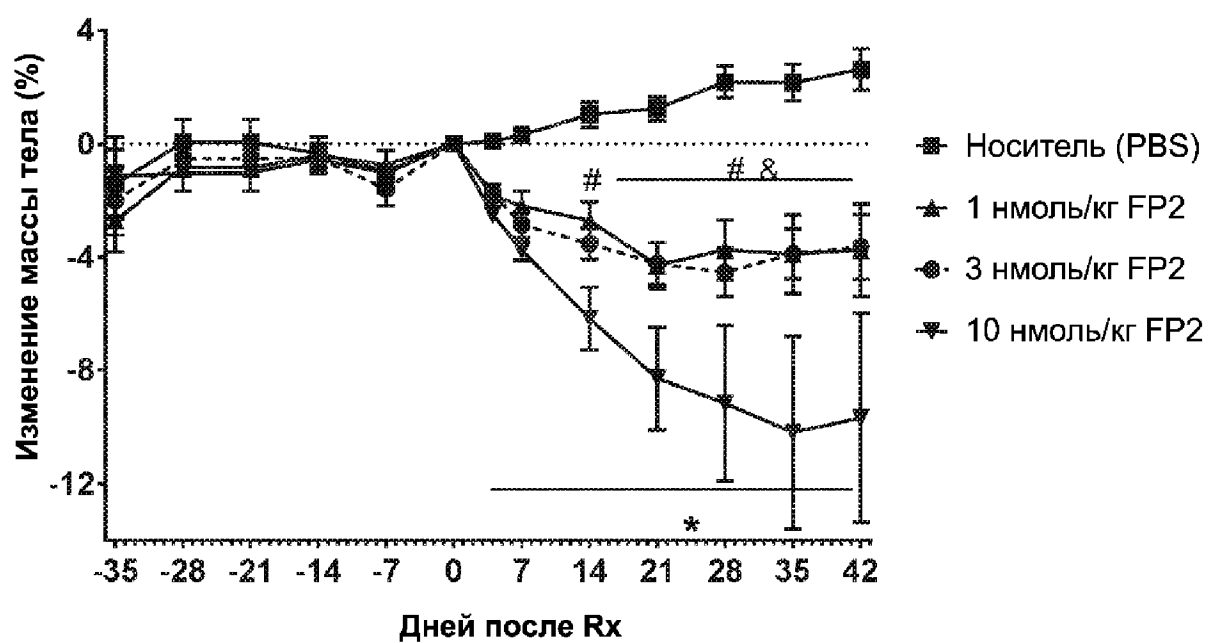
Фиг. 32



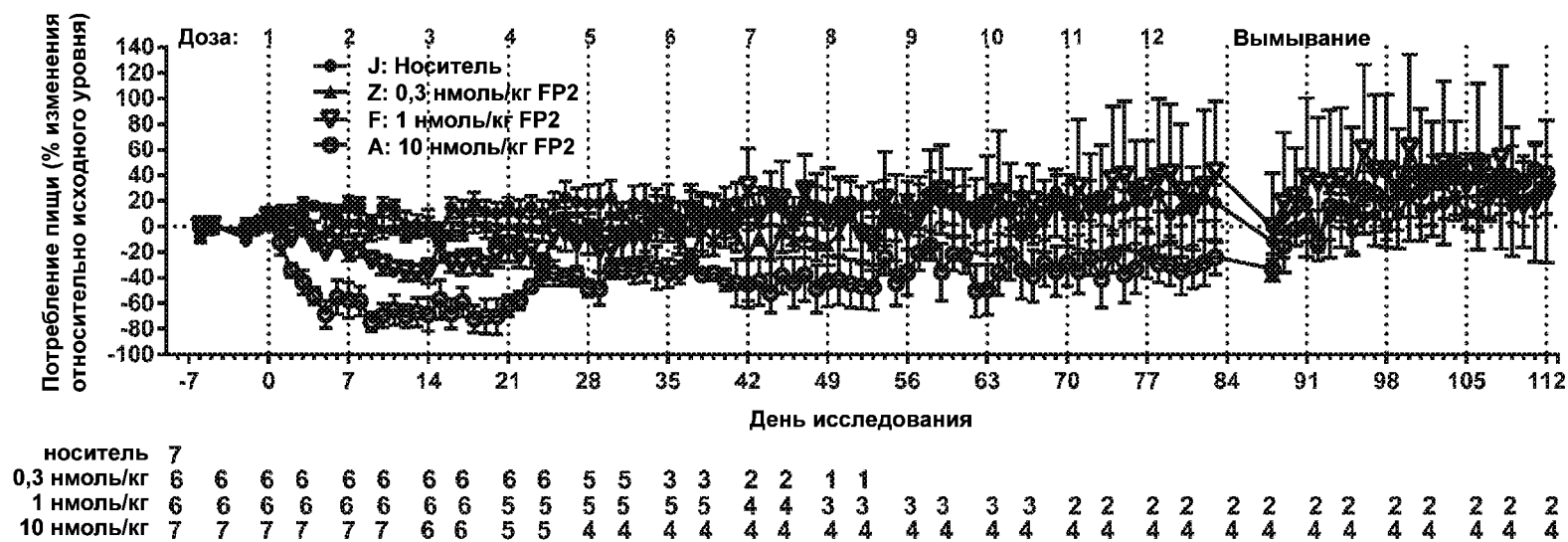
Фиг. 33



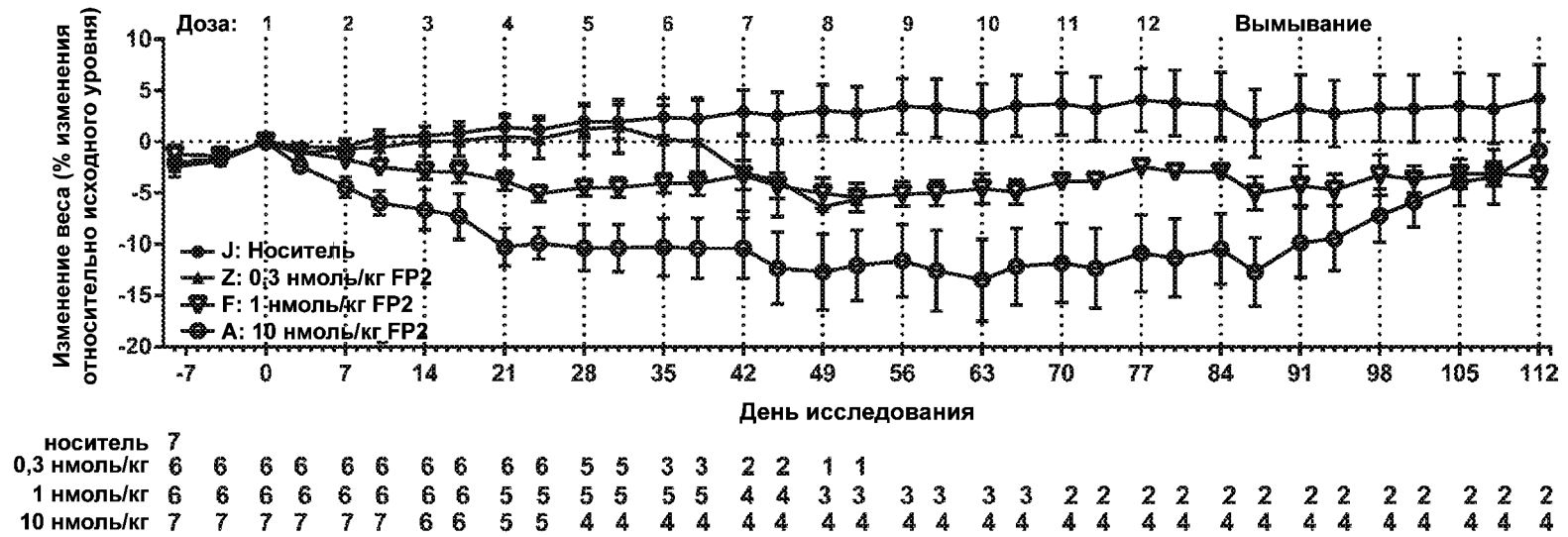
Фиг. 34



39/42



40/42





Фиг. 37



Фиг. 38

