



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021009225-0 A2



(22) Data do Depósito: 19/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 05/10/2021

(54) **Título:** ANÁLOGOS DE GDF15 E MÉTODOS PARA USO NA DIMINUIÇÃO DO PESO CORPORAL E/OU NA REDUÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS

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

(30) **Prioridade Unionista:** 20/11/2018 US 62/769,675.

(71) **Depositante(es):** JANSSEN PHARMACEUTICA NV.

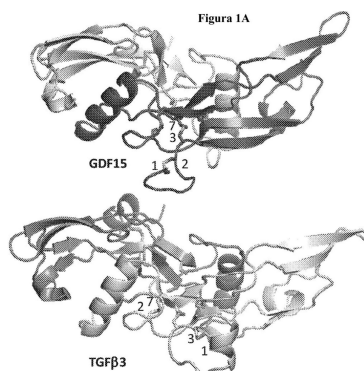
(72) **Inventor(es):** SONGMAO ZHENG; HOLLY KIMKO; ROBERT HERMANN; ELISA FABBRINI; VEDRANA STOJANOVIC-SUSULIC; PAUL ROTHENBERG.

(86) **Pedido PCT:** PCT IB2019059945 de 19/11/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/104948 de 28/05/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 12/05/2021

(57) **Resumo:** ANÁLOGOS DE GDF15 E MÉTODOS PARA USO NA DIMINUIÇÃO DO PESO CORPORAL E/OU NA REDUÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS. A presente invenção está relacionada às proteínas de fusão contendo uma proteína de extensão de meia-vida, um ligante e uma proteína GDF15 que funcionam como agonistas de GDF15. Esses agonistas de GDF15 podem ser úteis no tratamento de obesidade, redução do peso corporal, diminuição da ingestão de alimentos ou diminuição do apetite.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ANÁLOGOS DE GDF15 E MÉTODOS PARA USO NA DIMINUIÇÃO DO PESO CORPORAL E/OU NA REDUÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a proteínas de fusão com GDF15. Em particular, a invenção refere-se a uma proteína de fusão que compreende uma proteína de extensão de meia-vida, um conector ("linker") e uma proteína GDF15, ácidos nucleicos e vetores de expressão que codificam as proteínas de fusão, células recombinantes das mesmas e composições farmacêuticas que compreendem as proteínas de fusão. São apresentados métodos de uso das proteínas de fusão para diminuir o peso corporal e/ou reduzir a ingestão de alimentos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A GDF15, um membro da família TGF β , é uma proteína secretada que circula no plasma como um homodímero de 25 kDa. Os níveis plasmáticos de GDF15 situam-se na faixa entre 150 e 1.150 pg/ml na maioria dos indivíduos (Tsai *et al.*, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012, 3: 239-243). Altos níveis plasmáticos de GDF15 estão associados à perda de peso devido a anorexia e caquexia causadas pelo câncer, e pela insuficiência renal e cardíaca. Em um teste clínico, os níveis de GDF15 foram um preditor independente da resistência à insulina em indivíduos obesos não diabéticos (Kempf *et al.*, *Eur. J. Endo.* 2012, 167: 671-678). Um estudo com gêmeos mostrou que as diferenças nos níveis de GDF15 dentro dos pares de gêmeos tinham correlação com as diferenças de IMC dentro daquele par, sugerindo que a GDF15 serve como um regulador de longo prazo da homeostase de energia (Tsai *et al.*, *PLoS One*. 2015,10(7):e0133362).

[003] Numerosos relatos demonstraram a melhora da sensibili-

dade à insulina e da tolerância à glicose em modelos de camundongo mediante o tratamento com a proteína GDF15. Duas cepas independentes de camundongos transgênicos, que expressam excessivamente a GDF15, tiveram o peso corporal e a massa gorda diminuídos, bem como a tolerância à glicose melhorada (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). Aumentos no gasto de energia corporal total e no metabolismo oxidativo foram relatados em camundongos transgênicos com GDF15 (Chrysovergis *et al.*, 2014, *Id.*). Estes foram acompanhados por um aumento na expressão de genes termogênicos no tecido adiposo marrom e por um aumento na expressão de genes lipolíticos no tecido adiposo branco. Os camundongos desprovidos do gene GDF15 têm peso corporal e massa gorda aumentados (Tsai *et al.*, *PLoS One*. 2013, 8(2):e55174). Uma fusão Fc de GDF15 mostrou diminuir o peso corporal e melhorou a tolerância à glicose bem como a sensibilidade à insulina em um modelo de macaco cynomolgus obeso quando administrada semanalmente durante um período de seis semanas (WO 2013/113008).

[004] Acredita-se que os efeitos da GDF15 sobre o peso corporal sejam mediados através da redução da ingestão de alimento e do aumento do gasto de energia. A GDF15 pode melhorar o controle glicêmico através de mecanismos dependentes e possivelmente independentes do peso corporal.

[005] Juntas, essas observações sugerem que níveis crescentes de GDF15 podem ser benéficos como uma terapia para doenças metabólicas. Existe uma necessidade na técnica de composições à base de GDF15 que podem ser utilizadas para tratar ou evitar doenças, condições ou distúrbios metabólicos.

[006] Os tratamentos atuais para obesidade incluem intervenções dietárias e comportamentais, farmacoterapia e cirurgia bariátrica. Inter-

venções de estilo de vida, inclusive dieta e atividade física aumentada, formam a base de quaisquer esforços para perda de peso e podem ser eficazes na obtenção de perda de peso a curto prazo (3 a 6 meses). Entretanto, na maioria dos casos, a perda de peso obtida com intervenções de estilo de vida não é mantida a longo prazo, e apenas 5 a 10% dos indivíduos são capazes de sustentar uma redução de peso significativa ao longo do tempo (Fisher BL e Schauer P., *Am J Surg.* 2002; 184:9S-16S, Rueda-Claussen CF *et al.*, *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35:475-516). A farmacoterapia é recomendada como terapia de segunda linha quando as alterações de estilo de vida são ineficazes na obtenção de perda de peso significativa. Os medicamentos aprovados nos EUA e na UE para o manejo de peso crônico incluem orlistat (inibidor de lipase gastrointestinal), naltrexona/bupropiona (combinação de um antagonista opioide e um inibidor de reabsorção de dopamina e norepinefrina), e liraglutida (agonista do receptor de peptídeo-1 similar a glucagon); nos EUA, lorcaserina (um agonista seletivo do receptor 5-HT_{2C}) e fentermina/topiramato (combinação de uma amina simpatomimética e um antiepiléptico) também estão disponíveis. Além disso, fentermina, bem como alguns outros agentes anoréxicos (inclusive dietilpropiona, benzofetamina e fendimetrazina), estão registrados nos EUA para uso de curto prazo (até 12 semanas). Em combinação com intervenções comportamentais, esses agentes farmacológicos têm eficácia variável, resultando em uma perda de peso adicional na faixa entre 2% e 10% do peso corporal inicial. Além disso, o uso de agentes farmacológicos pode ser limitado por efeitos colaterais, inclusive efeitos gastrointestinais (isto é, náusea, vômito, inchaço, diarreia), efeitos neuropsiquiátricos (isto é, comprometimento cognitivo, perturbações do sono) e elevações na frequência cardíaca (dependendo do agente específico). Devido a essas limitações inerentes das abordagens farmacológicas disponíveis (eficácia limitada, perfil de segurança e proporção de não responsivos que varia de 30 a 65%), ainda há uma clara

necessidade médica não atendida por terapias farmacológicas para obesidade mais eficazes, seguras e bem toleradas, que também possam melhorar as comorbidades relacionadas à obesidade, como doença cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão. Embora a cirurgia bariátrica (banda gástrica, gastrectomia em manga e derivação gástrica de Roux-en-Y) possa levar a uma perda de peso maior e mais durável do que a terapia médica, variando de aproximadamente 15% a 30% de perda após 10 anos, e possa produzir melhorias notáveis na saúde e reduzir a mortalidade para pacientes com obesidade grave, podem ocorrer complicações perioperatórias (por exemplo, tromboembolismo venoso) e pós-operatórias (por exemplo, náusea, síndrome de esvaziamento, má absorção de vitaminas lipossolúveis). Além disso, dadas as limitações tanto de custo como de capacidade cirúrgica na maioria dos sistemas de saúde, a cirurgia bariátrica pode acomodar apenas uma pequena fração de pacientes elegíveis (Rueda-Claussen CF *et al.*, *Annu. Rev. Nutr.* 2015; 35:475-516). Portanto, existe uma necessidade por terapias de manejo de peso crônico mais eficazes e bem toleradas, que possam também afetar positivamente as comorbidades relacionadas à obesidade, como hipertensão, dislipidemia e diabetes mellitus tipo 2.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] A invenção satisfaz essa necessidade fornecendo um agonista de GDF15, FP2, que representa um novo mecanismo de ação para a redução da ingestão de alimento e para a obtenção de perda de peso. Em estudos de farmacologia e segurança não clínicos, foi demonstrado que a FP2 tem efeitos farmacológicos favoráveis e características de segurança promissoras para se qualificar como um candidato à transição para o desenvolvimento clínico.

[008] Em um aspecto, a invenção apresenta um método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compre-

endendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de cerca de 0,8 mg a cerca de 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de cerca de 80 kg ou mais. Em um aspecto da invenção, o indivíduo está com sobrepeso. Em um aspecto da invenção, o indivíduo tem um IMC de cerca de 25 kg/m² ou mais. Em um aspecto da invenção, o indivíduo tem um IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m². Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,8 mg, cerca de 2,5 mg, cerca de 7,5 mg, cerca de 15 mg, cerca de 30 mg, cerca de 60 mg e cerca de 90 mg. Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma faixa de dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 1,08 mg/kg. Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,18 mg/kg, cerca de 0,36 mg/kg, cerca de 0,72 mg/kg e cerca de 1,08 mg/kg.

[009] Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[0010] Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[0011] Em um aspecto, a invenção apresenta um método para diminuição da ingestão de alimentos em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de cerca de 0,8 mg a cerca de 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais. Em um aspecto da invenção, o indivíduo está com sobrepeso. Em um aspecto da invenção, o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais. Em um aspecto da inven-

ção, o indivíduo tem um IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m². Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,8 mg, cerca de 2,5 mg, cerca de 7,5 mg, cerca de 15 mg, cerca de 30 mg, cerca de 60 mg e cerca de 90 mg. Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma faixa de dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 1,08 mg/kg. Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,18 mg/kg, cerca de 0,36 mg/kg, cerca de 0,72 mg/kg e cerca de 1,08 mg/kg.

[0012] Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[0013] Em um aspecto da invenção, a proteína de fusão é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[0014] Outros aspectos, características e vantagens da invenção ficarão evidentes a partir da divulgação a seguir, incluindo a descrição detalhada da invenção e suas modalidades preferenciais e as reivindicações em anexo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0015] O sumário anteriormente mencionado, bem como a seguinte descrição detalhada da invenção, serão mais bem compreendidos quando lidos em conjunto com os desenhos em anexo. Deve-se compreender que a invenção não se limita às modalidades precisas mostradas nos desenhos.

[0016] Nos desenhos:

[0017] As Figuras 1A e 1B mostram a estrutura cristalina da GDF15, em que o pareamento de dissulfeto do primeiro e do segundo resíduos de cisteína (C1-C2) formou uma laçada no amino-terminal da proteína.

[0018] A Figura 2 mostra os efeitos da administração subcutânea de proteínas de fusão de acordo com modalidades da invenção, por exemplo, proteínas de fusão FP1 (SEQ ID NO: 60) e 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 com uma etiqueta de 6xHis fixada no amino-terminal), sobre a ingestão de alimento em camundongos C57BL/6, em que a ingestão de alimento cumulativa em 24 horas após a administração é mostrada. Os valores mostrados dentro das barras são a porcentagem de redução em comparação ao grupo de veículo (PBS) $\pm$ EPM; N=8 animais por grupo para todos os grupos, exceto N=9 no grupo de FP1 16 nmol/kg. *-p<0,05 em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste ANOVA de um fator e o teste de Tukey para múltiplas comparações.

[0019] A Figura 3 mostra os efeitos da administração subcutânea de FP1 e de 6xHis-FP1 (SEQ ID NO: 26 com uma etiqueta de 6xHis fixada no amino-terminal) sobre a ingestão de alimentos em ratos Sprague-Dawley, sendo mostrada a ingestão de alimento cumulativa 48 horas após a administração. Os valores mostrados dentro das barras são a porcentagem de redução em comparação ao grupo de veículo (PBS) $\pm$ EPM; N=8 animais por grupo. *-p<0,05 em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste ANOVA de um fator e o teste de Tukey para múltiplas comparações.

[0020] A Figura 4 mostra a alteração no peso corporal de camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO, de "diet induced obese") durante o tratamento com FP1. As setas indicam o tempo (dias) da administração subcutânea após a dose inicial (Dia 0); N=8 animais por grupo. *-p<0,05, para o grupo de FP1 1 nmol/kg, em comparação com o veículo; # -p<0,05, para o grupo de FP1 10 nmol/kg, em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste RM ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0021] As Figuras 5A e 5B mostram os níveis de glicose sanguí-

nea em camundongos DIO durante um teste de tolerância à glicose oral (OGTT, de "oral glucose tolerance test") após 14 dias de dosagem de FP1 a cada 3 dias (q3d), os níveis sendo expressos como a área sob a curva. N=8 animais por grupo. *-p<0,05, para o grupo de FP1 1 nmol/kg, em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste ANOVA de um fator e o teste de Tukey para múltiplas comparações.

[0022] A Figura 6 mostra os níveis de glicose sanguínea pós-prandial em camundongos DIO durante o tratamento com FP1. N=8 animais por grupo. *-p<0,05 em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste RM ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0023] A Figura 7 mostra a avaliação do modelo da homeostase em jejum de 4 horas da resistência à insulina (HOMA-IR, de "homeostatic model assessment of insulin resistance") em camundongos DIO após 14 dias de tratamento com FP1. N=8 animais por grupo. *-p<0,05 em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste ANOVA de um fator e o teste de Tukey para múltiplas comparações.

[0024] A Figura 8 mostra a alteração no peso corporal em camundongos *ob/ob* durante o tratamento com FP1 a cada 3 dias (qd3). As setas indicam o tempo (dias) da administração subcutânea após a dose inicial (Dia 0); N=9 animais por grupo. *-p<0,05, para o grupo de FP1 10 nmol/kg, em comparação com o veículo; # - p<0,05, para o grupo de FP1 1 nmol/kg, em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste RM ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0025] A Figura 9 mostra os níveis de glicose sanguínea em camundongos *ob/ob* durante o tratamento com FP1. As setas indicam o tempo (dias) da administração subcutânea após a dose inicial (Dia 0);

N=9 animais por grupo. *-p<0,05, para o grupo de FP1 10 nmol/kg, em comparação com o veículo; # - p<0,05, para o grupo de FP1 1 nmol/kg, em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste RM ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0026] A Figura 10 mostra a média ($\pm$ desvio padrão, DP) do perfil da concentração sérica de fármaco ao longo do tempo de FP1 após a administração intravenosa (IV) e subcutânea (SC) de 2 mg/kg, em camundongos C57Bl/6.

[0027] A Figura 11 mostra a média ($\pm$ DP) do perfil da concentração sérica de fármaco ao longo do tempo de FP1 após a administração IV e SC de 2 mg/kg em ratos Sprague-Dawley.

[0028] A Figura 12 mostra a média ($\pm$ DP) do perfil da concentração sérica de fármaco ao longo do tempo de FP1 após administração IV e SC de 1 mg/kg em macacos cynomolgus, conforme determinado por imunoensaios.

[0029] A Figura 13 mostra a concentração sérica (ng/ml) de FP1 sob a forma de um dímero intacto ao longo do tempo, após uma única administração IV em macacos cynomolgus, conforme determinado mediante análise de captura por imunoafinidade (IA) e LCMS.

[0030] A Figura 14 mostra a concentração sérica (ng/ml) de FP1 sob a forma de um dímero intacto ao longo do tempo, após uma única administração IV em macacos cynomolgus, conforme determinado mediante análise de captura por imunoafinidade e LCMS.

[0031] A Figura 15 mostra a concentração de FP1, representado como uma porcentagem da concentração inicial, após 0, 4, 24 e 48 horas de incubação *ex vivo* no plasma obtido a partir de dois pacientes humanos (Sub), conforme determinado por imunoensaio.

[0032] A Figura 16 mostra a concentração média de FP1, representada como uma porcentagem de tempo 0, sob a forma de um dí-

mero intacto depois de 0, 4, 24 e 48 horas de incubação *ex vivo* em plasma obtido de dois pacientes humanos (Sub), conforme determinado mediante análise de captura por imunoafinidade e LCMS de massa intacta.

[0033] A Figura 17 mostra a ingestão aguda de alimento em camundongos machos C57BL6N magros, antes e depois da administração de diversas variantes de GDF15 com deleção amino-terminal. (SEQ ID NOs: 92, 111 e 112, em comparação com a fusão de tipo selvagem sem nenhuma deleção (SEQ ID 26 com uma etiqueta 6xHis fixada no amino-terminal). N=8 animais por grupo; *-p<0,05 em comparação com o veículo; os valores de p foram calculados usando o teste RM ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0034] A Figura 18 mostra o efeito de uma dose única de FP2 sobre a ingestão de alimento em camundongos C57BL/6; especificamente, é mostrada a ingestão cumulativa de alimento 24 horas após a administração. Os valores mostrados dentro das barras são a porcentagem de redução em comparação ao grupo STF (média ± EPM); N=8 animais por grupo para todos os grupos, exceto N=6 em 6xHis-FP1. **-p<0,01, ***-p<0,001, ****-p<0,0001; os valores de p foram calculados usando o teste ANOVA de dois fatores e o teste de Dunnett para múltiplas comparações.

[0035] A Figura 19 mostra a ingestão cumulativa de alimento medida em ratos Sprague-Dawley 24 horas após a administração de uma dose única de FP2. Os valores mostrados dentro das barras são a porcentagem de redução em comparação ao grupo STF (média ± EPM); N=8 animais por grupo. **-p<0,01, sendo os valores de p calculados usando os testes ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações.

[0036] A Figura 20 mostra a porcentagem de alteração no peso corporal durante o tratamento com FP2 q3d em camundongos DIO. As setas indicam o momento das injeções subcutâneas de FP2; N=6

animais por grupo; *-p,0,05, em comparação com o veículo, usando os testes de ANOVA de dois fatores e de Tukey para múltiplas comparações;

[0037] As Figuras 21A e 21B mostram a área sob a curva (ASC) para os níveis de concentração de glicose sanguínea durante um teste de OGTT após 14 dias de dosagem de FP2 q3d em camundongos DIO. *-p<0,05, com o uso dos testes de comparações múltiplas ANOVA de um fator e de Tukey, usando n=8 animais por grupo.

[0038] A Figura 22A mostra os níveis plasmáticos de insulina durante um OGTT após 8 dias de dosagem de FP2 q3d em camundongos DIO. *-p<0,05, veículo x FP2 (0,3 nmol/Kg), FP2 (10 nmol/Kg) e rosiglitazona. # -p<0,05, em comparação com a rosiglitazona (10 mg/kg), com o uso dos testes de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores e de Tukey.

[0039] A Figura 22B mostra a ASC para os níveis plasmáticos de insulina durante um OGTT após 8 dias de dosagem de FP2 q3d em camundongos DIO. *-p<0,05, em comparação com o veículo; # -p<0,05, em comparação com a rosiglitazona.

[0040] A Figura 23 mostra os níveis de glicose sanguínea pós-prandial após 8 dias de dosagem de FP2 q3d em camundongos DIO. *-p<0,05, em comparação com o veículo, com o uso dos testes de comparações múltiplas ANOVA RM de dois fatores e de Tukey, n=8 animais por grupo.

[0041] A Figura 24 mostra o HOMA-IR de jejum após 14 dias de tratamento com FP2 q3d, seguido de 5 horas de jejum no Dia 14, em camundongos DIO. *-p<0,05, em comparação com o veículo, com o uso dos testes de comparações múltiplas de ANOVA de um fator e de Tukey, para n=8 animais por grupo.

[0042] A Figura 25 mostra as concentrações séricas de FP2 após a administração de 2 mg/kg por via intravenosa (IV) e de 2 mg/kg por

via subcutânea (SC) em camundongos C57Bl/6. Os valores representam a média $\pm$ DP (n=5 amostras por ponto no tempo).

[0043] A Figura 26 mostra as concentrações séricas de FP2 após a administração de 2 mg/kg por via intravenosa (IV) e de 2 mg/kg por via subcutânea (SC) em ratos Sprague-Dawley. N=5 amostras por ponto no tempo.

[0044] A Figura 27 mostra as concentrações plasmáticas de FP2 em macacos cynomolgus analisadas por imunoensaio. Os valores representam a média $\pm$ DP de n=3, exceto n=2 para IV no Dia 22 (528 horas). IV - intravenosa, SC - subcutânea.

[0045] A Figura 28 mostra as concentrações plasmáticas de FP2 sob a forma de dímero intacto em macacos cynomolgus, analisadas por LCMS. Os valores representam a média $\pm$ EPM de n=3, exceto n=2 para subcutânea (SC) em 168 horas, n=1 para SC em 120 horas e 432 horas, e n=1 para IV - intravenosa em 168 horas e 432 horas.

[0046] A Figura 29 mostra a estabilidade de FP2 *ex vivo* (porcentagem de recuperação normalizada) ao longo de 48 horas no plasma humano medida por imunoensaio.

[0047] A Figura 30 mostra a estabilidade de FP2 *ex vivo* (porcentagem normalizada de recuperação) ao longo de 48 horas no plasma humano medida por LC/MS intacta.

[0048] A Figura 31 mostra a ingestão diária de alimento (g) antes e depois de uma dose única de FP1 em macacos cynomolgus. *-p<0,05 para 10 mg/kg de FP1 em comparação com o veículo.

[0049] A Figura 32 mostra a porcentagem de alteração no peso corporal antes e depois de uma dose única de FP1 em macacos cynomolgus. *-p<0,05 para 10 mg/kg de FP1 em comparação com o veículo; # -p<0,05 para 3 mg/kg em comparação com o veículo com o uso dos testes de comparações múltiplas ANOVA RM de dois fatores e de Tukey, para n=8 animais por grupo.

[0050] A Figura 33 mostra a ingestão diária de alimento (g) antes e depois de uma dose única de FP2 em macacos cynomolgus. *- $p<0,05$, em comparação com o veículo, com o uso dos testes de comparações múltiplas ANOVA RM de dois fatores e de Tukey, para $n=8$ animais por grupo.

[0051] A Figura 34 mostra a porcentagem de alteração no peso corporal antes e depois de uma dose única de FP2 em macacos cynomolgus. *- $p<0,05$, para 10 nmol/kg de FP2 em comparação com o veículo, # - $p<0,05$, para 3 nmol/kg de FP2 em comparação com o veículo, e - $p<0,05$, para 1 nmol/kg de FP2 em comparação com o veículo, com o uso dos testes de comparações múltiplas ANOVA RM de dois fatores e de Tukey, para $n=8$ animais por grupo.

[0052] A Figura 35 mostra a ingestão de alimentos em macacos cynomolgus espontaneamente obesos durante um período de 12 semanas de administração subcutânea de FP2 uma vez por semana, normalizada como porcentagem de redução em relação à linha de base, calculada como ingestão diária média de alimento durante a semana anterior à dosagem. Os dados representaram a média $\pm$ EPM, com o número N de animais abaixo do gráfico; as barras de erro foram $\pm$ faixa para $N=2$.

[0053] A Figura 36 mostra o peso corporal (porcentagem de alteração em relação à linha de base) em macacos cynomolgus espontaneamente obesos durante um período de 12 semanas de administração subcutânea de FP2 uma vez por semana. Os dados representaram a média $\pm$ EPM, com o número N de animais abaixo do gráfico; as barras de erro foram $\pm$ faixa para $N=2$.

[0054] A Figura 37 mostra a concentração sérica (nM) de FP2 medida por imunoenensaio em macacos cynomolgus espontaneamente obesos durante um período de 12 semanas de administração subcutânea de FP2 uma vez por semana. Os dados representaram a média $\pm$ EPM, com

o número N de animais com exposição detectável abaixo do gráfico; as barras de erro foram $\pm$ faixa para N=2.

[0055] A Figura 38 mostra uma visão geral esquemática do estudo. GD - grupo de dosagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0056] Várias publicações, artigos e patentes são citados ou descritos em segundo plano e ao longo do relatório descritivo; cada uma dessas referências está aqui incorporada por referência em sua totalidade. A discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou similares que tenha sido incluída no presente relatório descritivo tem o propósito de fornecer contexto para a invenção. Tal discussão não é uma admissão de que qualquer um ou todos esses assuntos façam parte da técnica anterior no que diz respeito a quaisquer invenções divulgadas ou reivindicadas.

[0057] Exceto onde definido em contrário, todos os termos técnicos e científicos utilizados na presente invenção têm o mesmo significado comumente compreendido pelo versado na técnica à qual essa invenção pertence. De outro modo, certos termos utilizados na presente invenção têm os significados conforme definidos no relatório descritivo. Todas as patentes, pedidos de patente publicados e publicações aqui citadas estão aqui incorporados por referência como se aqui fossem apresentados totalmente. Deve-se observar que, conforme usado na presente invenção e nas reivindicações em anexo, as formas no singular "um/uma" e "o/a" incluem a referência no plural, salvo se o contexto claramente indicar o contrário.

[0058] A invenção refere-se a uma proteína de fusão que compreende: (a) uma proteína de extensão de meia-vida, (b) um conector, e (c) uma proteína GDF15, sendo que a proteína de fusão é disposta do amino-terminal para o C-terminal na ordem (a)-(b)-(c).

[0059] Descobriu-se que uma proteína de fusão, de acordo com

uma modalidade da invenção, que compreende uma proteína de extensão de meia-vida, um conector e uma proteína GDF15, resulta em uma meia-vida aumentada da proteína GDF15, e que as proteínas de fusão da invenção exibem efeitos metabólicos que demonstram sua adequação como produtos terapêuticos para tratamento e prevenção de doenças, condições ou distúrbios metabólicos. Tais efeitos incluem, mas não se limitam a, diminuir o peso corporal, aumentar a tolerância à glicose e melhorar a sensibilidade à insulina dos animais aos quais foram administradas as proteínas de fusão.

[0060] Como usado aqui, o termo "proteína de fusão" refere-se a uma proteína que tem duas ou mais porções ligadas covalentemente em conjunto, sendo que cada uma das porções é derivada de diferentes proteínas.

[0061] As proteínas de fusão de acordo com modalidades da invenção podem incluir qualquer proteína GDF15. Como usado aqui, o termo "proteína GDF15" refere-se a qualquer proteína do fator de diferenciação de crescimento 15 selvagem de ocorrência natural ou uma variante funcional da mesma. A proteína GDF15 pode ser proveniente de qualquer mamífero, como um ser humano ou outro mamífero adequado, como um camundongo, coelho, rato, porco, cão ou um primata. Em modalidades específicas, a proteína GDF15 é uma proteína GDF15 humana ou uma variante funcional da mesma. Em modalidades preferenciais, a proteína GDF15 é uma proteína GDF15 madura ou uma variante funcional da mesma.

[0062] Como usado aqui, o termo "proteína GDF15 madura" refere-se à porção da pré-pró-proteína de GDF15 que é liberada da proteína de comprimento total após a clivagem intracelular no sítio de clivagem do tipo furina RXXR. As proteínas GDF15 maduras são secretadas como homodímeros ligados por ligações dissulfeto. Em uma modalidade da invenção, uma proteína GDF15 madura, abreviada como

GDF15(197-308) (SEQ ID NO: 6), contém os aminoácidos 197 a 308 de uma proteína GDF15 humana de comprimento total.

[0063] Como usado aqui, "variante funcional" refere-se a uma variante de uma proteína original que tem uma identidade de sequência substancial ou significativa em relação à proteína original e retém ao menos uma das atividades biológicas da proteína original. Uma variante funcional de uma proteína original pode ser preparada por meios conhecidos na técnica tendo em vista a presente divulgação. Uma variante funcional pode incluir uma ou mais modificações na sequência de aminoácidos da proteína original. As modificações podem alterar as propriedades físico-químicas do polipeptídeo, por exemplo, por meio da melhora da estabilidade térmica do polipeptídeo, alteração da especificidade de substrato, alteração do nível ótimo de pH e similares. As modificações podem, também, alterar as atividades biológicas da proteína original, contanto que elas não destruam ou eliminem todas as atividades biológicas da proteína original. As modificações também podem ser deleções ou inserções de um ou mais aminoácidos.

[0064] De acordo com outras modalidades da invenção, uma variante funcional de uma proteína original compreende uma deleção e/ou inserção de um ou mais aminoácidos na proteína original. Por exemplo, uma variante funcional de uma proteína GDF15 madura pode incluir uma deleção e/ou inserção de 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 ou mais aminoácidos na proteína GDF15 madura, de preferência, uma deleção de 1 a 30 aminoácidos no amino-terminal da proteína GDF15 madura.

[0065] De acordo com modalidades da invenção, uma proteína de fusão da invenção compreende uma proteína GDF15 que tem uma sequência de aminoácidos ao menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de um GDF15 maduro, como GDF15(197-308) (SEQ ID

NO: 6); ou uma sequência de aminoácidos ao menos 90% idêntica à sequência de aminoácidos de um GDF15 maduro truncado no amino-terminal, como 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) ou GDF15(211-308) (SEQ ID NO: 11). A proteína GDF15 pode ter ao menos uma dentre substituições, inserções e deleções na SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 ou 11, contanto que se mantenha ao menos uma dentre as atividades biológicas da proteína GDF15, como seus efeitos sobre a ingestão de alimento, níveis de glicose sanguínea, resistência à insulina e peso corporal etc.

[0066] Em modalidades específicas, uma proteína de fusão da invenção compreende uma proteína GDF15 que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11, incluindo, mas não se limitando à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 ou 11.

[0067] Qualquer proteína de extensão de meia-vida adequada pode ser utilizada em proteínas de fusão de acordo com modalidades da invenção. Como usado aqui, o termo "proteína de extensão de meia-vida" pode ser qualquer proteína, ou fragmento da mesma, que seja conhecida por estender a meia-vida das proteínas às quais ela é fundida. Exemplos de tais proteínas de extensão de meia-vida incluem, mas não se limitam à albumina sérica humana (HSA, de "human serum albumin"), ao domínio de fragmento constante (Fc) de uma imunoglobulina (Ig) ou à transferrina (Tf). Em modalidades da invenção, a proteína de extensão de meia-vida compreende HSA ou uma variante funcional da mesma. Em modalidades específicas da invenção, a proteína de extensão de meia-vida compreende uma sequência de aminoácidos que é ao menos 90% idêntica à SEQ ID NO: 1. Em modalidades preferenciais da invenção, a proteína de extensão de meia-vida compreende HSA ou uma variante funcional da mesma, sendo que o resíduo de cisteína na posição 34 da HSA foi substituído por serina ou

alanina.

[0068] Em modalidades específicas, a proteína de fusão da invenção compreende uma proteína de extensão de meia-vida que tem uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 1 a 3.

[0069] Qualquer conector adequado pode ser utilizado em proteínas de fusão de acordo com as modalidades da invenção. Como usado aqui, o termo "conector" refere-se a uma porção de ligação que compreende um conector peptídico. De preferência, o conector ajuda a assegurar a flexão correta, minimiza o impedimento estérico e não interfere significativamente com a estrutura de cada componente funcional dentro da proteína de fusão. Em algumas modalidades da invenção, o conector peptídico compreende de 2 a 120 aminoácidos. Por exemplo, o conector peptídico compreende 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 ou 120 aminoácidos.

[0070] Em modalidades da invenção, o conector aumenta a flexibilidade dos componentes da proteína de fusão. Em modalidades específicas da invenção, o conector pode ser um conector flexível que compreende a sequência (GGGGS)_n, incluindo, mas não se limitando a, GS-(GGGGS)_n ou AS-(GGGGS)_n-GT, em que n é de 2 a 20, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15.

[0071] Em outras modalidades da invenção, o conector é estruturado. Em modalidades específicas da invenção, o conector pode ser um conector estruturado que compreende a sequência (AP)_n ou (EAAAK)_n, incluindo, mas não se limitando a, AS-(AP)_n-GT ou AS-

(EAAAK)_n-GT, em que n é de 2 a 20, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15. Em outras modalidades da invenção, o conector compreende as sequências (GGGGA)_n, (PGGGS)_n, (AGGGS)_n ou GGS-(EGKSSGSGSESKST)_n-GGS, em que n é de 2 a 20.

[0072] Em modalidades da invenção, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos que tem ao menos 90% de identidade de sequência com as SEQ ID NOs: 5, 25 a 30, 36 e 37, 40, 48, 55 e 56, 59 e 60 ou 64 a 75. Em modalidades específicas da invenção, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 5, 25 a 30, 36 e 37, 40, 48, 55 e 56, 59 e 60 e 64 a 75. Em modalidades mais específicas da invenção, a proteína de fusão compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 5, 25 a 30, 40, 55 e 56, 55 e 56, 59 e 60 e 70. Em modalidades adicionais mais específicas da invenção, a proteína de fusão compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 60 ou SEQ ID NO: 26. A proteína de fusão pode incluir também pequenas extensões na extremidade amino ou carbóxi-terminal da proteína, como uma etiqueta que facilita a purificação, como uma etiqueta de poli-histidina, um epítopo antigênico ou um domínio de ligação.

[0073] As proteínas de fusão divulgadas na presente invenção podem ser caracterizadas ou avaliadas quanto às atividades biológicas de GDF15 incluindo, mas não se limitando a, efeitos sobre a ingestão de alimento, testes de tolerância à glicose oral, medições dos níveis de glicose sanguínea, análise de resistência à insulina, alterações no peso corporal, análise farmacocinética, análise toxicocinética, imunoensaio e análise por espectrometria de massa do nível e da estabilidade das proteínas de fusão de comprimento total, e análise da estabilidade no plasma humano *ex vivo*.

[0074] A invenção fornece também uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma proteína de fusão da invenção. Em modalidades da invenção, a molécula de ácido nucleico isolada codifica uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos que tem ao menos 90% de identidade de sequência com as SEQ ID NOs: 5, 25 a 30, 36 e 37, 40, 48, 55 e 56, 59 e 60, 64 a 75 ou 92. Em modalidades específicas, a molécula de ácido nucleico isolada codifica uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 5, 25 a 31, 36 e 37, 40, 48, 55 e 56, 59 e 60, 64 a 75 e 92. Em modalidades mais específicas, a molécula de ácido nucleico isolada codifica uma proteína de fusão que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 5, 25 a 30, 40, 55 e 56, 59 e 60, 70 e 92. Em modalidades mais específicas, a molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 76 a 91, 95 e 110.

[0075] De acordo com outras modalidades da invenção, a molécula de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão pode estar em um vetor de expressão. Os vetores de expressão incluem, mas não se limitam a, vetores para expressão de proteína recombinante e vetores para a aplicação de ácidos nucleicos em um indivíduo para expressão em um tecido do indivíduo, como vetores virais. Exemplos de vetores virais adequados ao uso com a invenção incluem, mas não se limitam a, vetores adenovirais, vetores virais adeno-associados, vetores lentivirais, etc. O vetor pode, também, ser um vetor não viral. Exemplos de vetores não virais incluem, mas não se limitam a, plasmídios, cromossomos artificiais bacterianos, cromossomos artificiais de levedura, bacteriófagos, etc. O vetor pode incluir qualquer elemento para estabelecer uma função convencional de um vetor de expressão, por exemplo, um promotor, um elemento de ligação a ribossomo, um terminador, um intensificador, um marcador de seleção ou uma origem de replicação.

[0076] De acordo com outras modalidades da invenção, a molécula de ácido nucleico que codifica a proteína de fusão pode ter códons otimizados para uma expressão recombinante aprimorada a partir de uma célula hospedeira desejada, como células embrionárias de rim humano (HEK, de "human embryonic kidney") ou de ovário de hamster chinês (CHO, de "chinese hamster ovary"), com o uso de métodos conhecidos na técnica tendo em vista a presente divulgação.

[0077] A invenção fornece também uma célula hospedeira que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão da invenção. As células hospedeiras incluem, mas não se limitam a, células hospedeiras para expressão de proteína recombinante e células hospedeiras para a aplicação do ácido nucleico em um indivíduo para expressão em um tecido do indivíduo. Exemplos de células hospedeiras adequadas ao uso com a invenção incluem, mas não se limitam a, células HEK ou CHO.

[0078] Em um outro aspecto geral, a invenção refere-se a um método para a obtenção de uma proteína de fusão da invenção. Em um aspecto geral, o método compreende: (1) cultivar uma célula hospedeira que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão sob uma condição em que a proteína de fusão é produzida, e (2) recuperar a proteína de fusão produzida pela célula hospedeira. A proteína de fusão pode ser purificada adicionalmente com o uso de métodos conhecidos na técnica.

[0079] Em algumas modalidades, a proteína de fusão é expressa em células hospedeiras e purificada a partir das mesmas com o uso de uma combinação de uma ou mais técnicas de purificação padrão, incluindo, mas não se limitando a, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, ultrafiltração e diálise. De preferência, a proteína de fusão é purificada a fim de ser isenta de quaisquer proteases.

[0080] A invenção fornece também uma composição farmacêutica que compreende uma proteína de fusão da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0081] A invenção fornece adicionalmente uma composição que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições que compreendem uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de fusão da invenção podem compreender um veículo de aplicação para a introdução da molécula de ácido nucleico em uma célula para a expressão da proteína de fusão. Exemplos de veículos de aplicação de ácido nucleico incluem lipossomas, polímeros biocompatíveis, incluindo polímeros naturais e polímeros sintéticos, lipoproteínas, polipeptídeos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos, envelopes virais artificiais, partículas de metal, e bactérias, vírus, como baculovírus, adenovírus e retrovírus, bacteriófagos, cosmídeos, plasmídeos, vetores fúngicos e outros veículos de recombinação tipicamente utilizados na técnica que foram descritos para expressão em uma variedade de hospedeiros eucarióticos.

[0082] A invenção refere-se também a kits que compreendem a composição farmacêutica da invenção. Os kits podem conter um primeiro recipiente com uma proteína de fusão seca da invenção e um segundo recipiente com uma solução aquosa a ser misturada com a proteína de fusão seca antes da administração a um indivíduo, ou um único recipiente contendo uma composição farmacêutica líquida da invenção. O kit pode conter uma unidade de administração de dose única ou unidades de administração de múltiplas doses de uma composição farmacêutica da invenção. O kit pode incluir também uma ou mais seringas pré-carregadas (por exemplo, seringas para líquido e seringas Lyo). Um kit pode compreender também instruções para o uso do mesmo. As instruções podem descrever o uso e a natureza dos

materiais fornecidos no kit, e podem ser adaptadas ao distúrbio metabólico preciso a ser tratado.

[0083] A invenção refere-se também ao uso das composições farmacêuticas aqui descritas para tratar ou evitar uma doença, condição ou distúrbio metabólico, como diabetes tipo 2, níveis elevados de glicose, níveis elevados de insulina, obesidade, dislipidemia, nefropatia diabética, lesão isquêmica do miocárdio, ataque cardíaco congestivo ou artrite reumatoide. De acordo com modalidades da invenção, um método para tratamento ou prevenção de uma doença, condição ou distúrbio metabólico em um indivíduo que esteja precisando do tratamento compreende administrar ao indivíduo uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de uma composição farmacêutica da invenção. Qualquer uma das composições farmacêuticas aqui descritas pode ser utilizada em um método da invenção, incluindo composições farmacêuticas que compreendem uma proteína de fusão da invenção ou composições farmacêuticas que compreendem um ácido nucleico que codifica a proteína de fusão.

[0084] São fornecidos aqui métodos para diminuição do peso corporal em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de cerca de 0,8 mg a cerca de 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[0085] De acordo com certas modalidades, o indivíduo está com sobrepeso. Em certas modalidades da invenção, o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais e, em certas modalidades, o indivíduo tem um IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[0086] De acordo com certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em:

cerca de 0,8 mg, cerca de 2,5 mg, cerca de 7,5 mg, cerca de 15 mg, cerca de 30 mg, cerca de 60 mg e cerca de 90 mg. Em certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,8 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 2,5 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 7,5 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 15 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 30 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 60 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 90 mg.

[0087] De acordo com certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma faixa de dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 1,08 mg/kg. Em certas dessas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,18 mg/kg, cerca de 0,36 mg/kg, cerca de 0,72 mg/kg e cerca de 1,08 mg/kg. Em certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,01 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,03 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,09 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,18 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,36 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,72 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 1,08 mg/kg.

[0088] De acordo com certas modalidades da presente invenção, a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[0089] De acordo com certas modalidades da presente invenção, a proteína de fusão é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[0090] São fornecidos aqui métodos para diminuição da ingestão de alimentos em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita composição é administrada em uma dose na faixa de cerca de 0,8 mg a cerca de 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[0091] De acordo com certas modalidades, o indivíduo está com sobrepeso. Em certas modalidades da invenção, o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais e, em certas modalidades, o indivíduo tem um IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[0092] De acordo com certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,8 mg, cerca de 2,5 mg, cerca de 7,5 mg, cerca de 15 mg, cerca de 30 mg, cerca de 60 mg e cerca de 90 mg. Em certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,8 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 2,5 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 7,5 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 15 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 30 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 60 mg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 90 mg.

[0093] De acordo com certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma faixa de dosagem de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 1,08 mg/kg. Em certas dessas modalidades, a proteína de fusão é

administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,18 mg/kg, cerca de 0,36 mg/kg, cerca de 0,72 mg/kg e cerca de 1,08 mg/kg. Em certas modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,01 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,03 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,09 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,18 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,36 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 0,72 mg/kg. Em outras modalidades, a proteína de fusão é administrada em uma dose de cerca de 1,08 mg/kg.

[0094] De acordo com certas modalidades da presente invenção, a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[0095] De acordo com certas modalidades da presente invenção, a proteína de fusão é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[0096] O termo "cerca de", quando usado em referência a faixas numéricas, limites, ou valores específicos é usado para indicar que os valores mencionados podem variar em até 10% do valor listado. Dessa forma, o termo "cerca de" é usado para abranger variações de $\pm 10\%$ ou menos, variações de $\pm 5\%$ ou menos, variações de $\pm 1\%$ ou menos, variações de $\pm 0,5\%$ ou menos, variações de $\pm 0,1\%$ ou menos, ou variações de $\pm 0,1\%$ ou menos em relação ao valor especificado.

[0097] Como usado aqui, o termo "indivíduo" significa qualquer animal, particularmente, um mamífero, mais particularmente, um ser humano, que será ou foi tratado por um método de acordo com uma modalidade da invenção. O termo "mamífero", como usado aqui, abrange qualquer mamífero. Exemplos de mamíferos incluem, mas não se limitam a, vacas, cavalos, ovelhas, porcos, gatos, cães, ca-

mundongos, ratos, coelhos, porquinhos da Índia, primatas não humanos (NHPs, de "non-human primates") como macacos ou símios, seres humanos, etc., mais particularmente, um ser humano.

[0098] Como usado aqui, "sobrepeso" refere-se a peso corporal excessivo. Vários parâmetros são usados para determinar se um indivíduo está com sobrepeso, em comparação com um indivíduo saudável de referência, incluindo idade, altura, sexo e estado de saúde do indivíduo. Por exemplo, um indivíduo pode ser considerado com sobrepeso ou obeso mediante avaliação do Índice de Massa Corporal (IMC) do indivíduo, que é calculado dividindo-se o peso de um indivíduo em quilogramas pelo quadrado da altura do indivíduo em metros. Um adulto que tenha um IMC na faixa de 18,5 a 24,9 kg/m² é considerado como tendo um peso normal; um adulto que tenha um IMC entre 25 e 29,9 kg/m² pode ser considerado com sobrepeso (pré-obeso); um adulto que tenha um IMC de 30 kg/m² ou maior pode ser considerado obeso. O apetite acentuado frequentemente contribui para o excesso de peso corporal.

[0099] Uma "doença, condição ou distúrbio metabólico" refere-se a qualquer distúrbio relacionado ao metabolismo anormal. Exemplos de doenças, condições ou distúrbios metabólicos que podem ser tratados de acordo com um método da invenção incluem, mas não se limitam a, diabetes tipo 2, níveis elevados de glicose, níveis elevados de insulina, obesidade, estar com sobrepeso, dislipidemia, nefropatia diabética, lesão isquêmica do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva ou artrite reumatoide.

[00100] Os termos "tratar", "tratando" e "tratamento", como usados aqui, referem-se à administração de uma composição a um indivíduo a fim de obter um resultado terapêutico ou clínico desejado no indivíduo. Em uma modalidade, os termos "tratar," "tratando" e "tratamento" referem-se à administração de uma composição farmacêutica da

invenção para reduzir, aliviar ou retardar a progressão ou o desenvolvimento de um distúrbio metabólico, por exemplo, diabetes tipo 2, níveis elevados de glicose, níveis elevados de insulina, obesidade, dislipidemia, nefropatia diabética, lesão isquêmica do miocárdio, ataque cardíaco congestivo ou artrite reumatoide.

[00101] De acordo com modalidades da invenção, uma composição farmacêutica da invenção pode ser administrada a um indivíduo por meio de qualquer método conhecido pelos versados na técnica tendo em vista a presente divulgação, por exemplo, por via de administração intramuscular, subcutânea, oral, intravenosa, cutânea, intramucosa (por exemplo, trato gastrointestinal), intranasal ou intraperitoneal. Em modalidades específicas, uma composição farmacêutica da invenção é administrada a um indivíduo por injeção intravenosa ou injeção subcutânea.

[00102] Como usado aqui, a administração "uma vez por semana" é executada dentro de um único dia. De preferência, a administração "uma vez por semana" é executada em uma única etapa, como uma única injeção.

[00103] Em certas modalidades, a presente invenção fornece uma dose clinicamente comprovada como segura e clinicamente comprovada como eficaz de uma proteína de fusão GDF15 tendo uma sequência que compreende a SEQ ID NO: 92 para uso em um método para diminuir o peso corporal em um indivíduo, sendo que a dita dose clinicamente comprovada como segura e clinicamente comprovada como eficaz é uma única injeção subcutânea (SC) administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg a um indivíduo pesando 80 kg ou mais.

[00104] Em certas modalidades, a presente invenção fornece uma dose clinicamente comprovada como segura e clinicamente comprovada como eficaz de uma proteína de fusão GDF15 tendo uma sequência que compreende a SEQ ID NO: 92 para uso em um método para diminuir a

ingestão de alimentos em um indivíduo, sendo que a dita dose clinicamente comprovada como segura e clinicamente comprovada como eficaz é uma única injeção subcutânea (SC) administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg a um indivíduo pesando 80 kg ou mais.

[00105] De acordo com a invenção conforme aqui definida, o termo "clinicamente comprovado como seguro", no que refere-se a uma dose ou um tratamento com a proteína de fusão GDF15 tendo uma sequência que compreende SEQ ID NO: 92, refere-se a uma razão risco:benefício favorável, com uma frequência relativamente baixa ou reduzida e/ou uma gravidade baixa ou reduzida de eventos adversos, inclusive sinais vitais adversos (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica, temperatura corporal), testes clínicos laboratoriais padrão adversos (hematologia, química clínica, urinálise, lipídios, coagulação), reações alérgicas/hipersensibilidade, reações adversas locais no sítio de injeção, ou ECG adverso.

[00106] De acordo com a invenção conforme aqui definida, os termos "clinicamente comprovado como eficaz" ou "com eficácia clinicamente comprovada", no que refere-se a termos como dose, regime de dosagem ou tratamento com a proteína de fusão GDF15, que tem uma sequência que compreende SEQ ID NO: 92, refere-se à redução na ingestão de alimentos, redução das classificações de apetite, redução da palatabilidade de alimentos avaliada mediante o uso de questionários, ou redução do peso corporal.

[00107] Para uso na presente invenção, uma diminuição no peso corporal é uma diminuição de ao menos 3%, ao menos 4%, ao menos 5%, ao menos 6%, ao menos 7%, ao menos 8%, ao menos 9%, ao menos 10%, ao menos 11%, ao menos 12%, ao menos 13%, ao menos 14%, ao menos 15%, ao menos 16%, ao menos 17%, ao menos 18%, ao menos 19%, ao menos 20%, ou qualquer número intermediário.

[00108] Como usado aqui, uma diminuição na ingestão de alimento é

uma diminuição de ao menos 5%, ao menos 6%, ao menos 7%, ao menos 8%, ao menos 9%, ao menos 10%, ao menos 11%, ao menos 12%, ao menos 13%, ao menos 14%, ao menos 15%, ao menos 16%, ao menos 17%, ao menos 18%, ao menos 19%, ao menos 20%, ao menos 21%, ao menos 22%, ao menos 23%, ao menos 24%, ao menos 25%, ao menos 26%, ao menos 27%, ao menos 28%, ao menos 29%, ao menos 30%, ou qualquer número intermediário. A ingestão de alimentos pode ser medida mediante a medição de calorias consumidas, estimadas com base nos gramas consumidos de cada item alimentício e em seu conteúdo nutricional.

[00109] Como usado aqui, exceto quando especificado em contrário, o termo "cl clinicamente comprovado" (usado independentemente ou para modificar os termos "seguro" e/ou "eficaz") deve significar que a prova foi comprovada por um estudo clínico sendo que o estudo clínico satisfaz aos padrões da Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA, "US Food and Drug Administration"), da Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos (EMA, "European Medicines Agency") ou um órgão fiscalizador nacional correspondente. Por exemplo, o estudo clínico pode ser um estudo adequadamente dimensionado, randomizado, duplo-cego usado para provar clinicamente os efeitos do fármaco. Em algumas modalidades, "cl clinicamente comprovado" indica que foi comprovado por um teste clínico que atendeu aos padrões da Agência de Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos EUA, da EMA ou de uma agência regulatória nacional correspondente para um teste clínico de Fase I.

Modalidades

[00110] 1. Método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, sendo o método caracterizado por compreender administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamen-

te aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[00111] 2. O método da modalidade 1, sendo que o indivíduo está com sobrepeso.

[00112] 3. O método da modalidade 2, sendo que o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais.

[00113] 4. O método da modalidade 3, sendo que o indivíduo tem o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[00114] 5. O método da modalidade 1, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

[00115] 6. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,8 mg.

[00116] 7. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 2,5 mg.

[00117] 8. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 7,5 mg.

[00118] 9. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 15 mg.

[00119] 10. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 30 mg.

[00120] 11. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 60 mg.

[00121] 12. O método da modalidade 5, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 90 mg.

[00122] 13. O método da modalidade 1, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00123] 14. Um método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compre-

ende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose em uma faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

[00124] 15. O método da modalidade 14, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

[00125] 16. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

[00126] 17. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

[00127] 18. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

[00128] 19. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

[00129] 20. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

[00130] 21. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

[00131] 22. O método da modalidade 15, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

[00132] 23. O método da modalidade 14, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00133] 24. O método da modalidade 14, sendo que a composição é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[00134] 25. O método da modalidade 1, sendo que a composição é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[00135] 1A. Método para diminuição da ingestão de alimentos em um indivíduo, sendo o método caracterizado por compreender admi-

nistrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[00136] 2A. O método da modalidade 1A, sendo que o indivíduo está com sobrepeso.

[00137] 3A. O método da modalidade 2A, sendo que o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais.

[00138] 4A. O método da modalidade 3A, sendo que o indivíduo tem o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[00139] 5A. O método da modalidade 1A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

[00140] 6A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,8 mg.

[00141] 7A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 2,5 mg.

[00142] 8A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 7,5 mg.

[00143] 9A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 15 mg.

[00144] 10A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 30 mg.

[00145] 11A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 60 mg.

[00146] 12A. O método da modalidade 5A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 90 mg.

[00147] 13A. O método da modalidade 1A, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00148] 14A. Um método para diminuição da ingestão de alimento em um indivíduo, compreendendo administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

[00149] 15A. O método da modalidade 14A, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

[00150] 16A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

[00151] 17A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

[00152] 18A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

[00153] 19A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

[00154] 20A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

[00155] 21A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

[00156] 22A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

[00157] 23A. O método da modalidade 15A, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00158] 24A. O método da modalidade 14A, sendo que a composição é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[00159] 25A. O método da modalidade 1A, sendo que a composição é administrada ao indivíduo uma vez por semana.

[00160] 1B. Um método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo, uma vez por semana, uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[00161] 2B. O método da modalidade 1B, sendo que o indivíduo está com sobrepeso.

[00162] 3B. O método da modalidade 2B, sendo que o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais.

[00163] 4B. O método da modalidade 3B, sendo que o indivíduo tem o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[00164] 5B. O método da modalidade 1B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

[00165] 6B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,8 mg.

[00166] 7B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 2,5 mg.

[00167] 8B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 7,5 mg.

[00168] 9B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 15 mg.

[00169] 10B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 30 mg.

[00170] 11B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 60 mg.

[00171] 12B. O método da modalidade 5B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 90 mg.

[00172] 13B. O método da modalidade 1B, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00173] 14B. Um método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo, uma vez por semana, uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, sendo que a dita composição é administrada em uma dose em uma faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

[00174] 15B. O método da modalidade 14B, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

[00175] 16B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

[00176] 17B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

[00177] 18B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

[00178] 19B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

[00179] 20B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

[00180] 21B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

[00181] 22B. O método da modalidade 15B, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

[00182] 23B. O método da modalidade 22B, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00183] 1C. Um método para diminuição da ingestão de alimentos em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo, uma vez

por semana, uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

[00184] 2C. O método da modalidade 1C, sendo que o indivíduo está com sobrepeso.

[00185] 3C. O método da modalidade 2C, sendo que o indivíduo tem um IMC de 25 kg/m² ou mais.

[00186] 4C. O método da modalidade 3C, sendo que o indivíduo tem o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

[00187] 5C. O método da modalidade 1C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

[00188] 6C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,8 mg.

[00189] 7C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 2,5 mg.

[00190] 8C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 7,5 mg.

[00191] 9C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 15 mg.

[00192] 10C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 30 mg.

[00193] 11C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 60 mg.

[00194] 12C. O método da modalidade 5C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 90 mg.

[00195] 13C. O método da modalidade 1C, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

[00196] 14C. Um método para diminuição da ingestão de alimento em um indivíduo, compreendendo administrar a um indivíduo, uma vez por semana, uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

[00197] 15C. O método da modalidade 14C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

[00198] 16C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

[00199] 17C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

[00200] 18C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

[00201] 19C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

[00202] 20C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

[00203] 21C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

[00204] 22C. O método da modalidade 15C, sendo que a proteína de fusão é administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

[00205] 23C. O método da modalidade 22C, sendo que a proteína de fusão é administrada por meio de injeção subcutânea.

Exemplos

[00206] Os exemplos a seguir da invenção são fornecidos para ilustrar adicionalmente a natureza da invenção. Acredita-se que o versado na técnica possa, com o uso da descrição anterior e dos

exemplos ilustrativos a seguir, fazer e utilizar a presente invenção e praticar os métodos reivindicados. Deve-se compreender que os exemplos a seguir não limitam a invenção e que o escopo da invenção é determinado pelas reivindicações em anexo.

Exemplo 1: Design de moléculas de fusão que compreendem GDF15 - efeito dos truncamentos de GDF15

[00207] Como outros membros da família TGF β , a GDF15 é sintetizada como uma pré-pró-proteína que forma um dímero no retículo endoplasmático e sofre clivagem de furina para produzir a GDF15 madura secretada (aminoácidos 197 a 308). O homodímero GDF15 maduro secretado tem cerca de 25k dáltons, e cada monômero tem o potencial para formar até 4 ligações dissulfeto intramoleculares com um único dissulfeto intermolecular ligando os componentes do homodímero.

[00208] A estrutura cristalina de GDF15 foi determinada na invenção e é representada nas Figuras 1A e 1B. A estrutura cristalina mostra que o C-terminal da GDF15 madura está enterrado na interface do dímero, enquanto o amino-terminal está exposto. Esse terminal exposto possibilita a ligação das proteínas de fusão, como as proteínas de extensão de meia-vida, ao amino-terminal de GDF15.

[00209] A estrutura cristalina mostra também o novo padrão de pareamento de dissulfeto dos resíduos de cisteína da GDF15. Embora o TGF β 1 tenha pareamento C1-C3 e C2-C7 (isto é, o pareamento entre seu primeiro e seu terceiro resíduos de cisteína bem como entre seu segundo e seu sétimo resíduos de cisteína), a GDF15 tem pareamento C1-C2 e C3-C7 (consulte as Figuras 1A e 1B). Esse pareamento de dissulfeto exclusivo resulta em uma laçada formada pelo pareamento C1-C2 que está situado no amino-terminal da proteína e na direção oposta ao nó de cisteína que contém outras ligações dissulfeto. A estrutura prediz que o amino-terminal da GDF15 pode não ser de importância crítica para a formação do dímero ou a flexão de proteína total, e que a GDF15 e as

moléculas de fusão amino-terminais da mesma podem ser toleráveis para deleções amino-terminais que eliminam os resíduos C1 e C2 no interior da laçada C1-C2, ou mesmo os resíduos C-terminais até C2.

Exemplo 2: Design de moléculas de fusão que compreendem GDF15 - efeito do conector

[00210] Diferentes conectores entre a molécula de HSA e a molécula de GDF15 foram avaliados. Tanto os conectores flexíveis, que contém a sequência (GGGGS)_n, quanto os conectores estruturados, que contém a sequência (AP)_n ou (EAAAK)_n, em que n é de 2 a 20, foram avaliados.

[00211] As proteínas de fusão que compreendem os diferentes conectores foram comparadas quanto a suas propriedades biofísicas, seu efeito sobre a eficácia da ingestão de alimento em camundongos magros, seus valores farmacocinéticos (PK, de "pharmacokinetic") em camundongos e sua estabilidade *ex vivo* no sangue humano. Os resultados das variantes de conector testadas são mostrados na Tabela 1. A molécula compreendendo a SEQ ID NO: 31, que continha o conector (EAAAK)₈, mostrou agregação por HPLC. As sete variantes de conector restantes na Tabela 1 não demonstraram agregação.

Tabela 1: Sumário da análise de variante de conector

SEQ ID NO*	Conector de	Agregação	Boa PK em camundongo (WT)	Estabilidade <i>ex vivo</i> no sangue humano
25	AS(GGGGS) ₂ GT	Não	Sim	Sim
5	GS(GGGGS) ₄	Não	Sim	Sim
26	AS(GGGGS) ₈ GT	Não	Sim	Sim
27	AS(AP) ₅ GT	Não	Sim	Sim
28	AS(AP) ₁₀ GT	Não	Sim	Sim
29	AS(AP) ₂₀ GT	Não	Sim	Sim
30	AS(EAAAK) ₄ GT	Não	Sim	Sim
31	AS(EAAAK) ₈ GT	SIM	Não testado	Não testado

*- a etiqueta 6xHis foi fixada no amino-terminal com o propósito de purificação

[00212] A estabilidade do conector também foi avaliada quanto a essas variantes por estudos *in vivo* em camundongos e estudos de estabilidade *ex vivo* em amostras de sangue total e plasma humano. Duas formas de detecção foram utilizadas para analisar os resultados a partir destes estudos. Um imunoensaio com pares de anticorpos com captura anti-GDF15 e detecção anti-HSA foi utilizado para avaliar quão intacto o conector estava mediante a medição da presença de ambas as moléculas em cada lado do conector. Uma imagem mais ampla da integridade da molécula como um todo foi analisada mediante análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS - "liquid chromatography-mass spectrometry") com o uso de diferentes sequências peptídicas substitutas, tanto de HSA quanto de GDF15. O imunoensaio demonstrou um perfil farmacocinético (PK) estável para todas as variantes de conector e nenhuma perda de concentração de amostra de plasma reforçada para qualquer uma das variantes de conector foi observada durante 48 horas. Os resultados da LC-MS foram consistentes com o imunoensaio, mostrando que os peptídeos substitutos de diferentes partes das moléculas de HSA e GDF15 estavam intactos. O perfil farmacocinético das variantes de conector analisadas por LC-MS com o uso de peptídeos substitutos mostrou uma tendência similar para diferentes variantes de conector, sendo que todas tinham níveis detectáveis no Dia 7. Todas as variantes na Tabela 1, exceto pela SEQ ID 31, apresentaram propriedades biofísicas e valores farmacocinéticos desejados.

[00213] As variantes de conector foram avaliadas quanto a sua atividade *in vivo* através da realização de estudos de ingestão de alimento em camundongos magros. A Tabela 2 mostra a influência das variantes de conector sobre a eficácia da proteína de fusão na diminuição da ingestão de alimento. Houve uma clara influência do conector sobre a eficácia. Em relação aos conectores (GGGGS)_n flexíveis, um aumento no comprimento do conector de 2 para 4 para 8 aumentou dramaticamente

a eficácia da proteína de fusão. Para os conectores mais rígidos (AP)_n, a tendência foi menos óbvia, sugerindo que o grau de liberdade da molécula de GDF15 dentro da proteína de fusão desempenha um papel de importância crítica em sua eficácia.

Tabela 2: Efeito do conector sobre a eficácia *in vivo* de proteínas de fusão HSA-GDF15 em camundongos magros

SEQ ID NO*	Conector ("Linker")	% de redução na ingestão de alimento (média)
25	AS(GGGGS) ₂ GT	28,8
5	GS(GGGGS) ₄	40,5
26	AS(GGGGS) ₈ GT	60,7
27	AS(AP) ₅ GT	48,2
28	AS(AP) ₁₀ GT	66,2
29	AS(AP) ₂₀ GT	55,1
30	AS(EAAAK) ₄ GT	51,9

*- a etiqueta 6xHis foi fixada no amino-terminal com o propósito de purificação

Exemplo 3: Design de moléculas de fusão que compreendem GDF15 - efeito das mutações na HSA

[00214] Foram projetadas proteínas recombinantes com a albumina sérica humana da proteína de extensão de meia-vida fundidas ao amino-terminal da GDF15 através de um conector. Esse design deve possibilitar que a interface de dimerização de GDF15 permaneça não perturbada e possibilite a formação das ligações de dissulfeto intercadeia nativas, resultando em um homodímero GDF15 com fusão de HSA estendida a partir de cada braço de GDF15. Com esta abordagem, apenas um único gene é necessário para gerar o homodímero HSA-GDF15.

[00215] A proteína albumina sérica humana nativa contém 35 resíduos de cisteína (Cys, C) que formam 17 ligações dissulfeto, com o resíduo Cys-34 sendo a única cisteína livre na molécula. Esse Cys-34 livre funcionou como um sequestrante de radicais livres, mediante a

captura de múltiplas espécies reativas de oxigênio (ROS, de "reactive oxygen species") e espécies reativas de nitrogênio (RNS, de "reactive nitrogen species"). Esse Cys livre foi, dessa forma, mutado para minimizar o risco de heterogeneidade devido à oxidação.

[00216] A cisteína livre na posição 34 da HSA foi mutada para serina ou alanina, e as moléculas de fusão de GDF15 com uma mutação HSA(C34S) ou HSA(C34A) foram analisadas. Ambas as moléculas foram purificadas com o uso de um método de purificação de três etapas: (i) cromatografia de troca iônica, (ii) cromatografia de interação hidrofóbica, e (iii) cromatografia de exclusão de tamanho. Quando foram primeiramente geradas, a análise por HPLC mostrou que ambas as moléculas eram puras e isentas de agregação (Tabela 3).

[00217] Entretanto, duas semanas após sua geração, a proteína de fusão contendo a mutação HSA(C34A) (que compreende a SEQ ID NO: 48) mostrou agregação por HPLC, enquanto a proteína de fusão contendo a mutação HSA(C34S) (SEQ ID NO: 40) permaneceu isenta de agregação após quatro semanas.

Tabela 3: A influência da HSA C34 mutante sobre a agregação da proteína de fusão

SEQ ID NO	Mutação da HSA	% de agregação quando purificada	% de agregação 2 semanas após a purificação
40	C34S	0	0
48	C34A	0	33,29

Exemplo 4: Propensão de clivagem por protease na GDF15

[00218] Foi observado pelos inventores que o resíduo de arginina na posição de aminoácido 198 do GDF15 (R198) é suscetível à degradação por protease dentro das moléculas de fusão HSA-GDF15. Tal degradação resulta em uma população heterogênea e é indesejável para as composições terapêuticas. A clivagem pode ser evitada por um coquetel de inibidores de protease. Os métodos de purificação foram investigados para a remoção da protease. A Tabela 4 lista os dois

tipos de colunas de afinidade por HSA que foram testadas para a purificação de proteínas de fusão HSA-GDF15, conforme medido por HPLC. No momento da purificação, as proteínas de fusão HSA-GDF15 purificadas por ambos os métodos estavam 100% puras e intactas. Em baixas concentrações (2 a 5 mg/ml), as proteínas purificadas por ambos os métodos permaneceram intactas durante todo o período de teste de 4 semanas. Entretanto, em altas concentrações (40 a 50 mg/ml), apenas a resina de HSA à base de anticorpos (CaptureSelect) produziu proteínas isentas de protease que permanecem intactas durante todo o período de teste de 4 semanas. A resina à base de ligante de HSA (Albupure) gerou proteínas que estavam inicialmente intactas, mas demonstraram degradação ao longo do tempo quando armazenadas em altas concentrações. A adição de um coquetel de inibidores de protease (PI, de "protease inhibitor") e EDTA interrompeu completamente a degradação do lote de proteínas de fusão HSA-GDF15 de alta concentração purificado com o uso da resina Albupure. Dessa forma, o método de purificação desempenha um papel de importância crítica na geração de uma composição terapêutica estável. A degradação correspondente não foi observada *in vivo* ou *ex vivo*, sugerindo que uma vez que a composição terapêutica passa a ser isenta de protease, a degradação das proteínas de fusão não é um problema *in vivo*. Portanto, os métodos de purificação que podem remover eficazmente proteases potenciais durante a produção, como aqueles que usam a resina CaptureSelect, são essenciais para a fabricação bem-sucedida de agentes terapêuticos com GDF15 que sejam homogêneos, intactos e estáveis.

Tabela 4: A clivagem por protease das proteínas de fusão HSA-GDF15 pode ser eliminada por métodos de purificação de amostra

Condição			% de população degradada de HSA-GDF15 (SEQ ID 60)				
Concen-tração	Resina	+ PI/EDTA	SEMA-NA 0	SEMA-NA 1	SEMA-NA 2	SEMA-NA 3	SEMA-NA 4
Baixa	Capture-Select	Não	0	0	0	0	0
Baixa	Albupure	Não	0	0	0	0	0
Alta	Capture-Select	Não	0	0	0	0	0
Alta	Albupure	Não	0	3,04	9,47	11,57	13,89
Alta	Capture-Select	Sim	0	0	0	0	0
Alta	Albupure	Sim	0	0	0	0	0

Exemplo 5: Variantes de deleção amino-terminal de GDF15

[00219] A estrutura cristalina de GDF15 mostrada nas Figuras 1A e 1B prediz que o amino-terminal de GDF15 envolvido nas variantes de deleção não é de importância crítica para a formação de dímeros e para a flexão da proteína total. Ela também prediz que tais deleções amino-terminais não devem afetar qualquer interação potencial do receptor. As proteínas de fusão HSA-GDF15 que compreendem várias deleções do amino-terminal de GDF15 foram testadas quanto à atividade *in vivo*.

[00220] As variantes de deleção amino-terminal de GDF15 que foram projetadas tiveram o sítio de clivagem de protease em GDF15 (I_{R198}) removido. Imediatamente após o resíduo R198, há um potencial sítio de desamidação nos resíduos N199 a G200, e a desamidação do substrato também não é favorecida em composições terapêuticas. As deleções amino-terminais de GDF15 podem remover o sítio de clivagem proteolítica e os sítios de desamidação simultaneamente. As variantes de deleção de GDF15 resultantes que foram incorporadas a proteínas de fusão com

HSA incluíam GDF15 (201 a 308, SEQ ID NO: 8), GDF15 (202 a 308, SEQ ID NO: 9) e GDF15 (211 a 308, SEQ ID NO: 11). Estudos *in vivo* em camundongos mostraram que as variantes de deleção amino-terminal de GDF15 ainda estão ativas na redução da ingestão de alimento (Figura 17). Os resultados experimentais confirmaram que essas variantes de deleção amino-terminal de GDF15 expressam adequadamente, formam dímeros adequados e são ativas *in vivo*.

Exemplo 6: Mutantes de GDF15 inativos

[00221] A Tabela 5 lista doze mutantes de GDF15 que foram feitos para eliminar a atividade de GDF15 *in vivo* e identificar o epítopo funcional de GDF15. Os mutantes incluem cinco mutantes simples, dois mutantes duplos e cinco mutantes triplos. As proteínas de fusão HSA-GDF15 que compreendem essas mutações foram caracterizadas por suas propriedades e atividades biofísicas (Tabela 5). Dos 12 mutantes, um não expressou e quatro formaram agregados ao longo do tempo, indicando que as mutações interrompem as propriedades biofísicas e de flexão da proteína. Dos sete mutantes restantes, quatro deles continham uma única mutação de GDF15, e esses mutantes foram testados em camundongos quanto à redução da ingestão de alimento em comparação com o tipo selvagem. Três dos mutantes simples (I89R, I89W e W32A) perderam a atividade *in vivo*, enquanto o mutante restante (Q60W) é tão ativo quanto o tipo selvagem. Esses resultados indicaram que a mutação I89R, I89W ou W32A interrompe a interação do receptor/correceptor com GDF15, sugerindo que os epítopos funcionais de GDF15 ficam ao redor dos resíduos I89 e W32. A numeração da mutação é baseada no GDF15 maduro presente na proteína de fusão, por exemplo "1" refere-se ao 1º aminoácido do GDF15 maduro (SEQ ID NO: 6) e "89" refere-se ao 89º aminoácido da proteína de GDF15 madura.

Tabela 5: Sumário das propriedades biofísicas e atividades das proteínas de fusão que compreendem os mutantes de GDF15

SEQ ID NO	Mutações no GDF15	Propriedades biofísicas	Atividades
5	tipo selvagem	Expressa bem, estável	Atividade do tipo selvagem
64	I89R	Expressa bem, estável	Perda completa de atividade
65	I89W	Expressa bem, estável	Perda completa de atividade
66	L34A, S35A, R37A	Expressa bem, estável	
67	V87A, I89A, L98A	Expressa bem, instável	
68	L34A, S35A, I89A	Expressa bem, estável	
69	V87A, I89A	Expressa bem, estável	
70	Q60W	Expressa bem, estável	Tão ativo quanto o tipo selvagem
71	W32A	Expressa bem, estável	Perda completa de atividade
72	W29A	Expressa bem, instável	
73	Q60A, S64A, R67A	Expressa bem, instável	
74	W29A, Q60A, I61A	Não expressa	
75	W29A, W32A	Expressa bem, instável	

*- a etiqueta 6xHis foi fixada no amino-terminal com o propósito de purificação

Exemplo 7: Métodos de expressão e purificação

Expressão

[00222] Para a expressão de 20 ml e acima disso, a expressão foi feita usando células HEK Expi293™ cultivadas em meio de expressão Expi293™. As células foram cultivadas a 37°C sob agitação a 125 rpm, com 8% de CO₂. As células foram transfectadas a 2,5 x 10⁶ células por ml com o uso do kit de expressão Expi293™. Para cada litro de células transfectadas, 1 mg do DNA total foi diluído em 25 ml de Opti-MEM, e 2,6 ml de reagente Expi293™ foram diluídos em 25 ml de Opti-MEM e incu-

bados durante 5 minutos à temperatura ambiente. O DNA diluído e o reagente Expi293 diluído foram combinados e incubados durante 20 minutos à temperatura ambiente. O complexo de DNA foi, então, adicionado às células. As células foram colocadas na incubadora sob agitação de um dia para o outro. No dia após a transfecção, 5 ml de intensificador 1 do kit foram diluídos em 50 ml de intensificador 2 do kit, e o volume total dos dois intensificadores foi adicionado às células. As células transfectadas foram colocadas de volta na incubadora por 4 dias até que elas foram colhidas. As células foram concentradas por centrifugação a 6.000 g durante 30 minutos e, então, filtradas com um filtro de 0,2 µm antes da etapa de purificação.

[00223] A expressão também foi feita em células CHO. O plasmídeo foi purificado e caracterizado. Antes da transfecção, 1 alíquota de 200 µg de DNA de plasmídeo contendo a região codificante de HSA-GDF15 foi linearizada por meio de digestão por enzima de restrição com Acl I. A digestão com essa endonuclease de restrição assegura a remoção do gene de resistência à ampicilina. Duas alíquotas de DNA linearizado de 15 µg foram transfectadas em duas alíquotas de 1×10^7 células CHO (designadas como grupamento de transfecção A e B) com o uso do Manipulador BTX ECM 830 Electro Cell (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EUA). As células foram eletroporadas 3 vezes a 250 volts com comprimentos de pulso de 15 milissegundos e intervalos de pulso de 5 segundos em um cadinho com vão de 4 mm. As células transfectadas foram transferidas para MACH-1 + L-glutamina em um frasco de agitação e incubadas durante 1 dia. O grupamento de transfecção A e o grupamento de transfecção B foram centrifugados, ressuspensos em MACH-1 + MSX e transferidos para frascos de agitação para incubação durante 6 dias. As células produtoras de proteína de fusão com HSA transfectadas do grupamento de transfecção A e do grupamento de transfecção B foram agrupadas e colocadas em placas de metilcelulose

no Dia 8 após a eletroporação.

Purificação

[00224] Foi utilizada purificação em duas etapas com o uso da resina CaptureSelect e cromatografia de exclusão de tamanho. Os sobrenadantes de célula das células Expi293™ transfectadas temporariamente foram carregados em uma coluna CaptureSelect com HSA pré-equilibrada (PBS, pH 7,2) (CaptureSelect Human Albumin Affinity Matrix, disponível junto à ThermoFisher Scientific) a uma capacidade aproximada de 10 mg de proteína por ml de resina. Após o carregamento, as proteínas não ligadas foram removidas pela lavagem da coluna com 10 volumes de coluna (CV, de "column volumes") de PBS com pH 7,2. A HSA-GDF15 que estava ligada à coluna foi eluída com 10 CV de 2 M de $MgCl_2$ em 20 mM de tris, pH 7,0. As frações de pico foram agrupadas, filtradas (0,2 μ) e dialisadas contra PBS com pH 7,2 a 4°C. Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,2 μ) novamente e concentrada até um volume adequado antes do carregamento em uma coluna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare). As frações de proteína que eluíram da coluna de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC, de "size exclusion chromatography") com alta pureza (determinada por SDS-PAGE) foram agrupadas. A concentração de proteína foi determinada pela absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro BioTek Synergy HTTM. A qualidade das proteínas purificadas foi avaliada por SDS-PAGE e HPLC de exclusão de tamanho analítico (SE-HPLC, sistema HPLC Dionex). Os níveis de endotoxina foram medidos com o uso de um ensaio LAL (Pyrotell®-T, Associates of Cape Cod).

[00225] A purificação em duas etapas usando a resina AlbuPure e SEC também foi utilizada. As proteínas de fusão HSA-GDF15 foram purificadas à temperatura ambiente com o uso de resina AlbuPure (ProMetic BioSciences Ltd.) que utiliza um ligante de triazina sintético imobilizado para ligar seletivamente a HSA. Os sobrenadantes de ex-

pressão foram aplicados à resina AlbuPure. A resina foi, então, lavada, primeiro com 4 CV PBS com pH 7,2 seguido de 4 CV de 50 mM de tampão tris com pH 8,0, 150 mM de NaCl. A HSA-GDF15 que foi ligada à coluna foi eluída com 4 CV de tampão PBS com pH 7,2 contendo octanoato de 100 mM de Na. As frações contendo proteína foram concentradas a um volume de 10 ml com o uso de um concentrador de rotação de peso molecular de corte de 30.000 kDa (Amicon) e, então, aplicadas a uma coluna Superdex S200pg 26/60 (GE) que foi equilibrada em tampão PBS com pH 7,2. As frações de SEC contendo o homodímero HSA-GDF15 foram identificadas através de SDS-PAGE e agrupadas para análise. As purezas proteicas foram avaliadas por SDSPAGE e SE-HPLC.

[00226] Os Exemplos 8 a 14 e 19 envolvem a caracterização de uma proteína de fusão exemplificadora da invenção, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 60. Essa proteína de fusão é uma proteína totalmente recombinante que existe como um homodímero de uma fusão de HSA com o GDF15 humano maduro através de um conector de 42 aminoácidos que consiste em resíduos de glicina e de serina, GS-(GGGGS)₈. O peso molecular predito dessa proteína de fusão é 162.696 daltons, e a única cisteína livre nativa na posição 34 da HSA foi mutada para serina. Essa proteína de fusão HSA-GDF15 específica será chamada simplesmente de "FP1" nos exemplos a seguir, por uma questão de simplicidade. Uma variante de FP1 com etiqueta 6xHis (6xHis-FP1, SEQ ID NO: 26), contendo um conector AS-(GGGGS)x8-GT, foi usada para comparação em alguns dos exemplos a seguir.

Exemplo 8: Efeitos de FP1 sobre a ingestão de alimento de camundongos C57B1/6

[00227] O propósito deste experimento foi demonstrar o efeito responsivo à dose da FP1 sobre a inibição da ingestão de alimento em camundongos C57B1/6.

[00228] Camundongos machos C57Bl/6 foram aclimatados por um mínimo de 72 horas em gaiolas BioDAQ. Os camundongos foram então agrupados com base na ingestão de alimento nas 24 horas anteriores em seis grupos de oito. Entre 16 h e 17 h, os animais foram pesados e receberam, por injeção subcutânea, uma dose de veículo ou de uma composição compreendendo FP1. A alteração no peso do alimento para cada gaiola foi registrada continuamente pelo sistema BioDAQ durante um período de 48 horas após as injeções. A 6xHis-FP1 foi usada para comparação neste estudo.

[00229] Os resultados (Figura 2 e Tabela 6) foram expressos como uma média de ingestão cumulativa de alimento em um dado intervalo de tempo. Os resultados indicaram que a administração subcutânea de FP1 a camundongos C57BL/6 inibiu significativamente a ingestão de alimento em relação aos animais tratados com veículo em todas as doses e pontos de tempo testados. A 6xHis-FP1 reduziu a ingestão de alimento na dose de 8 nmol/kg.

Tabela 6: Efeitos da administração subcutânea de FP1 sobre a ingestão de alimento em camundongos C57BL/6; é mostrada uma ingestão cumulativa de alimento em 12, 24 e 48 horas após a administração

Ingestão cumulativa de alimento (g)			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,1	8,4 ± 0,3
FP1, 1 nmol/kg	2,9 ± 0,1*	3,4 ± 0,2**	7,0 ± 0,3**
FP1, 4 nmol/kg	2,3 ± 0,2****	3,1 ± 0,1****	6,6 ± 0,3***
FP1, 8 nmol/kg	2,1 ± 0,2****	3,2 ± 0,1***	6,4 ± 0,2****
FP1, 16 nmol/kg	1,7 ± 0,2****	2,7 ± 0,2****	6,2 ± 0,3****
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	1,8 ± 0,2****	2,6 ± 0,2****	6,0 ± 0,2****

Os dados são expressos como Média ± EPM.

*p ≤ 0,05, versus STF; **p ≤ 0,01, versus STF; ***p ≤ 0,001, versus STF;

****p ≤ 0,0001, versus STF

Teste de comparações múltiplas ANOVA de um fator-Tukey; n=8/grupo

Exemplo 9: Efeitos de FP1 sobre a ingestão de alimento em ratos Sprague-Dawley

[00230] O propósito deste experimento foi demonstrar o efeito responsivo à dose de FP1 sobre a inibição da ingestão de alimento em ratos Sprague-Dawley.

[00231] Ratos machos Sprague-Dawley foram aclimatados por um mínimo de 72 horas em gaiolas BioDAQ. Os ratos foram, então, agrupados com base na ingestão de alimento nas 24 horas anteriores em seis grupos de oito. Entre 16 h e 17 h, os animais foram pesados e receberam, por injeção subcutânea, uma dose de veículo ou de uma composição compreendendo a proteína de fusão. A alteração no peso do alimento para cada gaiola foi registrada continuamente pelo sistema BioDAQ durante um período de 48 horas após as injeções. A 6xHis-FP1 foi usada para comparação neste estudo.

[00232] Os resultados são mostrados na Figura 3 e na Tabela 7. A administração subcutânea de FP1 inibiu a ingestão de alimento em doses de 2,5 nmol/kg e 10 nmol/kg em comparação com os animais tratados com veículo. A inibição atingiu um significado estatístico apenas com a dose mais elevada testada (10 nmol/kg) em 24 e 48 horas após a administração. A FP1 reduziu a ingestão de alimento na dose de 8 nmol/kg, e o efeito foi significativo em 24 e 48 horas.

Tabela 7: Efeitos da administração subcutânea de FP1 sobre a ingestão de alimento em ratos Sprague-Dawley; é mostrada uma ingestão cumulativa de alimento em 12, 24 e 48 horas após a administração

Ingestão cumulativa de alimento (g)			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	20,6 ± 1,3	25,3 ± 1,3	49,1 ± 2,1
FP1, 0,1 nmol/kg	23,3 ± 1,4	26,9 ± 0,8	52,8 ± 1,3
FP1, 0,5 nmol/kg	22,6 ± 1,7	25,1 ± 1,0	48,3 ± 1,8
FP1, 2,5 nmol/kg	20,0 ± 1,4	22,0 ± 1,0	44,6 ± 1,4
FP1, 10 nmol/kg	18,7 ± 0,9	19,9 ± 1,0*	39,9 ± 2,3*
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	17,0 ± 1,5	18,8 ± 1,4**	38,4 ± 2,5**

Os dados são expressos como Média $\pm$ EPM.

* $p \leq 0,05$, versus STF; ** $p \leq 0,01$, versus PBS

Teste de comparações múltiplas ANOVA de um fator-Tukey; $n=8$ /grupo

Exemplo 10: Efeitos de FP1 sobre a homeostase de glicose e o peso corporal em camundongos obesos induzidos por dieta (DIO)

[00233] O propósito deste experimento foi avaliar os efeitos de FP1 sobre a ingestão de alimento, o peso corporal e a homeostase de glicose ao longo de duas semanas de tratamento em camundongos C57Bl/6 DIO.

[00234] Os camundongos DIO machos foram pesados, e a FP1 foi administrada por via subcutânea a 2 ml/kg a cada três dias (q3d) nos Dias 0, 3, 6, 9 e 12. Os grupos de tratamento com veículo e com rosiglitazona foram dosados com PBS em um regime similar. A rosiglitazona de controle foi fornecida na dieta a 0,015% à vontade. Os pesos dos camundongos e do alimento foram registrados diariamente. A glicose foi medida com o uso de um glicosímetro (One Touch®Ultra®, Lifescan, Milpitas, CA, EUA). A gordura e a massa magra foram quantificadas em camundongos conscientes por RMN em domínio de tempo (RMN-TD) com o uso do Bruker Mini-Spec LF110. Para um teste de tolerância à glicose oral (OGTT, de "oral glucose tolerance test"), os camundongos foram deixados em jejum durante 4 horas. A glicose sanguínea foi medida através de corte na cauda em 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração por gavagem oral de 2 g/kg de glicose a 10 ml/kg. A insulina foi medida a 0, 30 e 90 minutos após a administração da glicose.

[00235] No final do estudo, os camundongos foram eutanasiados com inalação de CO₂, e uma amostra sanguínea terminal foi coletada. Soro foi colocado em uma placa de 96 cavidades em gelo molhado e, então, armazenadas a - 80 °C. O fígado foi removido, e o teor de gordura em relação à massa total das seções do fígado foi avaliado com o uso de RMN-TD com o Bruker MiniSpec mq60 de acordo

com as instruções do fabricante.

[00236] A avaliação do modelo homeostático em jejum de resistência à insulina (HOMA-IR, de "omeostatic model assessment of insulin resistance") foi calculada com base no produto da glicose em jejum (em mg/dL) e insulina (em mU/L) dividido por um fator de 405.

[00237] O tratamento de camundongos DIO com FP1 q3d a 1 nmol/kg e 10 nmol/kg reduziu o peso corporal (Tabela 8) e a ingestão de alimento (Tabela 9). As reduções tiveram um significado estatístico apenas em determinados pontos no tempo, conforme descrito abaixo.

[00238] A FP1 diminuiu o peso corporal em doses de 1 (do dia 2 a 14) e 10 nmol/kg (do dia 1 a 14) em camundongos DIO (Tabela 8 e Figura 4). Uma redução significativa na ingestão de alimento foi observada nos Dias 1 e 2 do estudo na dose de 1 nmol/kg e nos Dias 1, 8 e 9 na dose de 10 nmol/kg (Tabela 9).

Tabela 8: Alteração do peso corporal (% de início) durante o tratamento com FP1 em camundongos DIO

Tratamento	Veículo	FP1 (nmol/kg)			Rosiglitazona
Dia	n/a	0,1	1	10	10 mpk/dia
-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*

Tratamento	Veículo	FP1 (nmol/kg)			Rosiglitazona
Dia	n/a	0,1	1	10	10 mpk/dia
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*
Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.					
* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.					

Tabela 9: Ingestão diária de alimento (g) durante o tratamento com FP1 em camundongos DIO

Tratamento	Veículo	FP1 (nmol/kg)			Rosiglitazona
Dia	n/a	0,1	1	10	10 mpk/dia
-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*
Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.					
* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.					

[00239] Em um OGTT realizado no Dia 14 do estudo, a FP1 reduziu

significativamente os níveis de glicose em comparação com os animais tratados com veículo em todos os pontos no tempo após o tempo 0 em todas as três doses testadas (Tabela 10). Isto foi adicionalmente quantificado como área total sob a curva (ASC) e delta ASC, que foram significativamente mais baixas em comparação com o veículo para todas as três doses testadas (Tabela 10 e Figuras 5A e 5B).

Tabela 10: Níveis de glicose sanguínea (mg/dL) durante um OGTT após quatorze dias de dosagem de FP1 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Tempo após o desafio com glicose (min.)					ASC total (mg/dL/ 120 min.)	Delta ASC (mg/dL/ 120 min.)
		0	30	60	90	120		
Veículo	ND	209,6 ± 16,5	399,4 ± 46,4	338,5 ± 46,3	297,5 ± 38,0	269,3 ± 36,6	38.244,4 ± 4.308,2	13.089,4 ± 3.573,0
FP1	0,1	196,6 ± 7,6	319,0 ± 21,5*	241,6 ± 14,4*	196,0 ± 12,8*	184,0 ± 6,3*	28.408,1 ± 1.236,1*	4.885,5 ± 955,1*
	1	164,0 ± 7,2	251,4 ± 13,0*	227,6 ± 12,6*	191,9 ± 9,4*	180,6 ± 13,1*	25.295,6 ± 1.026,7*	5.615,6 ± 647,6*
	10	146,6 ± 5,9	195,6 ± 14,5*	197,1 ± 6,9*	172,1 ± 6,3*	174,9 ± 13,8*	21.768,8 ± 603,0*	4.211,4 ± 425,8*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	130,8 ± 6,0	199,1 ± 12,9*	204,4 ± 8,5*	184,1 ± 10,9*	169,1 ± 5,7*	22.115,6 ± 671,9*	6.425,6 ± 599,6
Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.								
* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.								

[00240] Os níveis de glicose sanguínea pós-prandial foram medidos no início (Dia 0), no Dia 7 e no Dia 13 do estudo (Tabela 11 e Figura 6). A FP1 reduziu os níveis de glicose sanguínea de modo estatisticamente significativo com as doses de 1 nmol/kg e 10 nmol/kg no Dia 13 do estudo.

Tabela 11: Glicose sanguínea pós-prandial durante o tratamento de camundongos DIO com FP1 q3d

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Tempo após o início do tratamento (dias)		
		0	7	13
Veículo	ND	177,6 ± 10,9	173,6 ± 10,6	225,3 ± 23,0
FP1	0,1	174,1 ± 8,5	171,8 ± 16,3	196,4 ± 8,1
	1	167,5 ± 7,8	135,1 ± 11,2	165,3 ± 10,3*
	10	165,3 ± 13,7	145,3 ± 4,9	153,8 ± 7,5*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	189,6 ± 17,3	122,6 ± 8,1*	154,8 ± 6,5*

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

[00241] Os níveis plasmáticos de insulina durante o OGTT foram significativamente mais altos para o grupo com FP1 do que para o grupo com veículo correspondente, em uma dose de 0,1 nmol/kg a 30 minutos, e mais baixos nas doses de 1 e 10 nmol/kg no mesmo ponto no tempo (Tabela 12). A flutuação dos níveis de insulina durante o OGTT, medido pela ASC total, foi mais alta no grupo tratado com veículo para a dose de 0,1 nmol/kg de FP1 (Tabela 12) e mais baixa na dose de 1 e 10 nmol/kg. Em ambos os casos, o significado estatístico foi alcançado apenas na dose mais baixa. No ponto no tempo de 90 minutos, os camundongos tratados com 1 e 10 nmol/kg de FP1 tiveram níveis de insulina mais baixos; entretanto, este efeito não atingiu um significado estatístico. O HOMA-IR, utilizado como uma medida da sensibilidade à insulina, foi medido no Dia 14 do estudo. Neste ponto no tempo, a FP1 reduziu o HOMA-IR ou melhorou a sensibilidade à insulina a uma dose de 10 nmol/kg (Tabela 13 e Figura 7).

Tabela 12: Níveis de insulina plasmática (pg/ml) durante um OGTT após quatorze dias de dosagem de FP1 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Tempo após o desafio com glicose (min.)			ASC Total (pg/ml/90 min.)
		0	30	90	
Veículo	ND	6.096,0 ± 774,3	14.660,0 ± 3.031,2	5.034,4 ± 405,1	902.151,9 ± 143.123,2
FP1	0,1	7.861,0 ± 779,5	33.825,8 ± 7.902,0*	6.494,4 ± 797,0	1.834.808,8 ± 381.276,1*
	1	4.808,1 ± 795,8	13.061,8 ± 2.226,3	3.443,5 ± 342,5	763.218,1 ± 119.766,8
	10	3.478,3 ± 634,6	7.147,0 ± 823,8	2.958,0 ± 414,0	462.528,8 ± 44.653,1
Rosiglitazona	10 mpk/dia	2.965,6 ± 524,2	2.203,1 ± 193,5*	1.180,0 ± 57,1	179.025,0 ± 9.970,7

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

Tabela 13: HOMA-IR em jejum em camundongos DIO após quatorze dias de tratamento com FP1 q3d

Tratamento	Dose (nmol/kg)	HOMA-IR
Veículo	ND	93,5 ± 15,3
FP1	0,1	112,4 ± 14,6
	1	56,7 ± 9,7
	10	37,7 ± 8,2*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	27,3 ± 4,7*

Os dados são expressos como Média ± EPM.

n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

[00242] A magnitude da perda de peso alcançada no Dia 13 não resultou em alterações mensuráveis na massa de gordura absoluta ou

na porcentagem de massa gorda em qualquer dose (Tabela 14). Na dose de 10 nmol/kg, houve uma diminuição significativa na massa magra absoluta. Esta diminuição não foi observada quando expressa como porcentagem de massa magra. Os pesos dos fígados foram medidos no Dia 15 durante a necropsia terminal do estudo (Tabela 15). A FP1 diminuiu o peso absoluto do fígado e o peso do fígado como uma porcentagem do peso corporal na dose de 10 nmol/kg. Foi observada uma diminuição na dose de 1 nmol/kg, mas isto não atingiu um significado estatístico para qualquer um dos parâmetros. A gordura hepática foi medida em uma biópsia por RMN (Tabela 16). A proteína de fusão FP1 diminuiu o teor de gordura hepática, expresso como uma porcentagem do peso da biópsia hepática, nas doses de 1 e 10 nmol/Kg. A redução foi significativa na dose mais alta.

Tabela 14: Composição corporal após treze dias de tratamento com FP1 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Massa gorda (g)	Massa magra (g)	Massa gorda (% do corpo)	Massa magra (% do corpo)
Veículo	ND	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
Rosiglitazona	10 mpk/dia	14,9 ± 0,6*	30,0 ± 0,5	27,2 ± 0,4*	55,0 ± 0,6*

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

Tabela 15: Peso hepático após quinze dias de tratamento com FP1 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Peso hepático (g)	Peso hepático (% do corpo)
Veículo	ND	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*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	2,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

Tabela 16: Teor de gordura hepática medido após quinze dias de tratamento com FP1 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Gordura (%)
Veículo	ND	27,3 ± 2,1
FP1	0,1	26,0 ± 1,4
	1	22,5 ± 1,4
	10	17,8 ± 1,6*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	25,9 ± 0,8

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

Exemplo 11: Efeitos de FP1 sobre os níveis de glicose sanguínea e o peso corporal em camundongos ob/ob

[00243] O propósito deste experimento foi avaliar os efeitos de FP1 sobre o peso corporal e os níveis de glicose sanguínea durante oito dias de tratamento em camundongos obesos, hiperglicêmicos, deficientes em leptina *ob/ob*.

[00244] Camundongos *ob/ob* machos foram pesados, e a FP1 foi administrada por via subcutânea a uma dose de 2 ml/kg a cada três dias (q3d) nos Dias 0, 3 e 6. Os pesos dos camundongos e do alimento foram registrados diariamente. A glicose foi medida diariamente com o uso de

um glicosímetro. No final do estudo, os camundongos foram eutanasiados e uma amostra sanguínea terminal foi coletada.

[00245] A FP1, na dose de 1 nmol/kg, diminuiu significativamente o peso corporal (expresso como uma porcentagem do peso corporal inicial) em camundongos *ob/ob* do Dia 2 até o Dia 8 em relação aos camundongos tratados com veículo. A FP1, na dose de 10 nmol/kg, diminuiu o peso corporal (expresso como uma porcentagem do peso corporal inicial) em camundongos *ob/ob* do Dia 1 até o Dia 8 em relação aos camundongos tratados com veículo (Tabela 17 e Figura 8)

Tabela 17: Alteração do peso corporal (% de início) durante o tratamento com FP1 q3d em camundongos *ob/ob*

Tratamento	Veículo	FP1	
Dia	n/a	1 nmol/kg	10 nmol/kg
-6	-2,5 ± 0,3	-2,8 ± 0,4	-3,6 ± 0,5
-5	-2,4 ± 0,3	-3,0 ± 0,5	-3,5 ± 0,5
-4	-1,9 ± 0,2	-2,5 ± 0,4	-2,8 ± 0,3
-1	-0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	-0,3 ± 0,2
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1	0,5 ± 0,2	-1,6 ± 0,2	-2,3 ± 0,5*
2	1,1 ± 0,2	-1,8 ± 0,4*	-2,0 ± 0,9*
3	1,3 ± 0,3	-2,5 ± 0,4*	-3,1 ± 1,1*
4	1,8 ± 0,3	-3,3 ± 0,5*	-4,2 ± 1,3*
5	1,8 ± 0,4	-3,5 ± 0,5*	-4,7 ± 1,5*
6	2,0 ± 0,5	-4,0 ± 0,7*	-5,7 ± 1,6*
7	2,8 ± 0,6	-4,8 ± 0,8*	-6,3 ± 1,7*
8	3,5 ± 0,8	-4,5 ± 1,0*	-6,1 ± 1,9*

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

* = p<0,05, comparado àquele do grupo tratado com veículo.

[00246] A FP1, na dose de 10 nmol/kg, diminuiu os valores de glicose sanguínea pós-prandial em camundongos *ob/ob* nos Dias 1 e 2 do estudo e do Dia 4 até o dia 8 em relação aos camundongos tratados com veículo. Uma redução da glicose sanguínea foi observada na

dose de 1 nmol/kg; entretanto, este efeito não atingiu significado estatístico (Tabela 18 e Figura 9).

Tabela 18: Glicose sanguínea pós-prandial durante o tratamento de camundongos *ob/ob* com FP1 q3d

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

Os dados são expressos como Média ± EPM. n=8 por grupo.

Exemplo 12: Farmacocinética de múltiplas espécies

Farmacocinética de camundongo

[00247] A FP1 foi administrada a camundongos fêmeas C57Bl/6 em uma dose de 2 mg/kg IV e SC em PBS, pH 7. Foram coletadas amostras sanguíneas, o soro foi processado e as concentrações de fármaco foram medidas até 7 dias após ambas as vias de administração. A concentração de FP1 foi determinada usando um método de imunoenensaio. O perfil de concentração sérica do fármaco ao longo do tempo é sumarizado nas Tabelas 19 e 20 e ilustrado na Figura 10.

Tabela 19: Concentração sérica (nM) de FP1 ao longo do tempo após uma única administração SC em camundongos C57Bl/6 fêmeas

Ponto no tempo	Dose SC de FP1						Desvio padrão
	Resultado do animal 56 (nM)	Resultado do animal 57 (nM)	Resultado do animal 58 (nM)	Resultado do animal 60 (nM)	Resultado do animal 63 (nM)	Resultado médio (nM)	
4 horas	32,299	50,735	42,766	32,407	23,018	36,245	10,698
24 horas	88,822	106,418	88,648	103,841	80,346	93,615	11,093
72 horas	33,563	38,473	32,473	33,625	32,769	34,181	2,451
96 horas	20,639	24,988	21,247	19,356	20,771	21,400	2,124
Dia 7	5,399	6,919	7,234	5,994	5,637	6,237	0,803

Tabela 20: Concentração sérica (nM) de FP1 ao longo do tempo após uma única administração IV em camundongos C57Bl/6 fêmeas

Ponto no tempo	Dose IV de FP1						Desvio padrão
	Resultado do animal 52 (nM)	Resultado do animal 53 (nM)	Resultado do animal 65 (nM)	Resultado do animal 66 (nM)	Resultado do animal 70 (nM)	Resultado médio (nM)	
1 hora	240,419	233,318	232,484	276,913	272,727	251,172	21,857
24 horas	86,823	95,774	80,201	93,153	88,853	88,961	6,027
72 horas	33,634	37,447	33,108	41,680	34,034	35,981	3,612
96 horas	22,666	20,588	19,458	33,718	20,361	23,358	5,909
Dia 7	7,401	5,606	4,896	8,556	4,205	6,133	1,803

[00248] A análise farmacocinética divulgou uma meia-vida terminal de 1,67 e 1,57 dias para FP1 em camundongos C57Bl/6 após a administração SC e IV, respectivamente (Tabela 21). A FP1 demonstrou uma biodisponibilidade média de ~71% após a administração SC.

Tabela 21: Média ($\pm$ DP) dos parâmetros farmacocinéticos de FP1 após a administração IV e SC de 2 mg/kg em camundongos C57Bl/6 fêmeas

Via		t _{1/2} (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vss (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (dia)	AUC _{0-último} (dia*ng/ml)	AUC _{0-inf} (dia*ng/ml)
SC	Média	1,67	49,48		14.994	1	38.315	40.734
	(DP)	(0,14)	(4,791)		(1.776)		(3.851)	(4.072)
IV	Média	1,57	35,00	69,03	40.231	0,04	55.263	57.531
	(DP)	(0,19)	(3,13)	(5,8)	(3.500)		(4.853)	(5.416)

Nota: *T_{máx.} (mediana)

Farmacocinética de rato

[00249] A FP1 foi administrada a ratos Sprague-Dawley fêmeas em uma dose de 2 mg/kg IV e SC em PBS, pH 7. Foram coletadas amostras sanguíneas, o soro foi processado e as concentrações de fármaco foram medidas até 7 dias após ambas as vias de administração. A concentração de FP1 foi determinada usando um método de imunoenensaio. O perfil de concentração sérica do fármaco ao longo do tempo é sumarizado nas Tabelas 22 e 23 e ilustrado na Figura 11.

Tabela 22: Concentração sérica (nM) de FP1 ao longo do tempo após uma única administração SC em ratos Sprague-Dawley fêmeas.

Ponto no tempo	FP1 - Grupo 3 (Dose SC)						Desvio padrão
	Resultado do animal 53 (nM)	Resultado do animal 55 (nM)	Resultado do animal 67 (nM)	Resultado do animal 68 (nM)	Resultado do animal 69 (nM)	Resultado médio (nM)	
4 horas	4,766	3,500	3,932	3,546	3,250	3,799	0,593
24 horas	45,118	53,192	39,196	39,823	40,804	43,627	5,826
72 horas	18,900	24,102	23,124	23,718	18,933	21,755	2,615
96 horas	12,193	14,333	14,185	14,669	11,256	13,327	1,511
Dia 7	2,805	2,821	2,447	3,438	2,358	2,774	0,426

Tabela 23: Concentração sérica (nM) de FP1 ao longo do tempo após uma única administração IV em ratos Sprague-Dawley fêmeas

Ponto no tempo	FP1 - Grupo 4 (Dose IV)						Desvio padrão
	Resultado do animal 51 (nM)	Resultado do animal 52 (nM)	Resultado do animal 57 (nM)	Resultado do animal 64 (nM)	Resultado do animal 66 (nM)	Resultado médio (nM)	
1 hora	43,620	382,676	403,255	443,080	510,105	356,547	181,560
24 horas	102,665	142,661	139,066	124,528	126,425	127,069	15,728
72 horas	46,720	60,105	67,090	59,257	70,423	60,719	9,127
96 horas	29,409	39,897	41,225	42,258	48,074	40,173	6,779
Dia 7	6,976	11,251	8,913	9,540	13,006	9,937	2,298

*Resultados confirmados por análises repetidas

[00250] A análise farmacocinética divulgou uma meia-vida terminal

de 1,34 e 1,51 dias para FP1 em ratos Sprague-Dawley após a administração SC e IV, respectivamente (Tabela 24). A FP1 demonstrou uma biodisponibilidade média de ~23% após a administração SC.

Tabela 24: Média ($\pm$ DP) dos parâmetros farmacocinéticos de FP1 após a administração IV e SC de 2 mg/kg em ratos Sprague-Dawley

Via		$t_{1/2}$ (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vss (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (dia)	AUC _{0-último} (dia*ng/ml)	AUC _{0-inf} (dia*ng/ml)
SC	Média	1,34	100,09		6.987	1	19.250	20.112
	(DP)	(0,04)	(3,97)		(417)		(794)	(820)
IV	Média	1,51	24,75	53,41	59.000	0,04	83.028	86.525
	(DP)	(0,12)	(8,53)	(17,15)	(25.031)		(20.126)	(20.881)

Nota: *T_{máx}. (mediana)

Farmacocinética de macaco

[00251] A FP1 foi administrada a macacos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) machos sem tratamento prévio (naïve), em uma dose de 1 mg/kg, IV e SC, em PBS, com pH 7. Foram coletadas amostras sanguíneas, o soro foi processado e as concentrações de fármaco foram medidas até 21 dias após ambas as vias de administração, usando bioanálise por imunoensaio. O perfil de concentração sérica do fármaco ao longo do tempo é sumarizado nas Tabelas 25 e 26 e ilustrado na Figura 12.

Tabela 25: Concentração sérica (nM) de FP1 ao longo do tempo após uma única administração SC em macacos cynomolgus, determinada por imunoensaio

	FP1 (Dose SC)				
Ponto no tempo	Animal 110 (nM)	Animal 111 (nM)	Animal 112 (nM)	Resultado médio (nM)	Desvio padrão
Pré-dose	< LQI	< LQI	< LQI	< LQI	N/A
6 horas	49,304	43,784	72,110	55,066	15,017
24 horas	93,368	71,958	96,863	87,396	13,483
48 horas	107,689	97,509	115,144	106,781	8,853
72 horas	113,601	104,190	104,449	107,414	5,360

	FP1 (Dose SC)				
Ponto no tempo	Animal 110 (nM)	Animal 111 (nM)	Animal 112 (nM)	Resultado médio (nM)	Desvio padrão
Pré-dose	< LQI	< LQI	< LQI	< LQI	N/A
120 horas	101,490	95,049	91,717	96,085	4,968
168 horas	82,167	75,435	81,569	79,724	3,726
240 horas	71,033	56,732	59,266	62,344	7,631
336 horas	44,380	42,758	42,571	43,236	0,995
432 horas	30,911	29,445	32,839	31,065	1,702
528 horas	21,277	20,404	26,427	22,703	3,255

Tabela 26: Concentração sérica (nm) de FP1 ao longo do tempo após uma administração IV única em macacos cynomolgus, determinada por imunoensaio

	Dose FP1				
Ponto no tempo	Animal 104 (nM)	Animal 105 (nM)	Animal 106 (nM)	Resultado médio (nM)	Desvio padrão
Pré-dose	< LQI	< LQI	< LQI	< LQI	N/A
1 hora	212,661	235,168	189,000	212,276	23,087
6 horas	190,315	185,331	183,575	186,407	3,497
24 horas	141,743	155,943	146,487	148,058	7,229
48 horas	111,765	126,105	120,744	119,538	7,246
72 horas	105,076	106,955	106,441	106,157	0,971
120 horas	92,591	103,882	103,757	100,077	6,483
168 horas	71,368	93,055	87,706	84,043	11,298
240 horas	71,554	65,093	65,685	67,444	3,572
336 horas	46,184	38,961	41,696	42,280	3,647
432 horas	34,589	31,266	19,492	28,449	7,933
528 horas	26,885	24,154	22,422	24,487	2,250

[00252] A análise farmacocinética divulgou uma meia-vida terminal de 8,5 e 9,2 dias para FP1 em macacos cynomolgus após a administração SC e IV, respectivamente, com a biodisponibilidade média de

~88% após a administração por via SC (Tabela 27).

Tabela 27: Média ($\pm$ DP) dos parâmetros farmacocinéticos de FP1 após a administração IV e SC de 1 mg/kg em macacos cynomolgus.

Via		t _{1/2} (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vss (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (dia)	AUC _{0-último} (dia*ng/ml)	AUC _{0-inf} (dia*ng/ml)
SC	Média	8,5	3,9		17.776	3	211.030	256.202
	(DP)	(1,5)	(0,3)		(950)		(11.332)	(20.192)
IV	Média	9,2	3,4	45,6	34.001	0,04	239.758	292.206
	(DP)	(0,5)	(0,1)	(1,6)	(3.698)		(6.095)	(11.516)

Nota: *T_{máx}. (mediana)

[00253] A análise por LCMS de captura por imunoafinidade foi utilizada para quantificar a concentração de dímero intacto presente no soro de macacos cynomolgus após a administração IV e SC (Tabelas 28 e 29 e Figuras 13 e 14). As concentrações determinadas por este método foram similares às concentrações determinadas pelo imunoensaio (IA, de "immunoassay"), demonstrando que a FP1 circula como um dímero intacto, sem risco metabólico detectável em macacos cynomolgus.

Tabela 28: Concentração sérica (ng/ml) da FP1 como um dímero intacto ao longo do tempo após uma única administração IV em macacos cynomolgus, determinada pela análise por LCMS de captura por imunoafinidade

Dia	Dados de MS de dímero intacto (amostras agrupadas)	Dados IA (média)
0,00	0	0
0,04	33.347	34.537
0,25	29.686	30.328
1,00	28.787	24.089
2,00	17.249	19.449
3,00	16.827	17.272
5,00	16.159	16.282
7,00	11.124	13.674

Dia	Dados de MS de dímero intacto (amostras agrupadas)	Dados IA (média)
10,00	8.746	10.973
14,00	5.328	6.879
18,00	3.857	4.629
22,00	2.252	3.984

Tabela 29: Concentração sérica (ng/ml) da FP1 como um dímero intacto ao longo do tempo após uma única administração SC em macacos cynomolgus, determinada pela análise por LCMS de captura por imunoafinidade.

Dia	Dados de MS de dímero intacto (amostras agrupadas)	Dados IA (média)
0,00	0	0
0,25	9.625	8.959
1,00	15.799	14.219
2,00	17.671	17.373
3,00	19.130	17.476
5,00	12.284	15.633
7,00	10.808	12.971
10,00	8.910	10.143
14,00	5.814	7.034
18,00	4.074	5.054
22,00	2.967	3.694

[00254] A concentração de analitos no soro de macacos cynomolgus após a administração IV e SC também foi medida mediante análise por LC-MS/MS ("Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry" - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial) com captura por imunoafinidade e digestão por tripsina (Tabelas 30 e 31). Peptídeos trípticos selecionados, isto é, ALV (ALVLIA-FAQYLQQSPFEDHVK), ASL (ASLEDLGWADWVLSPR) e TDT (TDTGVSLQTYDDLLAK), que estão situados dentro da FP1 próximo ao

amino-terminal da região de HSA, no amino-terminal da GDF15 e no C-terminal d GDF15, respectivamente. Os peptídeos foram monitorados como peptídeos substitutos de FP1. As concentrações de todos os peptídeos substitutos eram similares entre si e às concentrações medidas por imunoensaio, demonstrando que a sequência de GDF15 na FP1 permanece intacta e ligada à sequência de HSA completa *in vivo*.

Tabela 30: Concentração sérica (ng/ml) de peptídeos substitutos representando várias regiões da FP1 ao longo do tempo, após uma única administração IV em macacos cynomolgus, conforme determinado por análise de LC-MS/MS com captura por imunoafinidade e digestão por tripsina

Ponto no tempo		Média de FP1 (ng/ml)			Desvio padrão			Dados IA (ng/ml)
Dia	hora	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	< LQI	< LQI	< LQI	N/A	N/A	N/A	0,0
0,04	1	32.400,0	39.766,7	33.333,3	2.623,0	3.162,8	2.722,7	34.536,9
0,25	6	29.100,0	27.166,7	30.600,0	3.439,5	1.006,6	2.095,2	30.328,1
1,00	24	24.366,7	23.300,0	23.800,0	4.215,8	3.996,2	4.100,0	24.088,7
2,00	48	19.433,3	17.733,3	18.700,0	1.457,2	1.193,0	854,4	19.448,6
3,00	72	18.100,0	17.200,0	17.166,7	360,6	871,8	1.001,7	17.271,6
5,00	120	15.966,7	14.033,3	14.233,3	1.001,7	642,9	1.011,6	16.282,3
7,00	168	13.733,3	11.800,0	12.100,0	1.115,0	600,0	300,0	13.673,6
10,00	240	9.303,3	8.570,0	8.570,0	2.290,1	1.682,2	1.685,9	10.973,0
14,00	336	5.860,0	5.890,0	6.056,7	415,8	312,2	388,0	6.878,9
18,00	432	4.143,3	4.400,0	4.226,7	374,3	52,9	571,2	4.628,6
22,00	528	2.830,0	3.256,7	2.753,3	355,4	420,0	319,0	3.984,0

Tabela 31: Concentração sérica (ng/ml) de peptídeos substitutos representando várias regiões de FP1 ao longo do tempo, após uma única administração SC em macacos cynomolgus, conforme determinado por análise de LC-MS/MS com captura por imunoafinidade e digestão por tripsina

Ponto no tempo		Média de FP1 (ng/ml)			Desvio padrão			Dados IA (ng/ml)
Dia	hora	ALV	TDT	ASL	ALV	TDT	ASL	
0,00	0	< LQI	< LQI	< LQI	N/A	N/A	N/A	0,0
0,25	6	9.323,3	7.430,0	8.123,3	1.900,3	2.471,6	1.954,1	8.959,1
1,00	24	15.233,3	13.390,0	14.533,3	2.926,3	3.222,0	2.683,9	14.219,2
2,00	48	15.366,7	14.000,0	14.166,7	2.579,4	1.646,2	2.311,6	17.373,0
3,00	72	17.300,0	16.033,3	15.333,3	1.571,6	1.001,7	986,6	17.476,0
5,00	120	15.333,3	13.366,7	13.666,7	1.222,0	1.692,1	1.501,1	15.632,9
7,00	168	13.333,3	11.633,3	11.700,0	709,5	472,6	781,0	12.970,9
10,00	240	8.496,7	7.376,7	8.343,3	1.475,5	189,0	1.039,1	10.143,2
14,00	336	6.046,7	6.116,7	6.253,3	90,2	118,5	110,6	7.034,5
18,00	432	4.593,3	5.250,0	4.636,7	802,6	1.157,5	621,7	5.054,2
22,00	528	3.056,7	3.490,0	3.116,7	424,5	687,7	220,5	3.693,7

Teste de estabilidade em plasma humano

[00255] O propósito deste estudo foi para analisar a estabilidade *ex vivo* de FP1 no plasma humano. O plasma humano fresco e não congelado foi gerado a partir de sangue heparinizado de dois indivíduos (um macho e uma fêmea) por centrifugação. A FP1 foi incubada nessa matriz a 37 °C sob misturação delicada durante 0, 4, 24 e 48 horas. A concentração de FP1 foi determinada usando um método de imunoenensaio. A porcentagem média de diferença da concentração inicial (0 hora) se situava na faixa de -4,1 a -12,9 e não aumentou ao longo do tempo, demonstrando que a FP1 é estável no plasma humano por até 48 horas *ex vivo* (Tabela 32 e Figura 15).

Tabela 32: Concentração de FP1 (µg/ml) após 0, 4, 24 e 48 horas (h) de incubação *ex vivo* em plasma obtido a partir de dois indivíduos humanos (Sub), determinada por imunoenensaio

Amostra <i>ex vivo</i>	Conc. Sub 1 masculino (ug/mL)	Dif. de % em T0	Conc. Sub 2 feminino (ug/mL)	Dif. de % em T0	Concentração média (ug/mL)	Dif. de % em T0
Plasma - T0h_ FP1	11,503	N/A	12,649	N/A	12,076	N/A
Plasma - T4h_ FP1	10,524	-8,5	10,521	-16,8	10,523	-12,9
Plasma - T24h_ FP1	9,934	-13,6	12,402	-2,0	11,168	-7,5
Plasma - T48h_ FP1	10,582	-8,0	12,575	-0,6	11,578	-4,1

[00256] A LCMS de captura por imunoafinidade foi utilizada para

quantificar a concentração de dímero intacto presente após a incubação no plasma humano. As concentrações determinadas por este método foram estáveis ao longo do tempo (0, 4, 24 e 48 horas), demonstrando que a FP1 permanece um dímero intacto no plasma humano *ex vivo* até 48 horas (Tabela 33 e Figura 16).

Tabela 33: Concentração média de FP1 ($\mu\text{g/ml}$) e % de diferença de concentração inicial como um dímero intacto depois de 0, 4, 24, 48 horas (h) de incubação *ex vivo* de em plasma obtido a partir de dois indivíduos humanos, determinada por análise por LCMS de captura por imunoafinidade

	Concentração de dímero ($\mu\text{g/mL}$)	% de diferença
0 hora	15,8	100,0
4 horas	15,8	100,1
24 horas	15,9	100,9
48 horas	15,2	96,0

[00257] Os Exemplos 15 a 19 envolvem a caracterização de uma outra proteína de fusão exemplificadora da invenção, descrita no Exemplo 5, a qual tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 92 (codificada pelas sequências de nucleotídeos SEQ ID NO: 95 (otimização de códon 1) e SEQ ID NO: 110 (otimização de códon 2)). Essa proteína de fusão é uma proteína totalmente recombinante que existe sob a forma de um homodímero de uma fusão de HSA (C34S) com a variante de deleção do GDF15 humano maduro (201-308; SEQ ID NO: 8) através de um conector de 42 aminoácidos que consiste em resíduos de glicina e de serina, GS-(GGGS)₈. A única cisteína livre nativa na posição 34 da HSA foi mutada para serina. Essa proteína de fusão HSA-GDF15 específica será chamada de "FP2" nos exemplos a seguir, por uma questão de simplicidade.

SEQ ID NOs: 92:

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVT
EFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAK

QEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL
 YEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL
 DEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEV
 SKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKEC
 CEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDV
 FLGMFLYEYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
 VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCSELFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVS
 TPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE
 KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD
 ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC
 KADDKETCFAEEGKKLVAAASQAALGLGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSG
 GGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSDHCPLGPGRCCRLHTVRAS
 LEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLK
 PDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Exemplo 13: A potência agonista *in vitro* de FP2

[00258] A potência agonista de FP2 *in vitro* foi avaliada com o uso de um ensaio pAKT baseado em células, com células SK-N-AS superexpressando de maneira estável o receptor de GDF15 humano (GFRAL). A atividade de GFRAL foi determinada mediante a medição do nível de fosfo-AKT (Ser473) em células SK-N-AS de neuroblastoma humano (ATCC) transfectadas de maneira estável para superexpressar GFRAL humano. A fosforilação de AKT após o tratamento das células expressoras de GFRAL com várias concentrações do artigo de teste foi medida com o uso do kit de ensaio para fosfo-AKT (Ser473) (Cisbio, Bedford, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os dados resultantes foram usados para calcular os valores EC₅₀ do composto, usando o software estatístico Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A FP2 ativou o pAKT com uma concentração eficaz máxima (EC₅₀) de 2,908 ± 0,239 nM (N=3). O GDF15 nativo serviu como um controle de ensaio e demonstrou

atividade agonista com um EC_{50} de $0,153 \pm 0,008$ nM (N=3).

Exemplo 14: Efeitos de FP2 sobre a ingestão de alimentos em camundongos C57Bl/6

[00259] A FP2 foi avaliada quanto a sua capacidade de reduzir a ingestão de alimento em camundongos C57Bl/6 machos após uma dose única. Camundongos C57Bl/6N machos (10 a 12 semanas de idade) obtidos junto à Taconic Biosciences (Hudson, NY, EUA) foram utilizados no estudo. Os camundongos foram alojados individualmente em uma sala com temperatura controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas (6 h/18 h) com acesso à vontade à água e comida. Os camundongos C57Bl/6 machos foram aclimatados por um mínimo de 72 horas nas gaiolas BioDAQ; os camundongos foram, então, agrupados com base na ingestão de alimento nas últimas 24 horas em seis grupos de oito. Entre 16 h e 17 h, os animais foram pesados e receberam doses de veículo ou de compostos, por meio de injeção subcutânea. A alteração no peso do alimento para cada gaiola foi registrada continuamente pelo sistema BioDAQ durante um período de 48 horas após a administração do composto. A 6xHis-FP1 foi usada como um comparador neste estudo.

[00260] A FP2 apresentou efeitos significativos sobre a redução da ingestão de alimento em 12, 24 e 48 horas após a administração em todos os níveis de dose testados (Tabela 34). Houve uma redução no percentual de alteração na ingestão de alimento em relação à PBS em todos os pontos no tempo e em todos os níveis de dose (Tabela 35) nos camundongos.

Tabela 34: Efeito de uma dose única de FP2 sobre a ingestão de alimento ao longo de 48 horas em camundongos C57Bl/6

Ingestão cumulativa de alimento (g)			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	3,7±0,2	4,4±0,2	8,8±0,4
FP2, 1 nmol/kg	2,8±0,4*	3,0±0,4**	6,9±0,7*
FP2, 4 nmol/kg	2,4±0,2***	3,1±0,2**	7,0±0,3*

FP2, 8 nmol/kg	1,9±0,2****	2,4±0,1****	6,2±0,2***
FP2, 16 nmol/kg	1,8±0,1****	2,7±0,1***	6,3±0,4**
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	2,3±0,3***	2,8±0,4**	6,6±0,7**

Os dados são expressos como Média ± EPM.

*p ≤ 0,05, versus PBS

**p ≤ 0,01, versus PBS

***p ≤ 0,001, versus PBS

****p ≤ 0,0001, versus PBS, respectivamente

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA e Dunnett.

n=8/grupo, exceto para 6xHis-FP1 8 nmol/Kg (n=6).

Tabela 35: Efeito de uma dose única de FP2 sobre a porcentagem de redução na ingestão de alimento (em relação ao veículo) ao longo de 48 horas em camundongos C57Bl/6

Porcentagem de inibição em relação ao PBS			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	0,0±7,9	0,0±7,7	0,0±5,9
FP2, 1 nmol/kg	22,4±12,5*	31,8±10,5**	21,8±8,1*
FP2, 4 nmol/kg	36,6±7,2***	30,4±5,8**	20,2±4,7*
FP2, 8 nmol/kg	47,0±6,2****	45,7±3,8****	29,7±3,9***
FP2, 16 nmol/kg	49,2±4,1****	38,1±4,1***	27,8±5,1**
6xHis-FP1, 8 nmol/kg	36,9±9,9***	36,5±8,8**	24,6±8,2**

O efeito anoréxico da FP2 é expresso como a redução relativa na ingestão de alimento em comparação com os respectivos controles de PBS.

Os dados são expressos como Média ± EPM.

*p ≤ 0,05, versus PBS

**p ≤ 0,01, versus PBS

***p ≤ 0,001, versus PBS

****p ≤ 0,0001, versus PBS, respectivamente

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA e Dunnett.

n=8/grupo, exceto para 6xHis-FP1 8 nmol/Kg (n=6).

Exemplo 15: Efeitos de FP2 sobre a ingestão de alimento em ratos Sprague-Dawley

[00261] A FP2 foi avaliada quanto a sua capacidade de reduzir a in-

gestão de alimento e o ganho de peso corporal em ratos Sprague-Dawley machos após uma dose única. Os animais foram obtidos junto à Charles River Labs (Wilmington, MA, EUA) com 200 a 225 g de peso corporal e utilizados dentro de uma semana após a entrega. Eles foram alojados um por gaiola em forragem Alpha-dri e um tubo de plástico para enriquecimento em uma sala com temperatura controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas. Eles tiveram acesso à vontade à água, e foram alimentados com uma ração normal para roedores de laboratório, a dieta para roedores irradiada certificada PicoLab® 20, 5K75* (fornecida pela Purina Mills, St. Louis, MO, EUA, através da ASAP Quakertown, PA, EUA). Os pesos dos animais foram medidos e registrados para cada rato antes da dosagem.

[00262] Os animais foram aclimatados por um mínimo de 72 horas nas gaiolas BioDAQ; os ratos foram, então, agrupados com base na ingestão de alimento nas últimas 24 horas em seis grupos de oito. Entre 16 h e 17 h, os animais foram pesados e receberam doses de veículo ou de compostos, por meio de injeção subcutânea. A alteração no peso do alimento para cada gaiola foi registrada continuamente pelo sistema BioDAQ durante um período de 48 horas após a administração do composto. Usou-se 6XHis-FP1 como um comparador neste estudo.

[00263] As reduções dose-dependentes de ingestão de alimento foram testadas após uma dose única de FP2. Não foram observadas diferenças significativas na ingestão de alimento na dose de 0,3 nmol/kg. Efeitos significativos na redução da ingestão de alimento após 12 horas, mas não após 24 ou 48 horas, com a dose de 1 nmol/Kg foram observados. Reduções significativas na ingestão de alimento foram observadas em todos os pontos no tempo para os níveis de dose de 3 e 10 nmol/kg (Tabela 36, Figura 19). Houve uma redução na porcentagem de alteração na ingestão de alimento em relação ao PBS em todos os pontos no tempo e em todos os níveis de do-

se (Tabela 37).

Tabela 36: Efeito de uma dose única de FP2 sobre a ingestão de alimento ao longo de 48 horas em ratos Sprague-Dawley.

Ingestão cumulativa de alimento (g)			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	21,7±0,6	25,0±0,8	53,1±1,6
FP2, 0,3 nmol/Kg	19,5±0,9	22,9±0,7	48,4±1,5
FP2, 1 nmol/Kg	17,5±0,9*	19,8±0,8	47,0±2,6
FP2, 3 nmol/Kg	16,1±1,2**	17,0±1,0**	39,2±3,2**
FP2, 10 nmol/Kg	15,8±0,9***	16,5±0,9**	36,5±3,2**
6xHis-FP1 8 nmol/kg	15,0±1,4***	15,7±1,2**	37,2±4,5**

Os dados são expressos como Média ± EPM.

*p ≤ 0,05, versus PBS

**p ≤ 0,01, versus PBS

*** p ≤ 0,001, versus PBS, respectivamente

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA e Dunnett.

n=8/grupo

Tabela 37: Efeito de uma dose única de FP2 sobre a porcentagem de redução na ingestão de alimento (em relação ao veículo) ao longo de 48 horas em ratos Sprague-Dawley.

Porcentagem de inibição em relação ao PBS			
Tratamento	12 horas	24 horas	48 horas
STF	0,0±4,0	0,0±4,6	0,0±4,3
FP2 0,3 nmol/kg	10,0±4,7	8,5±4,1	8,8±3,9
FP2 1 nmol/kg	19,3±4,7*	20,8±4,1	11,5±5,5
FP2, 3 nmol/kg	25,9±6,1**	32,0±4,7**	26,2±6,5**
FP2, 10 nmol/kg	27,4±4,8***	33,8±4,1**	31,2±6,4**
6xHis-FP1 8 nmol/kg	30,8±6,6***	37,0±5,4**	29,9±8,8**

O efeito anoréxico da FP2 é expresso como a redução relativa na ingestão de alimento em comparação com os respectivos controles de PBS.

Os dados são expressos como Média ± EPM.

*p ≤ 0,05, versus PBS

**p ≤ 0,01, versus PBS

*** $p \leq 0,001$, versus PBS, respectivamente

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA e Dunnett.

n=8/grupo

Exemplo 16: Efeitos de FP2 sobre a ingestão de alimento, o peso corporal e a homeostase de glicose em camundongos C57Bl/6 obesos induzidos por dieta (DIO)

[00264] A FP2 foi avaliada quanto a sua capacidade de reduzir a ingestão de alimento e o peso corporal e melhorar a homeostase da glicose em dosagens repetidas em camundongos C57Bl/6 machos DIO ao longo de um período de 8 dias. Camundongos C57Bl/6 machos DIO (21 semanas de idade, alimentados com alto teor de gordura por 15 semanas) obtidos junto à Taconic Biosciences (Hudson, NY, EUA) foram utilizados no estudo. Os camundongos foram alojados individualmente em uma sala com temperatura controlada com ciclo claro/escuro de 12 horas (6 h/18 h) com acesso à vontade à água e alimentados com a Dieta de Pesquisa D12492 (Research Diets, New Brunswick, NJ, EUA). Os camundongos foram aclimatados >1 semana no ambiente do alojamento de camundongos antes do experimento. Os pontos finais do teste foram as medições de ingestão de alimento, peso corporal, composição corporal e pontos finais glicêmicos (OGTT, glicose sanguínea). Um dia antes da dosagem, os animais foram pesados e agrupados de acordo com o peso corporal (PC). Os camundongos receberam as doses por injeção subcutânea. Os animais tratados com a FP2 receberam este composto no Dia 0, Dia 3, Dia 6, Dia 9 e Dia 12. O grupo de veículo e o grupo com rosiglitazona receberam PBS estéril nestes dias. Rosiglitazona foi fornecida na dieta a 0,015% p/p à vontade. O peso corporal e a ingestão de alimento foram registrados diariamente, ao longo de um período de quinze dias. A glicose sanguínea foi medida nos Dias 0, 7 e 13. Um teste de tolerância à glicose oral (OGTT) foi realizado no Dia 14. Os níveis de insulina foram medidos em pontos selecionados no tempo

durante o OGTT. Os camundongos foram eutanasiados com CO₂ e amostras sanguíneas terminais foram coletadas para exposição através de punção cardíaca no Dia 15. Um braço de PK separado foi operado com três camundongos por grupo de dose com um total de 15 camundongos.

Análise de resposta à exposição (E-R) para FP2 em camundongos DIO

[00265] A maioria dos animais nos braços da farmacodinâmica (PD, de "pharmacodynamics") (eficácia) tinham concentrações de fármaco indetectáveis no último dia do estudo quando as amostras de farmacocinética (PK) foram obtidas, potencialmente devido à imunogenicidade. Portanto, os perfis farmacocinéticos médios dos braços de PK, em vez de PK individual dos braços de PD, foram utilizados para conduzir a resposta à exposição (dos Dias 3, 6 e 9, respectivamente) para a % de alteração de peso da linha de base nos braços de PD no nível de dose correspondente. Este método presume que os braços de PK se comportam de modo similar aos braços de PD em termos de exposição ao fármaco.

[00266] O modelo de $E_{\text{máx}}$ (Graphpad Prism 6, log(agonista) versus resposta) foi utilizado para correlacionar a exposição com os dados de resposta (concentrações de fármaco transformado em log). O coeficiente angular de Hill foi definido como sendo 1. Note-se que os valores de EC₁₀ a EC₅₀ do ajustado por modelo estavam dentro de duas vezes entre os dias 3, 6 e 9, apesar de as estimativas de $E_{\text{máx}}$ serem diferentes ($E_{\text{máx}}$ = -4,26%, -8,18% e -9,85%, respectivamente). Alguns animais no Dia 9 mostraram também a perda de exposição ao fármaco devido à potencial formação de ADA, e, portanto, as estimativas do parâmetro E-R com base nos dados do Dia 9 devem ser interpretadas com cuidado.

[00267] Os efeitos de duas semanas de exposição de FP2 sobre a ingestão de alimento, o peso corporal, a homeostase de glicose e o

teor de gordura hepática foram avaliados em camundongos C57Bl/6 machos obesos induzidos por dieta. A exposição entre 1,7 e 3,3 nM de FP2 para o grupo de tratamento com 0,3 nmol/kg, entre 7,1 e 14 nM para o grupo de tratamento com 1,0 nmol /kg, entre 20,8 e 41,6 nM para o grupo de tratamento com 3,0 nmol/kg e entre 28,5 e 112,9 nM de FP2 para o grupo de tratamento com 10 nmol/kg foi mantida até o Dia 9 no braço de PK do estudo (n = 2 ou 3, Tabela 49). Após o Dia 9, uma diminuição em níveis circulantes foi observada na maioria dos animais apesar da dosagem q3d continuada (Tabela 49). Consistente com esta compensação acelerada, a maior parte dos animais no braço de PD do estudo apresentou níveis de FP2 circulantes indetectáveis no Dia 15 (Tabela 50).

[00268] O tratamento de camundongos DIO com FP2 q3d reduziu a ingestão de alimento (Tabela 38), o peso corporal (Tabela 39, 40 e Figura 20) e a glicose sanguínea pós-prandial em comparação com o tratamento com veículo (Tabela 43 e Figura 23). Uma redução significativa na ingestão de alimento foi vista no Dia 2, Dia 5 e Dia 8 para 0,3 nmol/kg, do Dia 1 até o Dia 7 para 1,0 nmol/kg, no Dia 1, Dia 2, do Dia 4 até o Dia 6 e Dia 8 para 3,0 nmol/kg, e no Dia 1, do Dia 3 até o Dia 6, Dia 8 e Dia 9 para 10,0 nmol/Kg. As alterações percentuais de peso corporal foram significativas a partir do Dia 5 até o Dia 13 para 0,3 nmol/kg, do Dia 3 ao Dia 13 para 1,0 nmol/kg e 10,0 nmol/kg, e do Dia 4 até o Dia 13 para 3,0 nmol/Kg. As alterações em gramas de peso corporal foram significativas do Dia 8 até o 0,3 nmol/kg, a partir do Dia 6 para 1,0 nmol/kg, a partir do Dia 7 para 3,0 nmol/kg e partir do Dia 5 para 10,0 nmol/kg. As diminuições nos níveis de glicose sanguínea pós-prandiais foram significativas no Dia 7 para os animais no nível de dose de 3,0 nmol/kg e foram significativas no Dia 13 para os animais nos níveis de dose de 3,0 e 10,0 nmol/kg.

[00269] Os camundongos DIO tratados com FP2 q3d melhoraram a

tolerância à glicose no Dia 14 em comparação com o tratamento com veículo durante um desafio com glicose oral (Tabela 41; Figuras 21A e 21B). A glicose foi significativamente mais baixa aos 30 minutos para o grupo com 0,3 nmol/kg, aos 60 minutos e 120 minutos para o grupo com 1,0 nmol/kg, aos 120 minutos para o grupo com 3,0 nmol/kg e aos 30, 90 e 120 minutos para o grupo com 10,0 nmol/Kg. A área total sob a curva foi significativa para todos os grupos de dosagem. Os níveis de insulina durante o desafio com glicose foram significativamente mais baixos para os grupos com 0,3 e 10,0 nmol/kg aos 30 minutos (Tabela 42; Figuras 22A e 22B). Além disso, em comparação com os animais tratados com veículo, houve uma redução significativa no valor do HOMA-IR em jejum calculado em camundongos DIO após 14 dias de tratamento com FP2 q3d com 10,0 nmol/kg, indicativo de sensibilidade à insulina melhorada (Tabela 44 e Figura 24).

[00270] A composição corporal foi medida por IRM no Dia -1 antes do início do estudo e no Dia 13 (Tabela 47 e Tabela 48). Os camundongos DIO tratados com FP2 a 1,0 nmol/kg e 10,0 nmol/kg apresentaram reduções significativas na massa gorda no Dia 13, enquanto não se verificaram alterações na massa magra para qualquer um dos grupos de tratamento. No Dia 13, o grupo de tratamento com 10,0 nmol/kg teve um aumento significativo na porcentagem de massa magra e uma redução significativa na porcentagem de massa gorda em comparação com o grupo tratado com veículo. As alterações do Dia -1 ao Dia 13 foram significativas para a massa magra nos grupos de tratamento com 0,3 nmol/kg, 1,0 nmol/kg e 10,0 nmol/kg e foram significativas para a porcentagem de massa magra nos grupos de tratamento de 1,0, 3,0 e 10,0 nmol/kg. As alterações do Dia -1 ao Dia 13 foram significativas para massa gorda e porcentagem de massa magra em todos os grupos de tratamento em comparação com o veículo.

[00271] Não houve diferença significativa nos níveis séricos de

GDF15 dos camundongos endógenos entre os animais tratados com veículo e os camundongos tratados com FP22 q3d durante 15 dias (Tabela 46).

[00272] Conclusão: os resultados sugerem que a exposição mais alta ao fármaco está, de modo geral, associada a uma maior alteração de % de peso a partir da linha de base em um nível populacional entre os grupos de dose estudados nos Dias 3, 6 e 9.

[00273] A exposição à FP2 ao longo de duas semanas levou à redução de ingestão de alimento, peso corporal diminuído, glicose sanguínea diminuída e sensibilidade à insulina e tolerância à glicose melhoradas em camundongos DIO. Diminuições significativas na ingestão de alimento ao longo de vários dias foram alcançadas com 1,0, 3,0 e 10,0 nmol/kg q3d. O peso corporal diminuiu significativamente, começando de três a cinco dias após o início do estudo. A glicose sanguínea pós-prandial no Dia 13 foi significativamente diminuída após a administração q3d de FP2 com 3,0 e 10,0 nmol/kg. A sensibilidade à insulina representada pelo HOMA-IR em jejum significativamente diminuído foi alcançada 14 dias após 10,0 nmol/kg de FP2 administrados q3d. No Dia 13, observou-se um aumento significativo na porcentagem de massa magra e uma redução significativa na porcentagem de massa gorda em camundongos DIO tratados q3d com 10,0 nmol/kg de FP2.

Tabela 38: Efeito de FP2 sobre a ingestão diária de alimento (g) ao longo de 13 dias de tratamento.

Tratamento Dia	Veículo N/A	FP2 (nmol/kg)				Rosiglita- zona 10 mpk/dia
		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

Tratamento Dia	Veículo N/A	FP2 (nmol/kg)				Rosiglita- zona 10 mpk/dia
		0,3	1,0	3,0	10,0	
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

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo, exceto n=7 quando indicado por ^

*-p < 0,05, versus veículo

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey

Tabela 39: Efeito de FP2 sobre alteração percentual de peso corporal durante 13 dias de tratamento

Tratamento Dia	Veículo N/A	FP2 (nmol/kg)				Rosiglita- zona 10 mpk/dia
		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

Tratamento Dia	Veículo N/A	FP2 (nmol/kg)				Rosiglita- zona 10 mpk/dia
		0,3	1,0	3,0	10,0	
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

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas utilizadas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey

Tabela 40: Efeito de FP2 sobre a alteração no peso corporal (g) ao longo de 13 dias de tratamento

Tratamento Dia	Veículo N/A	FP2 (nmol/kg)				Rosiglita- zona 10 mpk/dia
		0,3	1,0	3,0	10,0	
-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

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por

tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey

Tabela 41: Efeito de FP2 sobre os níveis de glicose sanguínea (mg/dL) durante um OGTT após 14 dias de tratamento

Tratamento	Dosagem (nmol/kg)	Tempo após o desafio com glicose (min.)					ASC total (mg/dL/ 120 min)	Δ ASC (mg/dL/ 120 min)
		0	30	60	90	120		
Veículo	ND	161±10	225±17	228±14	208±18	213±19	25.429±1.228	6.094±1.430
FP2	0,3	144±4	163±14*	209±11	180±12	171±7	21.270±399*	3.985±521
	1,0	151±9	179±18	188±7	179±13	163±8*	21.096±754*	2.972±907
	3,0	149±8	180±18	179±11*	164±6	163±9*	20.338±876*	2.426±1.058
	10,0	134±6	163±7*	190±13	152±7*	163±8*	19.599±614*	3.539±1.198
Rosiglitazona	10 mpk/dia	132±9	152±10*	162±13*	138±9*	159±9*	17.904±632*	2.139±1.179

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey para os valores de glicose; teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey para ASC

Tabela 42: Efeito de FP2 sobre os níveis de insulina (ng/ml) durante um OGTT após 14 dias de tratamento

Tratamen- to	Dose (nmol/kg)	Tempo após o desafio com gli- cose (min.)			ASC total (ng/ml/90 min.)
		0	30	90	
Veículo	ND	4,2±0,7	12,2±2,3	3,6±0,5	716,1±122,0
FP2	0,3	2,9±0,6	5,8±1,8*	2,4±0,4	377,1±97,3
	1,0	2,9±0,4	8,2±2,6	2,6±0,4	491,8±118,2
	3,0	3,0±0,3	8,4±1,5	2,5±0,3	498,6±77,0
	10,0	2,4±0,4	4,3±0,5*	2,1±0,4	295,5±32,0*
Rosiglita- zona	10 mpk/dia	0,9±0,1	1,8±0,2*	0,8±0,1	118,5±9,6*

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey para os valores de insulina, teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey para ASC

Tabela 43: Efeito de FP2 sobre os níveis de glicose sanguínea pós-prandiais (mg/dL)

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Tempo após o início do tratamen- to (dias)		
		0	7	13
Veículo	ND	162±5	159±6	180±9
FP2	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*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	137±7	117±4*	134±6*

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA RM de dois fatores, Tukey

Tabela 44: HOMA-IR em jejum em camundongos DIO 14 dias após o tratamento q3d com FP2

Tratamento	Dose (nmol/kg)	HOMA-IR
Veículo	ND	48,7±9,2
FP2	0,1	30,1±6,6
	1,0	30,5±3,8
	3,0	31,3±3,2
	10,0	22,7±3,1*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	8,7±1,0*

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey

Tabela 45: Peso hepático após 15 dias de tratamento com FP2 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Peso hepático, (g)	Peso hepático (% do corpo)
Veículo	ND	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
Rosiglitazona	10 mpk/dia	1,9±0,1	4,1±0,2

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey

Tabela 46: Níveis séricos de GDF15 em camundongos (pg/ml) após 15 dias de tratamento com FP2 q3d em camundongos DIO

Tratamento	Dose (nmol/kg)	mGDF15
Veículo	ND	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
Rosiglitazona	10 mpk/dia	509,6±26,2*

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*-p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey

Tabela 47: Efeito de FP2 q3d em camundongos DIO sobre a composição corporal (g) medida por IRM

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Gordura (g) no dia -1	Gordura (g) no dia 13	Δ Gordura (g)	Massa magra (g) no dia -1	Massa magra (g) no dia 13	Δ Massa magra (g)
Veículo	ND	17,4±0,6	18,2±0,6	0,9±0,3	25,4±0,3	25,1±0,3	-0,4±0,2
FP2	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±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±0,8*	-3,6±0,5*	26,1±0,6	24,5±0,6	-1,7±0,2*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	17,2±0,6	19,1±0,5	1,9±0,6	25,5±0,7	25,1±0,6	-0,4±0,2

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey

Tabela 48: Efeito de FP2 q3d em camundongos DIO sobre a composição corporal (%) medida por IRM

Tratamento	Dose (nmol/kg)	Gordura (%) Dia -1	Gordura (%) Dia 13	Δ Gordura (%)	Massa magra (%) Dia -1	Massa magra (%) Dia 13	Δ Massa magra (%)
Veículo	ND	38,1±1,0	40,1±1,0	2,1±0,3	55,9±0,9	55,3±0,9	-0,6±0,3
FP2	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±1,5*	-3,8±0,8*	57,5±1,0	61,7±1,4*	4,2±0,7*
Rosiglitazona	10 mpk/dia	38,0±1,2	41,1±0,9	3,1±0,9	56,2±1,2	53,9±0,8	-2,3±0,8

Os valores representam média ± EPM para os dados de 8 animais por tempo por grupo

*p<0,05, versus veículo

Análises estatísticas: Teste de comparações múltiplas de ANOVA de um fator, Tukey

Tabela 49: Exposições séricas de FP2 (nM) do braço de PK durante o tratamento q3d em camundongos DIO

Grupo de tratamento	Identificação do indivíduo	Tempo após a dose inicial (tempo após a última dose)						
		Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 14 (48 h)	Dia 15 (72 h)	Dia 17 (120 h)
0,1 nmol/kg	9	1,930	2,993	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	10	1,853	3,369	2,817	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	11	1,715	2,637	2,568	2,709	3,441	1,313	< LQ
1,0 nmol/kg	9	8,198	9,660	9,645	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	10	7,073	10,595	8,966	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	11	6,689	13,967	10,802	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
3,0 nmol/kg	9	20,802	26,329	27,863	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	10	23,563	32,020	41,576	1,168	< LQ	< LQ	< LQ
	11	21,704	30,101	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Grupo de tratamento	Identificação do indivíduo	Tempo após a dose inicial (tempo após a última dose)						
		Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 14 (48 h)	Dia 15 (72 h)	Dia 17 (120 h)
10,0 nmol/kg	9	28,495	33,050	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	10	70,779	112,89 8	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	11	70,404	111,76 7	55,117	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Os dados são expressos como a concentração para cada animal.

< LOQ = abaixo do limite de quantificação; o LOQ é 0,494 nM

** Os valores nos Dias 3, 6, 9 e 12 são imediatamente antes da próxima dose

Tabela 50: Exposições séricas terminais (nM) de FP2 após 15 dias de tratamento q3d em camundongos DIO

ID do Animal	Grupo de tratamento (nmol/kg)			
	0,1	1,0	3,0	10,0
1	2,567	< LQ	< LQ	< LQ
2	< LQ	< LQ	< LQ	44,149
3	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
4	1,144	0,678	< LQ	< LQ
5	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
6	3,440	< LQ	< LQ	< LQ
7	2,727	< LQ	< LQ	< LQ
8	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Os dados são expressos como a concentração para cada animal.

< LOQ = abaixo do limite de quantificação; o LOQ é 0,494 nM

Exemplo 17: Farmacocinética de múltiplas espécies e resposta imune de FP2

Farmacocinética de camundongo

[00274] As propriedades farmacocinéticas de FP2 foram avaliadas

quando administradas por via subcutânea em camundongos C57Bl/6 fêmeas. A FP2 foi administrada por via subcutânea (n=5 amostras por ponto de tempo) e por via intravenosa (n=5 amostras por ponto de tempo) a camundongos C57Bl/6 fêmeas (Sage Laboratories, St Louis, MO, EUA) em um nível de dose de 2,0 mg/kg em PBS, (pH 7,3 a 7,5). A coleta de amostra no último ponto no tempo foi através de uma sangria terminal. Foram coletadas amostras sanguíneas, o soro foi processado e as concentrações de fármaco até 168 horas foram medidas. Os níveis de FP2 foram medidos usando um método de imunoenensaio. Os perfis de concentração de fármaco no plasma são sumarizados na Tabelas 51 e 52 e ilustrados na Figura 25.

[00275] A análise farmacocinética de FP2 em camundongos C57Bl/6 demonstrou uma meia-vida terminal de ~1,51 e ~1,76 dias após dosagem IV e SC, respectivamente, com uma biodisponibilidade média de ~61% após a administração SC.

Tabela 51: Concentração sérica (ng/ml) de FP2 após uma dose subcutânea (SC) única em camundongos C57Bl/6

Ponto no tempo	FP2 - Dose SC						
	Resultado do animal 31 (ng/ml)	Resultado do animal 32 (ng/ml)	Resultado do animal 33 (ng/ml)	Resultado do animal 35 (ng/ml)	Resultado do animal 36 (ng/ml)	Resultado médio (ng/ml)	Desvio padrão (ng/ml)
4 horas	11.310,11	6.323,44	23.489,21	4.357,74	4.835,54	10.063,21	7.995,0
24 horas	12.378,58	10.896,80	17.769,03	15.928,14	15.404,08	14.475,33	2.785,0
72 horas	5.127,95	5.569,27	6.727,37	7.909,66	7.550,32	6.576,91	1.210,5
96 horas	3.059,83	3.350,25	4.042,04	4.095,15	4.431,94	3.795,84	569,0
168 horas	784,61	1.202,66	1.364,68	1.557,60	1.678,02	1.317,51	348,9

Tabela 52: Concentração sérica (ng/ml) de FP2 após uma dose intravenosa (IV) única em camundongos C57Bl/6.

Ponto no tempo	FP2 - Dose IV						
	Resultado do animal 37 (ng/ml)	Resultado do animal 40 (ng/ml)	Resultado do animal 41 (ng/ml)	Resultado do animal 45 (ng/ml)	Resultado do animal 48 (ng/ml)	Resultado médio (ng/ml)	Desvio padrão (ng/ml)
1 hora	49.573,59	42.382,59	40.001,18	43.085,75	46.443,59	44.297,34	3.742,9
24 horas	22.173,85	19.120,39	19.393,78	19.798,29	17.459,96	19.589,25	1.696,7
72 horas	8.334,33	7.989,10	8.573,44	9.086,37	8.186,68	8.433,98	422,5
96 horas	4.478,83	4.699,80	4.749,93	5.331,39	4.579,08	4.767,81	332,3
168 horas	1.044,24	1.419,64	1.393,44	1.835,63	979,49	1.334,49	343,6

Tabela 53: Parâmetros farmacocinéticos de FP2 após a administração de 2 mg/kg IV e 2 mg/kg SC em camundongos C57Bl/6.

Via		t _{1/2} (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vz ou Vz/F (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (dia)	AUC _{0-último} (dia* ng/ml)	AUC _{0-inf} (dia* ng/ml)
SC	Média	1,76	43	108	15.619	1	44.972	48.379
	DP	0,16	8	20	4.870		8.563	9.147
IV	Média	1,51	25	55	44.297	0,042	76.269	79.253
	DP	0,18	1	6	3.743		3.788	4.051

Farmacocinética de rato

[00276] A FP2 foi administrada por via subcutânea (n=5 amostras por ponto de tempo) e por via intravenosa (n=5 amostras por ponto de tempo) a ratos Sprague-Dawley fêmeas (Sage Laboratories, St Louis, MO, EUA) em um nível de dose de 2,0 mg/kg em PBS, (pH 7,3 a 7,5). A coleta de amostra no último ponto no tempo foi através de uma sangria terminal. Foram coletadas amostras sanguíneas, o soro foi processado e as concentrações de fármaco até 168 horas foram medidas. Os níveis de FP2 foram medidos usando um método de imunoenensaio. Os perfis de concentração de fármaco no plasma são sumarizados na Tabelas 54 e 55 e ilustrados na Figura 26. Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir desses dados estão su-

marizados na Tabela 56.

[00277] A análise farmacocinética de FP2 em ratos Sprague-Dawley demonstrou uma meia-vida terminal de ~1,46 e ~1,37 dias após as dosagens IV e SC, respectivamente, com uma biodisponibilidade média de ~28% após a administração SC.

Tabela 54: Concentração sérica (ng/ml) de FP2 após uma dose subcutânea (SC) única em ratos Sprague-Dawley.

Ponto no tempo	FP2 - Dose SC						Desvio padrão (ng/ml)
	Resultado do animal 01 (ng/ml)	Resultado do animal 02 (ng/ml)	Resultado do animal 03 (ng/ml)	Resultado do animal 04 (ng/ml)	Resultado do animal 05 (ng/ml)	Resultado médio (ng/ml)	
4 horas	730,95	257,94	469,95	496,34	400,65	471,16	172,2
24 horas	9.236,27	6.658,79	7.728,92	7.449,56	6.502,60	7.515,23	1.092,1
72 horas	4.559,04	4.464,72	5.619,82	4.287,25	3.844,15	4.555,00	655,6
96 horas	2.791,97	2.452,35	3.387,55	2.316,06	2.176,00	2.624,79	483,8
168 horas	622,32	606,36	< 80,00	514,19	476,49	554,84	70,7

Tabela 55: Concentração sérica (ng/ml) de FP2 após uma dose intravenosa (IV) única em ratos Sprague-Dawley.

Ponto no tempo	FP2 - Dose IV						Desvio padrão (ng/ml)
	Resultado do animal 06 (ng/ml)	Resultado do animal 07 (ng/ml)	Resultado do animal 08 (ng/ml)	Resultado do animal 09 (ng/ml)	Resultado do animal 10 (ng/ml)	Resultado médio (ng/ml)	
1 hora	60.785,80	47.392,80	43.046,54	46.014,25	44.547,65	48.357,41	7.134,5
24 horas	25.470,36	24.729,88	21.157,29	20.497,32	21.459,71	22.662,91	2.267,1
72 horas	8.208,46	9.262,13	8.866,76	8.635,93	8.843,83	8.763,42	384,1
96 horas	4.433,18	4.833,22	4.995,63	4.630,60	4.604,13	4.699,35	218,1
168 horas	1.083,14	1.469,35	1.614,61	1.394,17	1.053,89	1.323,03	245,7

Tabela 56: Parâmetros farmacocinéticos de FP2 após a administração de 2 mg/kg IV e 2 mg/kg SC em ratos Sprague-Dawley.

Via		t_{1/2} (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vz ou Vz/F (ml/kg)	C_{máx} (ng/ml)	T_{máx}* (dia)	AUC_{0-último} (dia*ng/ml)	AUC_{0-inf} (dia*ng/ml)
SC	Média	1,37	84	165	7.515	1	22.614	24.036
	DP	0,04	10	17	1.092		2.509	2.893
IV	Média	1,46	23	49	48.357	0,042	83.271	86.089
	DP	0,12	2	6	7.135		6.081	5.820

Farmacocinética de macaco

[00278] A FP2 foi administrada por via subcutânea a 1 mg/kg e por via intravenosa a 1 mg/kg em três macacos cynomolgus machos cada em PBS, (pH 7,0 a 7,6). Foram coletadas amostras sanguíneas, o plasma foi processado e as concentrações de fármaco foram medidas até 21 dias.

[00279] A farmacocinética (PK) de FP2 foi caracterizada após a administração de uma dose IV única (1,0 mg/kg) e SC (1,0 mg/kg) em macacos cynomolgus. O perfil de concentração de fármaco ao longo do tempo no plasma após a administração SC é sumarizado nas Tabelas 57 e 58, para análises por imunoensaio e por LCMS, respectivamente, e após a administração IV, nas Tabelas 59 e 60, para análises por imunoensaio e por LCMS, respectivamente. Os dados do imunoensaio estão representados em gráfico na Figura 27 e os dados de LCMS estão representados na Figura 28.

[00280] Usando os resultados da análise por imunoensaio, a meia-vida terminal média com base em NCA (t_{1/2}) para FP2 foi de ~7,05 e ~8,51 dias após a dosagem IV e SC, respectivamente. Os parâmetros PK médios após a administração IV e SC estão sumarizados na Tabela 61. Usando os resultados da bioanálise por imunoensaio, a meia-vida terminal média estimada por um modelo não compartimentalizado (t_{1/2}) para FP2 foi de ~7,05 e ~8,51 dias após a dosagem IV e SC, respectivamente. A biodisponibilidade (F%) média da FP2 foi estimada como

sendo de ~98,5% com base em $AUC_{0-último}$ e estimada como sendo de ~109,2% com base em AUC_{0-inf} em macacos cynomolgus após a administração SC.

Tabela 57: Concentração plasmática (ng/ml) de FP2 medida por imunoensaio após uma única dose SC em macacos cynomolgus.

Tempo (horas)	Imunoensaio			SC média	Desvio padrão
	Animal 704	Animal 705	Animal 706		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	N/A
6	7.365,3	6.128,5	6.056,9	6.516,9	735,6
24	19.716,8	10.903,8	10.554,7	13.725,1	5.191,9
48	18.191,7	14.353,7	14.464,7	15.670,0	2.184,5
72	17.813,9	14.207,5	12.684,0	14.901,8	2.634,5
120	13.823,9	11.445,8	10.590,8	11.953,5	1.675,3
168	12.359,6	10.103,8	9.467,8	10.643,8	1.519,7
240	9.457,9	7.642,6	8.109,1	8.403,2	942,7
336	6.796,8	5.679,8	5.235,7	5.904,1	804,3
432	5.581,3	3.830,6	3.746,5	4.386,1	1.035,9
528	4.126,2	2.613,4	2.879,3	3.206,3	807,7

N/A = não se aplica

Tabela 58: Concentração plasmática (ng/ml) de FP2 medida por LCMS após uma única dose SC em macacos cynomolgus.

Tempo (horas)	LC/MS			SC média	EPM
	Animal 704	Animal 705	Animal 706		
0	< 1.000	< 1.000	< 1.000	< 1.000	N/A
6	6.110,0	5.910	6.200,0	6.073,3	85,7
24	#	10.420,0	11.300,0	10.860,0	359,3
48	16.560,0	13.510,0	14.960,0	15.010,0	880,8
72	13.690,0	13.450,0	13.380,0	13.506,7	93,9
120	11.040,0	#	#	11.040,0	N/A
168	#	8.680,0	9.400,0	9.040,0	293,9
240	6.940,0	7.070,0	7.140,0	7.050,0	58,6

Tempo (horas)	LC/MS			SC média	EPM
	Animal 704	Animal 705	Animal 706		
336	4.400,0	4.580,0	4.430,0	4.470,0	55,7
432	-	2.910,0	-	2.910,0	N/A
528	< 1.000	< 1.000	< 1.000	< 1.000	N/A

- = a execução inicial falhou, amostra insuficiente para análise repetida

= tubo com marcação incorreta, amostra excluída da análise

N/A = não se aplica

Tabela 59: Concentração plasmática (ng/ml) de FP2 medida por imunoensaio após uma única dose IV em macacos cynomolgus.

Tempo (horas)	Imunoensaio			IV média	Desvio padrão
	Animal 701	Animal 702	Animal 703		
0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	< 80,0	N/A
1	29.938,3	31.139,0	23.545,3	28.207,6	4.082,0
6	24.711,9	21.173,0	20.434,4	22.106,4	2.286,5
24	19.648,4	21.420,9	8.662,7	16.577,3	6.911,3
48	17.790,1	17.107,0	12.983,1	15.960,0	2.600,7
72	17.889,4	13.871,1	13.692,4	15.151,0	2.373,3
120	15.298,6	11.982,5	11.361,5	12.880,9	2.116,7
168	11.752,0	10.982,8	9.933,8	10.889,5	912,7
240	8.921,1	7.465,0	6.733,4	7.706,5	1.113,6
336	6.572,8	5.750,5	4.687,6	5.670,3	945,1
432	1.099,6	3.425,0	3.458,0	2.660,9	1.352,2
528	< 80,0	2.069,0	2.416,2	2.242,6	N/A

N/A = não se aplica

Tabela 60: Concentração plasmática (ng/ml) de FP2 medida por LCMS após uma única dose IV em macacos cynomolgus

Tempo (horas)	LC/MS			IV média	EPM
	Animal 701	Animal 702	Animal 703		
0	< 1.000	< 1.000	< 1.000	< 1.000	N/A
1	25.340,0	28.820	26.220,0	26.793,3	1.044,7

Tempo (horas)	LC/MS			IV média	EPM
	Animal 701	Animal 702	Animal 703		
6	24.610,0	26.340,0	23.810,0	24.920,0	746,6
24	18.410,0	18.680,0	9.810,0	15.633,3	2.912,7
48	16.290,0	17.370,0	13.840,0	15.833,3	1.044,3
72	15.430,0	14.920,0	14.280,0	14.876,7	332,7
120	11.180,0	11.480,0	11.440,0	11.366,7	94,0
168	9.170,0	#	#	9.170,0	N/A
240	6.800,0	7.380,0	7.600,0	7.260,0	238,6
336	2.870,0	3.860,0	3.480,0	3.403,3	288,3
432	-	-	3.030,0	3.030,0	N/A
528	1.150,0	1.680,0	1.400,0	1.410,0	153,1

- = a execução inicial falhou, amostra insuficiente para análise repetida

N/A = não se aplica

= tubo com marcação incorreta, amostra excluída da análise

Tabela 61: Média ($\pm$ DP) dos parâmetros farmacocinéticos de FP2 após administração IV e SC de 1 mg/kg em macacos cynomolgus.

Via		t _{1/2} (dia)	CL ou CL/F (ml/dia/kg)	Vz ou Vz/F (ml/kg)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} * (dia)	AUC _{0-último} (dia*ng/ml)	AUC _{0-inf} (dia*ng/ml)
SC	Média	8,51	4,6	56	16.178	1,67	180.792	221.032
	DP	1,28	0,8	7	3.065		29.990	44.931
IV	Média	7,05	4,9	51	28.208	0,042	183.468	202.380
	DP	1,45	0,2	12	4.082		18.268	9.617

Os parâmetros farmacocinéticos são os valores médios com base no NCA dos dados do imunoensaio de farmacocinético.

*T_{máx}. (mediana)

Teste de estabilidade em plasma humano

[00281] A estabilidade de FP2 *ex vivo* foi examinada em plasma fresco heparinizado a 37 °C durante até 48 horas. O plasma humano fresco e não congelado foi gerado a partir de sangue heparinizado de dois indivíduos (um macho e uma fêmea) por centrifugação. A FP2 foi incubada nessa matriz a 37 °C com misturação delicada, ou 0, 4, 24 e 48 horas. A

concentração de FP2 foi determinada com o uso de um método de imunoensaio. Uma captura por imunoafinidade independente seguida do método de LCMS foi utilizada para quantificar a concentração do dímero intacto presente nesta matriz sob as condições de teste.

[00282] No método de imunoensaio, a porcentagem de recuperação a partir da concentração inicial se situava na faixa de 104,8 a 94,1 e não diminuiu ao longo do tempo, demonstrando que a FP2 é estável no plasma humano até 48 horas *ex vivo* (Figura 29 e Tabela 62). O método de LCMS mostrou que as concentrações foram estáveis ao longo do tempo, demonstrando que a FP2 permanece um dímero intacto no plasma humano até 48 horas *ex vivo* (Figura 30 e Tabela 63).

Tabela 62: Estabilidade de FP2 *ex vivo* (porcentagem de recuperação normalizada) ao longo de 48 horas no plasma humano (ng/ml) medida por imunoensaio.

Compos- to	Gênero	Tempo (ho- ras)	Concentração (ng/mL)	% de recuperação normalizada
FP2	fêmea	0	9.104	100,0
		4	9.056	99,5
		24	9.332	102,5
		48	9.374	103,0
	macho	0	9.473	100,0
		4	9.929	104,8
		24	9.081	95,9
		48	8.912	94,1

Tabela 63: Estabilidade de FP2 ex vivo (porcentagem de recuperação normalizada) ao longo de 48 horas no plasma humano (ng/ml) medida por LC/MS intacta.

Composto	Gênero	Tempo (horas)	Concentração (ng/mL)	% de recuperação normalizada
FP2	fêmea	0	11.090	100,0
		4	10.830	97,7
		24	10.500	94,7
		48	10.030	90,4
	macho	0	10.760	100,0
		4	9.640	89,6
		24	10.190	94,7
		48	8.500	79,0

Exemplo 18: Eficácia de dose única de FP1 e FP2 em macacos cynomolgus

[00283] Foram avaliados os efeitos de FP1 e FP2 sobre a ingestão de alimento e o peso corporal após uma dose única em macacos cynomolgus sem tratamento prévio.

[00284] A FP1 foi administrada por via subcutânea a uma coorte de macacos cynomolgus sem tratamento prévio em três níveis de dose: 1, 3 e 10 nmol/Kg. Um grupo tratado com veículo também foi incluído. Os animais foram tratados de modo cego. O estudo durou um total de 6 semanas: 2 semanas de medição basal de ingestão de alimento e coleta de dados, 4 semanas de coleta de dados após administração única do composto. As exposições de fármaco no plasma foram medidas nos Dias 1, 7, 14, 21 e 28 após a dosagem.

[00285] O tratamento de macacos cynomolgus com uma dose única de FP1 reduziu a ingestão de alimento e o peso corporal em comparação ao tratamento com veículo (Figuras 31 e 32). Uma redução significativa na ingestão diária de alimento foi observada nos dias 4, 5, 6 e 8 a 12 pa-

ra o nível de dose de 10 nmol/kg (Figura 31). A média semanal da ingestão diária de alimento foi significativamente reduzida durante a semana 2 após a administração para o nível de dose de 10 nmol/Kg. O nível de dose de 3 nmol/kg apresentou uma redução percentual significativa da ingestão de alimento semanal média antes da dosagem na semana 2 após a administração, e o nível de dose de 10 nmol/kg teve uma redução percentual significativa da ingestão de alimento semanal média antes da dosagem nas semanas 1 e 2 após a administração. Uma redução significativa na porcentagem de alteração no peso corporal a partir do dia 0 foi vista no dia 28 para o nível de dose de 3 nmol/kg e nos dias 14, 21 e 28 para o nível de dose de 10 nmol/kg (Figura 32).

[00286] A FP2 foi administrada por via subcutânea a uma coorte de macacos cynomolgus sem tratamento prévio em três níveis de dose: 1, 3 e 10 nmol/Kg. Um grupo tratado com veículo também foi incluído. Os animais foram tratados de modo cego. O estudo durou um total de 11 semanas: 5 semanas de medição basal da ingestão de alimento e coleta de dados, 1 semana de tratamento e 5 semanas de coleta de dados na fase isenta de fármaco (do inglês "wash-out"). As exposições de fármaco no plasma foram medidas nos Dias 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a dosagem.

[00287] O tratamento de macacos cynomolgus com uma dose única de FP2 reduziu a ingestão de alimento e o peso corporal em comparação com o tratamento com veículo (Figuras 33 e 34). Uma redução significativa na ingestão diária de alimento foi vista nos dias 3, 5 a 8, 10 e 12 para o nível de dose de 3 nmol/kg, e nos dias 3 a 38 e no dia 40 para o nível de dose de 10 nmol/kg (Figura 33). A média semanal da ingestão diária de alimento foi significativamente reduzida na semana 1 após a administração para o nível de dose de 3 nmol/kg e significativamente reduzida durante as semanas 1 a 6 para o nível de dose de 10 nmol/kg. O nível de dose de 3 nmol/kg apresentou

uma redução percentual significativa a partir da semana anterior à dosagem na média semanal de ingestão diária de alimento na semana 2 após a administração, e o nível de dose de 10 nmol/kg apresentou uma redução percentual significativa a partir da semana antes da dosagem na média semanal de ingestão diária de alimento nas semanas 1 a 6 após a administração. Uma redução significativa na porcentagem de alteração de peso corporal a partir do dia 0 foi observada nos dias 21 a 42 para o nível de dose de 1 nmol/kg, nos dias 14 a 42 para o nível de dose de 3 nmol/kg e nos dias 7 a 42 para o nível de dose de 10 nmol/kg (Figura 33).

Exemplo 19: Eficácia de múltiplas doses de FP2 em macacos cynomolgus

[00288] A eficácia de FP2 foi avaliada com injeções subcutâneas uma vez por semana em uma coorte de macacos cynomolgus com sobrepeso espontâneo e sem tratamento prévio (na faixa de 8 a 20 anos de idade e com peso corporal de 8,0 a 11,9 kg) em 3 níveis de dose: 0,3, 1 e 10 nmol/Kg. O consumo de alimentos foi medido diariamente, o peso corporal foi medido semanalmente e os animais foram clinicamente avaliados diariamente. O tratamento de macacos cynomolgus com sobrepeso com 12 doses semanais de FP2 reduziu a ingestão de alimento (Figura 35) e o peso corporal (Figura 36), em comparação ao tratamento com veículo. A concentração de FP2 circulante foi determinada por imunoensaio (Figura 37). Foi observada a perda de exposição a FP2 em alguns animais em pontos no tempo posteriores, presumivelmente devido ao desenvolvimento de anticorpos antifármaco (AAF): as figuras mostram os dados coletados até o ponto anterior à perda de exposição (definida como uma redução $\geq 40\%$ na concentração de fármaco no soro em relação à medição anterior para o mesmo animal). Ao longo do estudo, não foram observados quaisquer efeitos adversos relacionados ao tratamento.

Exemplo 20: Estabilidade térmica do conector

[00289] A estabilidade térmica foi investigada em relação a vários conectores que conectam HSA e GDF15. Para avaliar o potencial de fragmentar e agregar, as proteínas de fusão HSA-GDF15 com vários conectores foram diluídas para 10 mg/ml. Após a adição de EDTA e metionina, as amostras foram incubadas a 40 °C durante 14 dias. Em seguida, as amostras foram diluídas até a concentração de 1 mg/ml e avaliadas sob cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (SE-HPLC, de "size-exclusion high-performance liquid chromatography"). A porcentagem de proteína intacta, bem como agregada e fragmentada, foi quantificada para essas proteínas. A Tabela 64 mostra que as proteínas HSA-GDF15 com conectores que consistem em repetições AP são mais estáveis contra fragmentação sob estresse térmico.

[00290] Para avaliar se esses conectores afetam a interação da GDF15 com seu receptor, um imunoenensaio com a proteína de fusão Fc-GRFAL revestida sobre a placa e uma detecção anti-GDF15 ou anti-HSA foi executada com o uso de anticorpos monoclonais para GDF15 (Janssen) e HSA (Kerafast, Inc., Boston, MA, EUA). O ensaio mostrou que todas essas variantes de conector na Tabela 66 têm ligação similar ao receptor.

Tabela 64. Resultados de SE-HPLC após estresse térmico por 14 dias por.

SEQ ID NO	Conector ("Linker")	agregado (%)	intacto (%)	fragmento (%)
113	GS(GGGGS) ₈	3,33	84,44	12,22
115	GA(GGGGA) ₈	3,51	87,98	8,5
117	(AP) ₁₀	1,64	98,36	0
119	(AP) ₁₂	2,36	97,64	0
121	GGs-(EGKSSGSGSESKST) ₃ -GGs	1,67	85,24	13,09
123	GS(PGGGS) ₈	2,96	88,12	8,91

SEQ ID NO	Conector ("Linker")	agregado (%)	intacto (%)	fragmento (%)
125	GS(AGGGS) ₈	3,44	86,22	10,34
127	GGG-(EGKSSGSGSESKST) ₂ -GGG	1,71	91,17	7,12

Exemplo 21: Protocolo de teste clínico

[00291] Um estudo de dose única ascendente duplo-cego controlado por placebo e randomizado, para investigar a segurança, a tolerabilidade a farmacocinética e (inclusive biodisponibilidade absoluta) e a imunogenicidade de FP2 administrada subcutaneamente em indivíduos com sobrepeso e de outro modo saudáveis

Protocolo 64739090EDI1001; Fase 1

NÚMERO EudraCT: 2018-000324-34

Abreviações

AAFs	anticorpos antifármaco
ALT	alanina aminotransferase
Anti-HCV	Anticorpos para hepatite C
AST	aspartato aminotransferase
ASC	área sob a curva
BD	biodisponibilidade
ALQ	abaixo da concentração quantificável mais baixa
IMC	índice de massa corporal
PA	pressão arterial
BPM	batimentos por minuto
NUS	nitrogênio de ureia sanguínea
PC	peso corporal
SNC	sistema nervoso central
CRF	formulários de relatório de caso (eletrônicos para este estudo)
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
CV	cardiovascular

FED	formulário de esclarecimento de dados
GD	grupo de dose
DIO	obeso induzido por dieta ("diet-induced obese")
DRC	comitê de revisão de dados
DSM-V	Manual diagnóstico e estatístico de distúrbios mentais (5a Edição) ("Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th edition)")
EC ₅₀	metade da concentração máxima eficaz
ECG	eletrocardiograma
eCRF	formulário eletrônico de relatório de caso
CED	captura eletrônica de dados
EMA	Agência Europeia de Medicamentos ("European Medicines Agency")
UE	União Europeia
FcRn	receptor de Fc neonatal
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA ("US Food and Drug Administration")
FIH	primeiro em humanos ("first-in-human")
FSH	hormônio folículo-estimulante ("follicle stimulating hormone")
BPC	Boas Práticas Clínicas
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15 ("Growth Differentiation Factor 15")
GFRAL	receptor da família GDNF similar a alfa, ("GDNF family receptor-alpha-like"), receptor de GDF15
GGT	gama-glutamil transferase
BPL	Boas Práticas de Laboratório
AS	Autoridade Sanitária
HbA1c	hemoglobina A1c
HBsAg	antígeno de superfície da hepatite B

hCG	gonadotrofina coriônica humana ("human chorionic gonadotropin")
HCV	vírus da hepatite C ("Hepatitis C virus")
HDL	lipoproteína de alta densidade ("High-density lipoprotein")
HED	dose equivalente humana ("Human Equivalent Dose")
HIV	vírus da imunodeficiência humana ("Human Immunodeficiency Virus")
FC	frequência cardíaca
HSA	albumina sérica humana ("human serum albumin")
IAC	Comitê de análise interina ("Interim Analysis Committee")
BI	Brochura do Investigador
TCI	termo de consentimento informado
ICH	Conferência internacional sobre harmonização ("International Conference on Harmonization")
CEI	Comitê de ética independente
PMI	Produto medicinal investigacional
CRI	Comitê de Revisão Institucional
IV	intravenosa
IVRS	sistema interativo de resposta por voz ("interactive voice response system")
IWRS	sistema interativo de resposta via web ("interactive web response system")
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry)
LDL	lipoproteína de baixa densidade ("low-density lipoprotein")
LQI	limite de quantificação inferior
MABEL	nível de efeito biológico mínimo previsto ("Minimum Anticipated Biologic Effect Level")

MedDRA	Dicionário Médico para Atividades Regulatórias ("Medical Dictionary for Regulatory Activities")
DIMR	dose inicial máxima recomendada
URM	utilização de recursos médicos
n	número (tamanho de uma subamostra)
N	número (tamanho total da amostra)
NAbs	anticorpos neutralizantes ("neutralizing antibodies")
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	esteato-hepatite não alcoólica
NBE	nova entidade biológica ("new biological entity")
NOAEL	nível sem efeitos adversos observados ("no observed adverse effect level")
PAD	dose farmacologicamente ativa ("pharmacologically active dose")
PAP	esfregaço de Papanicolau
PD	farmacodinâmica ("pharmacodynamics")
IP	Investigador Principal
PK	farmacocinética ("pharmacokinetics")
RQP	reclamação de qualidade do produto
RRP	resultados relatados pelo paciente (em papel ou eletrônico, conforme for adequado para este estudo)
PSA	antígeno específico para próstata ("prostate specific antigen")
QEWP-5	Questionário sobre Padrões de Alimentação e Peso-5 ("Questionnaire on Eating and Weight Patterns-5")
CVS	célula vermelha do sangue
RET	correceptor sinalizador de GFRAL
SAD	dose única ascendente ("single ascending dose")
EAS	eventos adversos sérios
PAS	pressão arterial sistólica

SC	subcutânea
SD	Sprague-Dawley
SUSAR	suspeita de reação adversa séria inesperada ("suspected unexpected serious adverse reaction")
DMT2	diabetes mellitus tipo 2
EADT	eventos adversos decorrentes do tratamento
TK	toxicocinética ("toxicokinetics")
TSH	hormônio estimulante da tiroide ("thyroid stimulating hormone")
LSN	limite superior do normal
EUA	Estados Unidos da América
EAV	Escala Analógica Visual
CBS	célula branca do sangue

1. Cronograma de tempo e eventos - triagem e período como paciente internado

Período do estudo	Partes 1 e 2 ^a																	
	Triagem	Linha de base		Paciente internado														
Dia	Dia -28 a -3	Dia -2	Dia -1	Dia 1									Dia 2			Dia 3	Dia 4	Dia 5
Pré-dose ou horas em relação à dose do fármaco em estudo				Pré-do-	0	+0,5 h ^s	+1 h	+2 h	+4 h	+6 h	+8 h	+12 h	+24 h	+30 h	+36 h	+48 h	+72 h	+96 h
Triagem ^b																		
Termo de Consentimento Informado (TCI) ^c	X																	
TCI para amostra farmacogenômica	X																	
Histórico demográfico e médico	X																	
Questionário sobre padrões de alimentação e de peso-5	X																	
Critérios de inclusão/exclusão	X	X																
Terapia pré-estudo	X	X																
Triagem de fármacos, álcool e cotinina ^e	X	X																
Sorologia viral (HBsAg, anti-HCV, HIC) ^e	X																	
Hormônio estimulante da tireoide (TSH)	X																	
Hormônio folículo-estimulante (FSH) ^{e,F}	X																	
Hemoglobina Alc (HbAlc) ^e	X																	
Admissão na UPC		X																
Residente na UPC		X	X	X -----X														
Em alta da UPC																		X

Período do estudo	Partes 1 e 2 ^a																	
	Triagem	Linha de base		Paciente internado														
Dia	Dia -28 a -3	Dia -2	Dia -1	Dia 1									Dia 2			Dia 3	Dia 4	Dia 5
Pré-dose ou horas em relação à dose do fármaco em estudo				Pré-do-	0	+0,5 h ^s	+1 h	+2 h	+4 h	+6 h	+8 h	+12 h	+24 h	+30 h	+36 h	+48 h	+72 h	+96 h
Visita ambulatorial	X																	
Administração do fármaco em estudo																		
Randomização ^g				X														
Administrar fármaco em estudo ^h					X													
Avaliações de segurança																		
Exame físico completo	X																	
Exame físico breve		X																X
Altura	X																	
Temperatura corporal (timpânica)	X		X	X									X			X	X	X
Sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca) ¹	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Monitoramento contínuo de ECG com derivação II ^j				X-----X														
ECG de 12 derivações ^{k,l}	X		X ¹	X			X	X	X		X	X	X			X	X	X
Avaliações de farmacodinâmicas																		
Peso corporal ^m	X		X	X									X			X	X	X
Questionários de EAV ^o		X-----X																
Refeições padronizadas para avaliação de 24 horas de ingestão de alimentos ^o			X													X		
Avaliações laboratoriais clínicas																		
Teste de gravidez ^p	X	X																

Período do estudo	Partes 1 e 2 ^a																	
	Triagem	Linha de base		Paciente internado														
Dia	Dia -28 a -3	Dia -2	Dia -1	Dia 1									Dia 2			Dia 3	Dia 4	Dia 5
Pré-dose ou horas em relação à dose do fármaco em estudo				Pré-do-	0	+0,5 h ^s	+1 h	+2 h	+4 h	+6 h	+8 h	+12 h	+24 h	+30 h	+36 h	+48 h	+72 h	+96 h
Hematologia, Química ^e	X	X											X			X		X
Painel de lipídios (Colesterol total, Triglicerídeos, HDL e LDL) ^e	X	X														X		X
Painel de coagulação ^e	X	X											X			X		X
Urinalise ^e	X	X											X			X		X
Biomarcadores exploratórios																		
Coleta de amostra de sangue para biomarcadores exploratórios ^q		X	X	X									X					X
Procedimentos de imunogenicidade e farmacocinética																		
Coleta de amostra de sangue para farmacocinética (PK) ^{r,q}				X		X ^s	X	X	X	X	X	X	X			X	X	X
Coleta de amostra de sangue para anticorpos anti-fármaco (AAF) ^q				X														
Coleta de amostra de sangue opcional para farmacogenômica																		
Coleta da amostra de sangue para DNA ^{t,q}				X														
Avaliações de segurança do paciente em andamento																		
Relato de eventos adversos & medicações concomitantes ^u	X ----- X																	
Evento adverso (perguntas não diretivas) ^u			X	X						X		X	X	X	X	X	X	X

Período do estudo	Partes 1 e 2ª																	
	Triagem	Linha de base		Paciente internado														
Dia	Dia -28 a -3	Dia -2	Dia -1	Dia 1									Dia 2			Dia 3	Dia 4	Dia 5
Pré-dose ou horas em relação à dose do fármaco em estudo				Pré-do-	0	+0,5 h ^s	+1 h	+2 h	+4 h	+6 h	+8 h	+12 h	+24 h	+30 h	+36 h	+48 h	+72 h	+96 h
Avaliação de tolerabilidade local - injeção local				X			X		X	X		X	X			X	X	X
Avaliação de sítio (Parte 1) ^v																		
Reações alérgicas / Hipersensibilidades generalizadas ^w				X			X		X	X		X	X			X	X	X

a - Parte 1 - é duplo-cego e consistirá em até 7 grupos de dose

Parte 2 - é de rótulo aberto e consistirá em um único grupo de dose.

b - Triagem - os procedimentos precisam ocorrer dentro de 4 semanas (28 dias) antes da administração da fármaco em estudo no Dia 1.

c - Consentimento informado - precisa ser obtido antes de se iniciar qualquer procedimento relacionado ao estudo.

d - Critérios de inclusão/exclusão - critérios mínimos para a disponibilidade de documentação que suportam os critérios de elegibilidade são descritos na Seção 4, Elegibilidade da População de Pacientes, e serão confirmados após revisão das avaliações de linha de base antes da dosagem.

e - Consulte o Exemplo 21, Seção 9.6.2, Testes laboratoriais clínicos, a fim de obter uma lista de exames laboratoriais clínicos a serem providenciados; os indivíduos precisam estar em jejum (isto é, sem alimentos ou bebidas [exceto água]) durante ao menos 10 horas antes que o sangue seja coletado. O teste clínico laboratorial de linha de base pode ser obtido no Dia -2 ou no Dia -1, desde que os resultados estejam disponíveis para análise antes da randomização e da dosagem no Dia 1.

f - A ser obtido apenas em todos os indivíduos do sexo feminino.

g - A randomização será executada no Dia 1 após todas as avaliações do Dia -2 e do Dia -1 serem executadas, revisadas e verificadas para confirmar que o indivíduo atende a todos os critérios de inclusão e a nenhum de exclusão (por exemplo, resultados laboratoriais, ECG, etc.).

h - Parte 1 Escalonamento de dose/Dosagem subcutânea (SC): Os indivíduos receberão uma dose única de FP2 ou placebo (volume máximo de 2 mL). **Parte 2:** Os indivíduos receberão uma dose única de FP2 por infusão IV durante 30 minutos (taxa constante). Todos os indivíduos nas Partes 1 e 2 terão que jejuar de um dia para o outro (ao menos 10 horas) antes da dosagem e até 3 horas após a dosagem. O tempo 0 para a Parte 1 é o tempo de injeção SC do fármaco em estudo, e para a Parte 2 é o tempo de início da infusão IV do fármaco em estudo.

i - Os sinais vitais precisam ser medidos após 5 minutos de repouso em uma posição supina e incluem frequência cardíaca em repouso (FC) e pressão arterial (PA). Se a coleta de amostra de sangue ou a medição dos sinais vitais estiver agendada para o mesmo ponto no tempo que o registro de ECG, os procedimentos precisam ser executados na seguinte ordem: sinais vitais, ECG(s), PK, coleta de sangue para análise de biomarcador exploratória ou de segurança. As medições devem ser determinadas com um dispositivo de pressão arterial completamente automatizado. Em todos os pontos no tempo,

pressão arterial única e FC serão medidas e registradas.

j - O monitoramento contínuo de ECG com derivação II será conduzido apenas na Parte 2, e precisa ser iniciado no Dia 1, a partir de 30 minutos antes de começar a infusão IV e até 2 horas após o final da infusão. A critério do investigador, a duração do monitoramento cardíaco pode ser estendida.

k - ECGs com 12 derivações: Todos os ECGs, exceto para o ECG de triagem, serão medidos em triplicata. Os indivíduos devem descansar por ao menos 5 minutos em uma posição supina em um ambiente silencioso sem distrações (por exemplo, televisão, telefones celulares) e devem se abster de falar ou mover braços ou pernas. Os ECGs em triplicata devem ser obtidos com menos de 2 minutos de intervalo em cada ponto no tempo. Quando um ECG é executado no mesmo ponto no tempo, no estudo, que uma amostra PK, a amostra PK deve ser tomada imediatamente após o ECG.

Os ECGs de 12 derivações no Dia -1 devem ser equivalentes no tempo (nos mesmos horários) aos ECGs de 12 derivações no Dia 1 (isto é, pré-dose, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a dose).

m - Peso corporal: A ser obtida antes da refeição matinal e após a micção nos Dias -1, 2, 3, 4 e 5 e pré-dose no Dia 1, após a micção. O peso corporal precisa ser medido em duplicata. Os indivíduos devem ser pesados em uma balança calibrada, vestindo uma camisola sem sapatos.

n - Os procedimentos pré-dosagem devem ser obtidos dentro de 30 minutos antes da administração do fármaco em estudo.

o - Para obter uma descrição detalhada de avaliação de ingestão de alimentos em 24 horas e o tempo para os questionários de EAV, consulte o Exemplo 21 Seção 9.3, Avaliações farmacodinâmicas, até o Cronograma de tempo e eventos para refeições e questionários de EAV.

p - Na triagem, um teste sérico para gravidez é necessário para todas as mulheres. O teste de urina para gravidez pode ser obtido em todos os outros pontos no tempo.

q - Consulte o manual de laboratório para procedimentos de coleta de amostras e instruções de processamento.

r - Avaliações farmacocinéticas Todas as coletas de sangue para PK precisam ser executadas tão próximo quanto possível do ponto no tempo agendado. Quando um ECG é executado no mesmo ponto no tempo, a amostra para PK precisa ser coletada imediatamente após a conclusão do ECG. Para a Parte 2 (infusão IV), todos os pontos no tempo para coleta são relativos ao final da infusão. O tempo para coleta da amostra farmacocinética pode ser modificado (mas nenhuma amostra adicional será coletada), se indicado pelos dados preliminares de farmacocinética provenientes das uma ou mais doses anteriores.

s - O ponto no tempo 0,5 (= t_0 (final da infusão) só é aplicável para a administração IV na Parte 2.

t - a amostra farmacogenômica (DNA) deve ser coletada no ponto no tempo especificado mas, se necessário, pode ser coletada em um ponto no tempo posterior sem constituir um desvio de protocolo.

u - Eventos adversos e medicamentos concomitantes serão registrados começando após a assinatura do consentimento informado e até o procedimento final do estudo, na visita de fim de estudo. Além disso, eventos adversos serão consultados (usando perguntas não diretivas) ao longo do estudo, nos pontos temporais especificados.

v - Consulte a Tabela 70 no Exemplo 21, Seção 9.6.8, Reação local no sítio de injeção, para obter diretrizes quanto a relatar toxicidade para reações locais no sítio de injeção.

w - Consulte o Exemplo 21, Seção 9.6.7, Reações alérgicas/hipersensibilidades em geral, para obter diretrizes quanto ao manejo de reações alérgicas e/ou de hipersensibilidade.

1. Cronograma de tempo e eventos - ingestão de alimentos e questionários de EAV

Tempo no relógio ^a	0655	0700	0730	0800	0900	1000	1100	1155	1200	1230	1300	1400	1500	1555	1600	1630	1700	1800	1900	1915	1920	1950
Horas em relação à primeira refeição	-5 minutos	Tempo 0 ^b	30 minutos	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	4 horas e 55 minutos	5 horas	5,5 horas	6 horas	7 horas	8 horas	8 horas e 55 minutos	9 horas	9,5 horas	10 horas	11 horas	12 horas	12 horas e 15 minutos	12 horas e 20 minutos	12 horas e 50 minutos
Desjejum ^{c,d,e,f,g}		X																				
Almoço ^{c,d,e,f,g}									X													
Lanche ^{c,d,e,f,g}															X							
Jantar ^{c,d,e,f,g}																					X	
Questionários de EAV para classificações de apetite nos Dias -1 e 3 ^h	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X
Questionários de EAV para classificações de apetite nos Dias 1, 2, 4 e 5 ^{h,i}	X		X			X		X		X	X			X		X			X	X		X
Questionários de EAV para palatabilidade dos alimentos nos Dias -1 a 5 ⁱ		X							X						X						X	

a - O tempo no relógio pode ser ajustado ± 15 minutos, se necessário.

b - O tempo 0 refere-se ao início do desjejum nos Dias -1, 2, 3, 4 e 5, e ao início da primeira refeição após a dose no Dia 1.

c - Todos os indivíduos devem receber suas refeições ao mesmo tempo (± 15 minutos) em todos os dias. O tempo das refeições foi determinado de modo a evitar sobreposição com as medições de ECG no Dia -1, e foi calculado presumindo-se que os ECGs serão conduzidos antes das 7 horas da manhã e, então, às 08:00, 09:00, 11:00, 15:00 e 19:00 (se a dosagem no Dia 1 ocorrer às 07:00), ou às 10:00, 11:00, 13:00, 17:00 e 21:00 (se a dosagem no Dia 1 ocorrer às 09:00).

d - Desjejum, almoço, lanche e jantar devem ser idênticos nos Dias -1 e 3, e devem ser diferentes das refeições administradas nos outros dias.

e - Nos dias -1 e 3, os indivíduos devem estar visualmente isolados uns dos outros ao consumir as refeições, para evitar que sejam influenciados por outros indivíduos.

f - nos dias -1 e 3, cada refeição deve ser consumida dentro de 30 minutos e os indivíduos devem alertar o pessoal do estudo se a refeição estiver concluída antes de 30 minutos. Os horários de início e conclusão da refeição devem ser registrados.

- g - Nos Dias -1 e 3, cada item de cada refeição deve ser pesado antes e depois do consumo, e a quantidade consumida deve ser registrada para subsequente contagem de calorias.
- h - Os questionários de EAV para Classificações de apetite devem ser administrados pouco antes e ao final de cada refeição, a cada hora nos Dias -1 e 3, e a cada 3 horas nos Dias 1, 2, 4 e 5. Para obter detalhes referentes a questionários de EAV para classificações de apetite, consulte o Exemplo 21, Seção 9.3, Avaliações farmacodinâmicas.
- i - No Dia 1, questionários de EAV para Classificações de apetite devem ser administrados começando com a primeira refeição do dia (3 horas após a dose)
- j - Os questionários de EAV para Palatabilidade dos alimentos devem ser completados pelos indivíduos após o primeiro bocado de alimento. Para obter detalhes referentes a questionários de EAV para Palatabilidade dos alimentos, consulte o Exemplo 21, Seção 9.3, Avaliações farmacodinâmicas.

1. Cronograma de tempo e eventos - período como paciente ambulatorial

	Partes 1 e 2								
Período do estudo	Visitas ambulatoriais ^a								
Semana	1	2	3	4	6	8	10	12	
Dias em relação à dose do fármaco em estudo	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 42	Dia 56	Dia 70	Dia 84	Fim de estudo ^h
Avaliações de segurança									
Exame físico completo								X	X
Exame físico breve	X	X	X	X	X	X	X		
Temperatura corporal	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca) ^b	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ECG de 12 derivações	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliações farmacodinâmicas									
Peso corporal	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliações laboratoriais clínicas									
Teste de gravidez (urina)			X			X		X	X
Hematologia, química ^d	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Painel de lipídios (Colesterol total, Triglicerídeos, HDL e LDL) ^d									X
Painel de coagulação ^d	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Urinálise ^d	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Biomarcadores exploratórios									
Coleta de amostra de sangue para biomarcadores exploratórios ^e		X		X		X		X	
Procedimentos de imunogenicidade e farmacocinética									

	Partes 1 e 2								
Período do estudo	Visitas ambulatoriais ^a								
Semana	1	2	3	4	6	8	10	12	
Dias em relação à dose do fármaco em estudo	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 42	Dia 56	Dia 70	Dia 84	Fim de estudo ^h
Coleta de amostra de sangue para farmacocinética (PK) ^{e,f}	X	X	X	X	X	X	X	X	
Coleta de amostra de sangue para anticorpos anti-fármaco (AAF) ^e				X		X		X	
Avaliações de segurança do paciente em andamento									
Relato de eventos adversos & medicações concomitantes ^g	X-----X								
Evento adverso (perguntas não diretas) ^g	X	X	X	X	X	X	X	X	X

a - Visitas ambulatoriais: As visitas devem ser realizadas pela manhã, com o indivíduo em jejum durante ao menos 10 horas (de um dia para o outro) antes dos procedimentos do estudo. Todas as tentativas razoáveis devem ser feitas para conduzir visitas ambulatoriais nos pontos no tempo agendados (isto é, dia específico para cada visita), mas uma janela dentro de ± 1 dia é permitida até a visita da Semana 4 (Dia 28) e uma janela de ± 3 dias é permitida para as visitas ambulatoriais restantes até a Semana 12 (Dia 84). Todas as visitas subsequentes precisam ser agendadas em relação à data da primeira dose do fármaco em estudo (Dia 1) e não à data da visita reagendada anterior.

b - Os sinais vitais devem ser medidos após 5 minutos de repouso em uma posição supina e incluem temperatura timpânica, frequência cardíaca em repouso (FC) e pressão arterial. Se a coleta de amostra de sangue ou a medição dos sinais vitais estiver agendada para o mesmo ponto no tempo que o registro de ECG, os procedimentos precisam ser executados na seguinte ordem: sinais vitais, ECG(s), coleta de sangue. As medições devem ser determinadas com um dispositivo de pressão arterial completamente automatizado. Em todos os pontos no tempo, pressão arterial única e FC serão medidas e registradas.

c - ECGs com 12 derivações: Todos os ECGs serão medidos em triplicata. Os indivíduos devem descansar por ao menos 5 minutos em uma posição supina em um ambiente silencioso sem distrações (por exemplo, televisão, telefones celulares) e devem se abster de falar ou mover braços ou pernas. Os ECGs em triplicata devem ser obtidos com menos de 2 minutos de intervalo em cada ponto no tempo. Quando um ECG é executado no mesmo ponto no tempo, no estudo, que uma amostra PK, a amostra PK deve ser tomada imediatamente após o ECG.

d - Consulte a seção de protocolo 9.6.2, Testes laboratoriais clínicos, para obter uma lista de testes laboratoriais clínicos a serem providenciados; os indivíduos precisam estar em jejum (isto é, sem alimentos ou bebidas [exceto água]) durante ao menos 10 horas antes que o sangue seja coletado.

e - Consulte o manual de laboratório para procedimentos de coleta de amostras e instruções de processamento.

f - Avaliações farmacocinéticas Todas as coletas de sangue para PK precisam ser executadas tão próximo quanto possível do ponto no tempo agendado. Quando um ECG é executado no mesmo ponto no tempo, a amostra para PK precisa ser coletada imediatamente após a conclusão do ECG. Para a Parte

2 (infusão IV), todos os pontos no tempo para coleta são relativos ao final da infusão. O tempo para coleta da amostra farmacocinética pode ser modificado (mas nenhuma amostra adicional será coletada), se indicado pelos dados preliminares de farmacocinética provenientes das uma ou mais doses anteriores.

g - Eventos adversos e medicamentos concomitantes serão registrados começando após a assinatura do consentimento informado e até o procedimento final do estudo, na visita de fim de estudo. Além disso, eventos adversos serão consultados (usando perguntas não diretivas) ao longo do estudo, nos pontos temporais especificados.

h - A visita de fim de estudo precisa ocorrer de 7 a 10 dias após a visita ambulatorial do Dia 84. Para indivíduos que saírem precocemente, a avaliação de fim de estudo deve ocorrer assim que possível após a administração do fármaco em estudo.

1. INTRODUÇÃO

[00292] O fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF15) é um fator de proteína circulante, presente sob a forma de um dímero de 25 kDa no plasma humano. Dados publicados e internos suportam seu papel na regulação do equilíbrio energético afetando principalmente a energia (isto é, a ingestão de alimentos).

[00293] A administração subcutânea (SC) de FP2 resulta em uma redução na ingestão de alimento e na subsequente perda de peso corporal (PC) em roedores e primatas não humanos. Além disso, o tratamento SC com FP2 resulta em uma homeostase de glicose melhorada e alivia a resistência à insulina em camundongos obesos induzidos por dieta (DIO), provavelmente devido à perda de peso corporal. A FP2 exerce seus efeitos mediante a ligação ao receptor GDF15 recentemente identificado, receptor da família GDNF similar a alfa (GFRAL), que é principalmente expresso na área postrema do sistema nervoso central (SNC)^{5,17,24,15}. Existe a hipótese de que a FP2 diminuirá a ingestão de alimento e subsequentemente causará perda de peso corporal em indivíduos obesos, o que também levará a uma melhoria nas comorbidades associadas à obesidade.

1.1. Antecedentes

1.1.1. Estudos não clínicos

Perfil farmacológico

[00294] A potência agonista de FP2 in vitro foi avaliada com o uso de um ensaio pAKT baseado em células, com células SK-N-AS superexpressando de maneira estável o receptor de GFRAL humano. A FP2 ativou o pAKT com uma concentração eficaz máxima (EC₅₀) de $2,908 \pm 0,239$ nM (N= 3)(vide Exemplo 3). O GDF15 nativo serviu como um controle de ensaio e demonstrou atividade agonista com um EC₅₀ de $0,153 \pm 0,008$ nM (N=3).

[00295] A FP2 foi avaliada quanto a sua capacidade para reduzir a

ingestão de alimento em múltiplas espécies. Uma única administração SC de FP2 inibiu de forma aguda a ingestão de alimento em camundongos C57Bl/6 machos (consulte o Exemplo 14) e ratos Sprague-Dawley (SD) (consulte o Exemplo 15). Uma única administração SC de FP2 a macacos cynomolgus com sobrepeso espontâneo e sem tratamento prévio levou à redução da ingestão de alimento e subsequente perda de peso corporal significativa em comparação com animais tratados com veículo até 4 semanas após a dosagem (Exemplo 18).

[00296] A administração repetida de FP2 a cada 3 dias ao longo de um período de 2 semanas diminuiu a ingestão de alimento e o peso corporal, e melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina medidas pelo modelo homeostático para avaliação da resistência à insulina em camundongos DIO (consulte o Exemplo 16). Administrações de FP2 uma vez por semana a uma coorte de macacos Cynomolgus com sobrepeso espontâneo e sem tratamento prévio ao longo de um período de 12 semanas resultaram em uma redução significativa na ingestão de alimento e no peso corporal, em comparação com o tratamento com veículo (consulte o Exemplo 19). Foi observada a perda de exposição em alguns animais em pontos no tempo posteriores, presumivelmente devido ao desenvolvimento de anticorpos antifármaco (AAF). Ao longo do estudo, não foram observados quaisquer efeitos adversos relacionados ao tratamento.

Farmacologia de segurança

[00297] Os pontos finais da farmacologia de segurança (função cardiovascular [CV], respiratória e do sistema nervoso central [SNC]) foram, de acordo com as diretrizes S6(R1) da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), avaliados como parte dos estudos de toxicidade de dose repetida de 4 semanas para Boas práticas de laboratório (BPL) em macacos Cynomolgus (Estudo 8372593) e ratos

SD (Estudo 8371098). Além disso, um estudo de farmacologia de segurança CV independente (Estudo T-2017-044) foi conduzido em macacos *Cynomolgus* instrumentados por telemetria.

[00298] De modo geral, a administração IV e SC de FP2 até as doses mais altas não teve efeitos sobre os pontos finais de teste CV, a temperatura corporal interna, a frequência respiratória e os pontos finais de teste neurológicos ou comportamentais.

Toxicologia

[00299] Estudos de segurança não clínicos (consulte a Tabela 65) foram conduzidos em conformidade com BPL, 21 CFR, Parte 58 e/ou os princípios da OCDE-BPL em países que fazem parte do processo de aceitação mútua de dados da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), e incluem a documentação adequada. O material de teste de FP2 (lote nº CVC_PCM01) usado para os estudos de segurança não clínicos é considerado representativo do material para teste clínico.

Tabela 65: Visão geral dos estudos de toxicidade com FP2

Tipo de estudo	Espécie e Cepa	Método de administração:	Duração	Dose (mg/kg)
Toxicidade de dose repetida	Rato SD	SC (biw)	4 semanas	0, 1, 10, 100
Toxicidade de dose repetida	Macaco <i>cynomolgus</i>	SC /IV (qw)	4 semanas	0, 1, 10, 50

Legenda: biw=duas vezes por semana; IV=intravenosa; qw=uma vez por semana; SQ=subcutânea; SD=Sprague Dawley.

[00300] A administração repetida de FP2 em macacos *Cynomolgus* e ratos SD foi geralmente bem tolerada. Não houve mortalidades e nenhum sinal clínico evidente. Alguns achados (por exemplo, redução na ingestão de alimentos e no peso corporal) são considerados uma consequência do modo de ação pretendido e não são considerados efeitos adversos.

Seleção de espécies relevantes

[00301] Já que a FP2 é uma proteína de fusão totalmente recombinante com domínios tanto de HSA como de GDF15 humano conectados através de um peptídeo curto que consiste em aminoácidos naturais, o programa de toxicologia é projetado principalmente seguindo a diretriz S6(R1), *Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals* (Avaliação de segurança pré-clínica de fármacos derivados de biotecnologia).

[00302] Em termos de determinação de espécies animais relevantes, a porção GDF15 de FP2 é o componente biologicamente ativo, enquanto o componente de HSA serve principalmente, através de sua interação com o receptor Fc neonatal (FcRn), para prolongar a meia-vida e, assim, aumentar a exposição da FP2. O receptor de GDF15 (GFRAL) e o correceptor de sinalização GFRAL (RET) foram identificados recentemente ^{17,24,5,15}.

[00303] A análise de homologia de sequência de aminoácidos *in silico* do componente biologicamente ativo (GDF15), seus receptores (GFRAL e RET), seu componente de extensão de meia-vida (HSA) e o receptor de albumina (FcRn) em diferentes espécies divulgou o grau mais alto de similaridade (95-100%) entre humano e macaco (isto é, macaco cynomolgus) e similaridade razoavelmente alta (78-100%) entre humano e rato (Tabela 66).

Tabela 66: Homologia de sequência entre espécies

Porcentagem de similaridade de sequência para humano		Hu- mano	Cyno*	Porco	Cão	Coe- lho	Rato**	Camun- dongo
Componente ativo	GDF15	100	95,7	78,3	78,3	--	95,7	95,7
Receptores	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
Extensão de meia-vida	Albumina	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

Legenda: Cyno=macaco Cynomolgus; FcRn=receptor Fc neonatal;

GFRAL=receptor da família GDNF similar a α ; RET=correceptor de sinalização GFRAL, espécies não roedoras e **roedoras selecionadas para teste de toxicidade.

[00304] As análises de ligação *in vitro* indicaram a ligação de FP2 às proteínas de fusão GFRAL recombinantes de humano, rato e macaco cynomolgus, com afinidade dentro de uma faixa de 2 vezes entre humanos e macacos cynomolgus, e uma faixa de 5 vezes entre humanos e ratos. Além disso, a análise de expressão tecidual do receptor GFRAL em diferentes espécies divulgou um padrão de expressão comparável (predominantemente na área postrema no cérebro posterior) em ratos, macacos e humanos²⁴.

[00305] Estudos farmacodinâmicos (PD) *in vivo* demonstraram os efeitos hipotetizados da PD (por exemplo, redução na ingestão de alimentos e no peso corporal) de FP2 tanto no macaco Cynomolgus quanto no rato.

[00306] Entretanto, estudos DE PK em dose única também demonstram algumas diferenças significativas na PK entre macaco cynomolgus ($T_{1/2}$: aproximadamente 7 a 9 dias) e rato SD ($T_{1/2}$: aproximadamente 1 a 2 dias) devido à afinidade mais baixa da HSA humana ao receptor FcRn de rato, mas afinidade similar da HSA humana ao FcRn de macaco Cynomolgus.

[00307] Portanto, o macaco cynomolgus é considerado a espécie animal mais relevante/preditiva e foi selecionado como a espécie de não roedor para os estudos de segurança não clínicos que habilitam o primeiro em humanos (FIH). O rato foi selecionado como a espécie toxicológica de roedor com algumas limitações no PK.

Perfil farmacocinético

[00308] O PK e a toxicocinética (TK) de FP2 foram caracterizadas em roedores e em macacos Cynomolgus magros após uma dose única e após administração crônica por até 4 semanas. O tempo médio para atingir a concentração máxima ($T_{m\acute{a}x}$) foi estimado como sendo 1

dia, 1 dia e 1,67 dias para camundongos, ratos e macacos cinomolgus, respectivamente. O clearance (~ 25 e 5 mL/dia/kg em roedores e macacos, respectivamente) e a meia-vida de eliminação ($\sim 1,5$ e $7,1$ dias em roedores e macacos, respectivamente) de FP2 são significativamente diferentes entre macacos e roedores, presumivelmente devido às diferenças na afinidade da HSA ao FcRn de roedor ou de macaco (isto é, a HSA se liga ao FcRn de roedor em afinidade mais baixa do que ao FcRn humano, enquanto a afinidade da HSA ao FcRn de macaco é similar à dos seres humanos). Portanto, os macacos são considerados uma espécie mais preditiva da PK de FP2 em seres humanos do que os roedores. A meia-vida de eliminação prevista para uma pessoa de 90 kg é de aproximadamente 12 a 17 dias.

[00309] Mostrou-se que a FP2 é estável sob a forma de um dímero intacto *ex vivo* em plasma humano durante até 48 horas, e *in vivo* em macacos *Cynomolgus* após a administração SC e IV. Antecipa-se que o metabolismo da FP2 intacta seria através de rotas proteolíticas padrão.

1.1.2. Estudos clínicos

[00310] Esta será a primeira administração de FP2 em seres humanos; portanto, nenhuma experiência clínica está disponível.

Farmacocinética e imunogenicidade em seres humanos

[00311] Nenhum estudo de PK em ser humano foi conduzido com FP2, até o momento.

Estudos de eficácia/segurança

[00312] Nenhum estudo clínico foi conduzido com FP2 até o momento.

2. Objetivos e hipótese

2.1 Objetivos

Parte 1: Escalonamento de doses únicas

[00313] Em indivíduos com sobrepeso ($IMC \geq 25$ a $\leq 29,9$ kg/m²),

de outro modo saudáveis, após doses SC únicas escalonadas de FP2:

Objetivos principais

[00314] Avaliar a segurança e a tolerabilidade de FP2 administrada por via subcutânea (SC).

Objetivos secundários

- Avaliar a PK da FP2.
- Avaliar a imunogenicidade de FP2 em termos de potencial formação de AAF, bem como a possível formação de anticorpos direcionados contra o GDF15 endógeno.
- Avaliar os pontos finais de teste farmacodinâmico (PD), como peso corporal e ingestão de alimentos.

Objetivos exploratórios

- Avaliar se a administração de FP2 está associada a alterações nos pontos finais de teste PD, como classificações de apetite, e a palatabilidade alimentar avaliada com o uso de questionários de escala analógica visual (EAV).
- Avaliar se os níveis endógenos de GDF15 estão associados aos pontos finais de teste de PD.
- Avaliar se a PK de FP2 está associada aos pontos finais de teste de PD.

2.1.2. Parte 2: Biodisponibilidade absoluta

[00315] Em indivíduos com sobrepeso ($IMC \geq 25$ a $\leq 29,9$ kg/m²), de outro modo saudáveis, após uma única dose intravenosa (IV) de FP2:

Objetivo principal

[00316] Estimar a biodisponibilidade SC absoluta de FP2 por meio da administração de uma infusão IV de curto prazo de dose única durante 30 minutos (taxa constante) para indivíduos com idade, sexo e peso corporal correspondentes (correspondentes àqueles indivíduos participando em um dos grupos de doses SC escalonadas anteriores

na Parte 1).

Objetivos secundários

[00317] Avaliar a segurança e a tolerabilidade de FP2 administrada por IV

2.2. Hipótese

[00318] Nenhum teste de hipótese estatística formal está planejado para este estudo, já que o objetivo primário é segurança e tolerabilidade. Todas as outras análises serão exploratórias.

3. DESIGN E BASE LÓGICA DO ESTUDO

Visão geral do design do estudo

[00319] Este estudo é o primeiro em humanos (FIH) para FP2. O estudo tem 2 partes e será conduzido em indivíduos com sobrepeso, de outro modo saudáveis, em um único centro de estudo. A Parte 1 é um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo para avaliar a segurança, a tolerabilidade e a PK de doses SC únicas ascendentes de FP2. A Parte 2 é um estudo aberto de braço único para avaliar a exposição sistêmica e a PK de FP2 administrada como uma infusão IV de curto prazo em dose única durante 30 minutos (taxa constante).

[00320] Planeja-se que um total de até aproximadamente 62 indivíduos com sobrepeso ($IMC \geq 25$ a $\leq 29,9$ kg/m²), de outro modo saudáveis, dos sexos masculino e feminino (sem potencial gravidez), participem deste estudo (Partes 1 e 2). Até aproximadamente 56 indivíduos serão designados aleatoriamente na Parte 1 deste estudo, e aproximadamente 6 indivíduos serão designados na Parte 2.

[00321] Os indivíduos serão triados quanto à elegibilidade entre o Dia -28 e o Dia -3. Os indivíduos qualificados serão admitidos na Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) no Dia -2 e serão submetidos a avaliações de segurança de linha de base. No Dia -1 e no Dia 3, os indivíduos serão submetidos a uma medição da ingestão de alimentos

em 24 horas e completarão questionários de EAV para avaliar as classificações de apetite e palatabilidade alimentar. Os indivíduos receberão o fármaco do estudo no Dia 1 e permanecerão continuamente domiciliados na UPC para avaliações de segurança, tolerabilidade, PK/AAF e PD até a manhã do Dia 5 quando, ao completarem as avaliações do estudo, podem receber alta. Será necessário que os indivíduos retornem à UPC para visitas ambulatoriais nas Semanas 1 (Dia 7), 2 (Dia 14), 3 (Dia 21), 4 (Dia 28), 6 (Dia 42), 8 (Dia 56), 10 (Dia 70), Semana 12 (Dia 84), e uma visita de fim de estudo (7 a 10 dias depois). A duração total do estudo para cada indivíduo será de até aproximadamente 17 semanas.

[00322] Um diagrama do design do estudo é fornecido na Figura 38.

3.1.1. Parte 1: Dose única ascendente

[00323] Até 7 grupos de dose (GDs) de indivíduos com sobrepeso e de outro modo saudáveis (8 indivíduos por GD) serão estudados sequencialmente. Dentro de cada GD, 6 indivíduos serão randomizados para FP2 e 2 indivíduos serão randomizados para o placebo correspondente; dessa forma, a razão entre fármaco ativo e placebo será de 3:1 para cada nível de dose (consulte a Tabela 67). Quatro indivíduos do sexo masculino e 4 indivíduos do sexo feminino (randomizados com 3 ativos para 1 placebo para cada grupo sexual) serão inscritos no primeiro GD na Parte 1, onde se planeja administrar o fármaco do estudo não diluído (isto é, formulação não diluída de 50 mg/mL) para permitir a correspondência dos indivíduos ao grupo de dose IV correspondente na Parte 2 do estudo.

[00324] O esquema de escalonamento de dose planejado para FP2 é descrito na Tabela 67, abaixo. A dose que será administrada durante o estudo tem por base uma abordagem de dose plana calculada para um indivíduo de 80 kg, conforme especificado na coluna "FP2 (mg SC)":

Tabela 67: Níveis de dose de FP2 planejados na Parte 1.

Grupo de dose	FP2 (mg SC)	FP2 (mg/kg)	Placebo correspondente (SC)	Número total de indivíduos por grupo de dose
1	0,8 mg [N=6]	0,01	Placebo [N=2]	N=8
2	2,5 mg [N=6]	0,03	Placebo [N=2]	N=8
3	7,5 mg [N=6]	0,09	Placebo [N=2]	N=8
4	15 mg [N=6]	0,18	Placebo [N=2]	N=8
5	30 mg [N=6]	0,36	Placebo [N=2]	N=8
6	60 mg [N=6]	0,72	Placebo [N=2]	N=8
7	90 mg [N=6]	1,08	Placebo [N=2]	N=8

[00325] Os tratamentos serão duplo-cegos e randomizados em cada nível de dose.

[00326] Para cada nível de dose, os indivíduos serão separados em 4 subgrupos (n=até 2/subgrupo) e dosados em dias diferentes. Dois indivíduos sentinela receberão suas doses simultaneamente primeiro (um com placebo, um com FP2) no mesmo dia, e completarão um período de vigilância de segurança de 72 horas antes que os indivíduos subsequentes no GD possam ser dosados. Após a análise dos dados de segurança, até 2 indivíduos adicionais podem ser dosados (com intervalo de aproximadamente 2 horas) por dia até que todos os indivíduos tenham completado a dosagem. Haverá ao menos 10 dias entre o último indivíduo do grupo anterior e o primeiro indivíduo do GD seguinte.

[00327] Após cada nível de dose concluído, a segurança preliminar e os dados de PK serão analisados pelo Patrocinador e pelo Investigador Principal (IP) para decidir sobre o próximo nível de dose planejado. Cada decisão de aumento de dose será baseada em dados cegos preliminares de segurança, tolerabilidade e PK coletados em todos os indivíduos de um determinado GD durante ao menos 72 horas após a dose. O número mínimo de indivíduos avaliáveis (isto é, indivíduos que concluíram no mínimo os procedimentos de estudo pós-dose de 72 horas) necessários

para a análise de escalonamento de dose será $N = 7$ por GD.

[00328] Nenhuma dose será administrada para a qual as exposições séricas médias projetadas ($C_{\text{máx}}$ ou AUC_{0-48h}) de FP2 excederem as exposições mais baixas sem efeitos adversos observados (NOAEL) dos estudos de toxicologia de BPL de 1 mês nas espécies mais relevantes (isto é, macacos *Cynomolgus*).

3.1.2. Parte 2: Biodisponibilidade absoluta

[00329] A Parte 2 é um estudo aberto de braço único para avaliar a exposição sistêmica e a PK da administração de FP2 sob a forma de uma infusão IV de dose única ao longo de 30 minutos (taxa constante) para indivíduos saudáveis com sobrepeso ($IMC \geq 25$ a $\leq 29,9$ kg/m^2) dos sexos masculino e feminino. Os dados de PK da Parte 2 serão usados para determinar a biodisponibilidade absoluta da forma de dosagem SC de FP2.

[00330] A Parte 2 envolverá 6 indivíduos com sobrepeso ($IMC \geq 25$ a $\leq 29,9$ kg/m^2), de outro modo saudáveis, do sexo masculino ($n=3$) e do sexo feminino ($n=3$). Os indivíduos corresponderão quanto a sexo, idade (± 5 anos) e peso corporal (± 5 kg) a indivíduos de um grupo de dose SC da Parte 1 (provavelmente GD 5; 30 mg, primeiro grupo de dose no qual será usada a formulação de FP2 não diluída de 50 mg/mL). A Parte 2 pode ser iniciada antes da conclusão da Parte 1 do estudo, após o patrocinador e o IP terem analisado os dados cegos preliminares de segurança e tolerabilidade provenientes dos GDs anteriores da Parte 1 do estudo.

[00331] Cada indivíduo elegível na Parte 2 receberá uma dose IV única de FP2 administrada como uma infusão de curto prazo de taxa constante ao longo de 30 minutos através de um cateter permanente em uma veia adequada do antebraço. A dose IV para a Parte 2 será selecionada com base nos dados de segurança preliminar e de PK na Parte 1. A dose IV selecionada não excederá um terço de uma dose já avaliada como

bem tolerada na Parte 1, a fim de levar em conta as diferenças esperadas nos níveis de exposição máximos na administração IV e, possivelmente, a biodisponibilidade incompleta da formulação SC. Para obter detalhes, consulte Seção 3.5, Seleção de dose, Parte 2, do Exemplo 21. Para monitoramento de segurança, 1 indivíduo sentinela será dosado primeiro e completará um período de vigilância de segurança de 72 horas antes que os indivíduos subsequentes possam ser dosados. Os 5 indivíduos restantes serão subdivididos em subgrupos (dosados com intervalo de ao menos 24 horas), de modo que não mais que 2 indivíduos recebam doses a cada dia (com intervalo de aproximadamente 2 horas).

3.2. Base lógica do design do estudo

3.2.1. Considerações gerais sobre o design do estudo

[00332] O estudo proposto é um teste de dose única ascendente (SAD), FIH, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo em indivíduos adultos com sobrepeso e, de outro modo, saudáveis para avaliar a segurança, a tolerabilidade, a PK, a imunogenicidade e a PD (isto é, ingestão de alimentos, peso corporal, classificações de apetite e palatabilidade alimentar) de FP2, um homodímero totalmente recombinante de GDF15 fundido a HSA.

[00333] O estudo foi projetado de acordo com as diretrizes reguladoras pertinentes (EMA Guidance EMEA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1, 2017; FDA Guidance for Industry, 2005) para estudos do tipo primeiro em humanos e outros estudos de desenvolvimento clínico precoce.

[00334] Em relação à segurança sistêmica antecipada, com base nos dados não clínicos disponíveis e nas características farmacológicas, a FP2 não é considerada como sendo uma nova entidade biológica (NBE) de "alto risco", de acordo com os critérios delineados no documento "Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products", da EMA⁴.

[00335] Elementos importantes de design do teste, como a determi-

nação de uma dose de partida segura (com base em dados de nível mínimo de efeito biológico previsto [MABEL], dose farmacologicamente ativa [PAD] e NOAEL), a estratégia de escalonamento de dose e a definição dos critérios de interrupção, satisfazem os padrões e requisitos científicos, médicos e éticos atuais (consulte as Seções 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 do Exemplo 21), e são consistentes com os designs de outros testes de FIH atuais investigando produtos comparáveis com objetivos similares.

[00336] A população de pacientes-alvo é bem definida e será cuidadosamente selecionada com base em um conjunto abrangente de critérios de inclusão e exclusão aplicáveis (consulte a Seção 4 do Protocolo, População de indivíduos). Todos os indivíduos serão monitorados com acompanhamento de segurança regular durante 13 semanas após a dose.

[00337] O estudo é projetado para, e será conduzido em, uma UPC dedicada sob condições de monitoramento médico que garantem uma alta probabilidade para a detecção precoce de eventos adversos e para intervenção terapêutica adequada, se necessário.

3.2.2. Cegamento, controle, fase/períodos do estudo, grupos de tratamento

Parte 1

[00338] Um design de estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo permite a melhor avaliação prática do perfil de segurança e tolerabilidade de FP2, minimizando os potenciais vieses durante a coleta de dados e a avaliação dos pontos finais de teste clínico. Um controle de placebo será usado para a Parte 1 a fim de avaliar a frequência e a magnitude das alterações nos pontos finais de teste clínico que podem ocorrer na ausência de tratamento ativo. A randomização será usada para minimizar vieses na atribuição de indivíduos a grupos de tratamento, para aumentar a probabilidade de que atributos conhecidos e desconhecidos do indivíduo (por exemplo, característi-

cas demográficas e basais) sejam uniformemente equilibrados nos grupos de tratamento.

Parte 2

[00339] A Parte 2 é um design de estudo aberto, de braço único, que fornecerá dados de PK IV independentes de formulação sobre a disposição de FP2 que não podem ser obtidos de outro modo, e serão usados para estimar a biodisponibilidade absoluta (BA) da forma de dosagem de FP2 SC.

3.2.3. População de estudo

[00340] A justificativa para a inscrição de indivíduos com sobrepeso e, de outro modo, saudáveis no estudo é conforme apresentado a seguir:

[00341] A FP2 será administrada pela via SC e as características de absorção de fármaco a partir de tecidos SC (isto é, taxa e extensão de absorção) provavelmente serão diferentes entre diferentes indivíduos (por exemplo, homens vs. mulheres) e populações (isto é, indivíduos magros vs. com sobrepeso vs. obesos). Portanto, o estudo visa determinar a PK humana inicial em uma população relevante para permitir uma predição confiável de PK em dose repetida e seleção de dose em uma população que estará próxima das uma ou mais populações-alvo, antes de expor indivíduos com sobrepeso ou obesos em ensaios de duração mais longa.

[00342] Os riscos a indivíduos com sobrepeso e, de outro modo, saudáveis são considerados comparáveis aos de indivíduos saudáveis magros, uma vez que os critérios de avaliação excluirão indivíduos com condições clinicamente significativas conhecidas por serem mais prevalentes em indivíduos com sobrepeso (por exemplo, DM2, hipertensão);

[00343] A inscrição de indivíduos com sobrepeso e de outro modo saudáveis permite uma avaliação preliminar da segurança da FP2 e

dos efeitos de PD (como ingestão de alimento, peso corporal, classificações de apetite e palatabilidade alimentar) em uma população de indivíduos que é próxima/comparável à população de estudo prevista para ser inscrita na Fase 2.

3.2.4. Farmacocinética e farmacodinâmica

[00344] O tempo e a duração da amostragem de PK neste estudo são baseados nos dados não clínicos de PK, incluindo previsões de modelo alométrico. Usando estas informações, um cronograma frequente de coleta de amostra de sangue permitirá uma caracterização completa do perfil de PK e fornece os dados necessários para definir os principais parâmetros de PK necessários para suportar desenvolvimento clínico adicional.

[00345] Avaliação de vinte e quatro horas da ingestão de alimentos (pré-dose e na $T_{\text{máx}}$ projetada), e monitoramento do peso corporal ao longo do estudo, permitirão a avaliação da redução na ingestão de alimentos (isto é, diminuição na ingestão de calorias, e para possível perda de peso, que poderia ocorrer mediante a administração de FP2 em dose única. A conclusão frequente dos questionários de EAV permitirá uma caracterização de alterações no comportamento do apetite que podem estar associadas à redução na ingestão de alimento e à perda de peso corporal mediante tratamento com administração de dose única de FP2.

3.2.5. Segurança e tolerabilidade

[00346] A maior parte das descobertas registradas nos estudos de BPL para toxicologia por 1 mês em ratos e macacos com FP2 foi considerada como sendo secundária à redução significativa da ingestão de alimento e às perdas de peso corporal observadas, que era a farmacologia alvo hipotetizada para essa classe de fármaco. De modo geral, a FP2 foi considerada bem tolerada nos estudos de toxicologia e não foram observados achados que precisariam de monitoramento especializado.

[00347] Portanto, o monitoramento de segurança nesse estudo

consistirá em avaliações de segurança padrão seriais, como sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica, temperatura corporal), testes clínicos laboratoriais padrão (hematologia, química clínica, urinálise, lipídios, coagulação), exames físicos, monitoramento de sinais emergentes do tratamento e sintomas/eventos adversos [TEAEs] inclusive reações alérgicas/hipersensibilidade e reações locais no sítio de injeção, e a documentação de ECGs seriais padrão de 12 derivações. O monitoramento contínuo de ECG com derivação II também será conduzido na Parte 2.

3.2.6. Imunogenicidade

[00348] Como o potencial imunogênico de uma NBE faz parte de seu perfil de segurança geral, a imunogenicidade potencial de FP2 será monitorada mediante quantificação serial de AAFs, e pela triagem de anticorpos que possam ser formados contra GDF15 endógeno.

3.2.9. Administração IV (Parte 2)

[00349] A Parte 2 do estudo é um estudo aberto de braço único para avaliar a exposição sistêmica e PK da administração de FP2 como uma infusão IV de dose única durante 30 minutos (taxa constante) em indivíduos com sobrepeso e de outro modo saudáveis, com correspondência por idade, sexo e peso corporal a um grupo de referência SC adequado (primeiro grupo de dose na Parte 1 onde o fármaco de estudo não diluído será administrado). A Parte 2 fornecerá dados de PK em IV independentes de formulação sobre a disposição de FP2 que não poderiam ser obtidos de outro modo, e que serão usados para estimar a BA absoluta da forma de dosagem SC de FP2. Seis indivíduos recebendo administrações IV de FP2 na Parte 2 são o número habitual para a estimativa de BA absoluta e para servir como um teste de desempenho para a avaliação de atributos de qualidade farmacêutica da forma de dosagem SC.

3.3. Base lógica da seleção de dose e do escalonamento para a Parte

1

[00350] Um modelo PK/PD de resposta indireta entre a PK de FP2 e a ingestão de alimento, integrado a uma representação fisiológica da relação entre a ingestão de alimento e o peso corporal (PC), foi desenvolvido para caracterizar simultaneamente a PK e o PD (porcentagem de alteração na ingestão de alimentos e no PC em comparação com a linha de base) de FP2 em 3 níveis de dose estudados em um estudo de dose repetida em macacos *Cynomolgus* com sobrepeso (consulte o Exemplo 19). Neste estudo, as reduções na ingestão de alimentos foram máximas da semana 2 para 3, e mostraram atenuação dose-dependente com tratamento sustentado, enquanto o peso corporal declinou continuamente até a semana 4 (no grupo 1 nmol/kg) ou na semana 7 (no grupo 10 nmol/kg) e estabilizou depois disso. Para caracterizar essas observações, um novo modelo PK/PD baseado em fisiologia foi desenvolvido para descrever as alterações induzidas por tratamento tanto na ingestão de alimentos (FI) como no peso corporal (PC) por meio da inclusão dos termos que descrevem as alterações compensatórias na ingestão de alimentos e o gasto energético que ocorrem em resposta à perda de peso. A alteração de PC foi descrita como um efeito longitudinal da alteração na ingestão de alimentos, juntamente com a alteração de gasto de energia ao longo do tempo. Este modelo PK/PD foi capaz de descrever as trajetórias de ingestão de alimento e PC no estudo de 12 semanas, e forneceu uma relação de resposta de exposição para FP2 em macacos *Cynomolgus* com sobrepeso. O termo de ingestão compensatória de alimento dependente de perda de peso corporal no modelo possibilita que os parâmetros para o efeito do fármaco sobre a ingestão de alimento permaneçam constantes ao longo do tempo para uma dada exposição. O modelo semimecanicista desenvolvido em macacos *cynomolgus* possibilitou a

modelagem translacional adicional com base nas relações conhecidas entre a ingestão de energia e as alterações de PC em seres humanos, com os resultados mostrando que para uma determinada porcentagem de redução na ingestão de energia, os seres humanos têm uma maior porcentagem de redução na PC do que os de macacos Cynomolgus. Os resultados da modelagem também suportam quantitativamente os mecanismos de ação de FP2 e a perda de PC é acionada principalmente pela redução da ingestão de alimento induzida por fármaco em macacos Cynomolgus com sobrepeso. Esta abordagem de modelagem foi usada para determinar as doses/exposições clínicas eficazes em seres humanos.

[00351] Presumindo-se que a relação PK/PD de FP2, bem como os parâmetros fisiologicamente relevantes e a biodisponibilidade SC sejam transladáveis entre macacos Cynomolgus e seres humanos com sobrepeso, espera-se que a dose SC preliminar prevista para uma vez por semana, que se espera que confira uma redução de 20% na ingestão de alimento na semana 12, seja de aproximadamente 0,08 mg/kg (~0,5 nmol/kg). Com base na literatura publicada^{13,12,11} e nas simulações de modelo, uma dose que fornece uma redução de 20% na ingestão de alimentos na semana 12 após a dosagem SC uma vez por semana pode corresponder a uma redução de peso maior que 10% após um ano de tratamento.

3.3.1. Justificativa da dose inicial

[00352] A dose inicial para este estudo foi selecionada de acordo com as diretrizes^{3,6} regulamentares pertinentes a primeiros estudos em humanos com base em toxicologia (NOAEL) e dados farmacológicos (PAD).

[00353] A dose NOAEL em ratos e macacos cinomolgos para os estudos de toxicidade de 1 mês foi de 100 mg/kg para o rato e 50 mg/kg para o macaco cynomolgus. As doses equivalentes a seres hu-

manos (HEDs) foram calculadas pela normalização das doses para a área de superfície corporal. O cálculo da dose inicial máxima recomendada (DIMR) usa um fator de segurança padrão de 10 para fornecer uma margem de segurança para proteção de pacientes humanos que recebem a dose clínica inicial.⁶ Conforme refletido nos cálculos de razão de exposição descritos a seguir, com o uso de um fator de segurança de 10, a DIMR para FP2 foi calculada como sendo 1,6 mg/kg de PC. Para uma pessoa com um peso corporal de 80 kg, a dose de DIMR foi calculada como sendo de 128 mg.

[00354] Com base em sua farmacologia, espera-se que a FP2 funcione como GDF15 endógena para reduzir a ingestão de alimento, o que resulta em perda de peso corporal. O mecanismo de ação e o perfil de segurança não clínica da FP2 sugerem que a FP2 não satisfaz os critérios para serem considerados um produto de alto risco.

[00355] Como os resultados do estudo de doses repetidas de macacos cynomolgus mostraram atividade farmacológica (isto é, redução da ingestão de alimentos) em doses muito mais baixas, a DIMR deve ser guiada por uma abordagem baseada em PAD. Para este propósito, os parâmetros PK humanos para FP2 foram previstos por meio de alteração de escala alométrica expoente fixa de parâmetros PK estimados por modelo com base no peso corporal após uma única dosagem SC em macacos cynomolgus com sobrepeso.

[00356] Com base nisso, um modelo de PK/PD da FP2 foi desenvolvido com o uso de dados de PK e PD em 3 níveis de dose estudados em macacos Cynomolgus, e o modelo previu que uma dose SC única de 0,05 mg/kg (~0,3 nmol/kg) resultará em aproximadamente 10% de redução máxima da ingestão de alimento, que é considerada um limiar significativo para indicar atividade farmacológica. Uma vez que o nível previsto de redução da ingestão de alimentos associado a 0,05 mg/kg não é considerado crítico para a segurança dos indivíduos, e não há outros

efeitos de PD críticos de segurança conhecidos, um fator de segurança de 5 (em vez de um fator de segurança padrão de 10) é aplicado à dose estimada por modelo de 0,05 mg/kg. A escolha desse fator de segurança também considera a afinidade, dentro de 2 vezes, de ligação *in vitro* de FP2 com proteínas de fusão GFRAL recombinantes de macaco humano e cynomolgus, bem como um padrão de expressão tecidual comparável do receptor GFRAL em macaco e humano, e leva a um DIMR de 0,01 mg/kg. Como uma abordagem de dosagem plana para um peso corporal de 80 kg será usada neste estudo, a DIMR baseada em PAD foi calculada como sendo 0,8 mg (0,01 mg/kg x 80 kg). Isso indica que o DIMR baseado em PAD é cerca de 160 vezes menor que um DIMR baseado em NOAEL.

[00357] Prevê-se que a DIMR baseada em PAD de 0,01 mg/kg produza uma concentração máxima de fármaco no soro de ~0,6 nM, que é 13 vezes mais alta que os níveis de faixa normal superior de GDF15 endógenos (isto é, ~0,046 nM ou 1,15 ng/mL)², e 5 vezes mais baixo que o nível de GDF15 endógeno médio encontrado em mulheres grávidas sem complicações (isto é, ~3,2 nM ou 80.000 pg/mL).²⁰ Esse valor de concentração, quando corrigido para a diferença em: 1) afinidade de ligação ao receptor GFRAL humano (afinidade de ligação de FP2 reduzida 11 vezes quando comparada com GDF15 endógeno); e 2) diferenças na potência de um ensaio funcional *in vitro* (valores de EC₅₀ reduzidos em ~19 vezes para FP2 vs. GDF15 endógeno no ensaio funcional de pAKT com o uso de células SK-N-AS que expressam rhGFRAL), resulta na previsão de que a concentração máxima prevista de FP2 em seres humanos após uma dose SC única de 0,01 mg/kg está dentro de 1,2 vezes a faixa superior normal de GDF15 endógena em indivíduos magros.

[00358] Além disso, espera-se que a C_{máx} da dose inicial de 0,01 mg/kg seja menor que EC₁₀ da leitura do ensaio funcional de pAKT usando células que expressam rhGFRAL.

3.3.2. Dose máxima

[00359] As doses NOAEL nos estudos de toxicologia de 4 semanas em rato ou macaco cynomolgus resultaram em valores médios de $C_{\text{máx}}$ de 415 $\mu\text{g/mL}$ (Dias de 1 a 4, feminino e masculino) e 1.117 $\mu\text{g/mL}$ (Dia de 22 a 29, feminino e masculino), respectivamente, e valores médios de ASC de 883 $\mu\text{g}\cdot\text{dia/mL}$ (Dia de 1 a 4, masculino e feminino) e 6.341 $\mu\text{g}\cdot\text{dia/mL}$ (Dias de 22 a 29, masculino e feminino), respectivamente. Não foram observadas diferenças aparentes nas exposições médias de fármaco delineadas pelo sexo (avaliadas por $C_{\text{máx}}$ e ASC) e outros parâmetros TK entre macacos cinomolgos machos e fêmeas. Houve uma tendência de que as exposições a fármacos (avaliadas por $C_{\text{máx}}$ e $\text{AUC}_{\text{Dias 1-4}}$ após a primeira dose) nos ratos fêmeas fossem ligeiramente mais altas que nos ratos machos. Prevê-se que a dose máxima de 1,08 mg/kg de PC planejada na Parte 1 produza exposições $C_{\text{máx}}$ e ASC médias que estão aproximadamente 97 a 21 vezes abaixo das exposições $C_{\text{máx}}$ e ASC médias, respectivamente, na dose NOAEL no macaco cynomolgus. Conforme progrida a Parte 1 deste estudo, os dados de PK de cada GD sequencial serão utilizados para simulações que predizem as exposições sistêmicas de FP2 e adicionalmente refinam essas estimativas de exposição. Doses subsequentes podem ser ajustadas com base em uma análise dos dados emergentes de segurança, tolerabilidade e PK, mas não excederão a dose máxima planejada.

[00360] O estudo de segurança CV em macacos Cynomolgus instrumentados não demonstrou quaisquer descobertas significativas até a dose SC mais alta testada de 50 mg/kg e, portanto, não foi considerado como limitando as exposições máximas planejadas sumarizadas acima.

3.4. Escalonamento de dose

[00361] A faixa de dose planejada na Parte 1 permitirá a caracteri-

zação de doses que são antecipadas para fornecer margens de segurança (≥ 10 vezes) a partir de exposições esperadas de doses terapeuticamente eficazes que seriam exploradas em estudos futuros em indivíduos obesos, e levará em conta aumentos potenciais de exposição em populações especiais (por exemplo, indivíduos com insuficiência renal e hepática) e configurações (por exemplo, estudos de interação fármaco-fármaco, estudo completo de QT/QTc, etc.).

[00362] A estratégia de escalonamento de dose proposta segue o conceito de incrementos de dose de ~ 3 vezes para as primeiras 2 etapas de escalonamento de dose até o 3º nível de dose do estudo, quando os níveis de dose precedentes mostraram ser seguros e os níveis de exposição ($C_{\text{máx}}$ e $AUC_{0-72 \text{ horas}}$) exibem aproximadamente PK linear proporcional à dose (ou aumentos de exposição menos que proporcionais). Sob as mesmas disposições, a 3ª, a 4ª e a 5ª etapas de escalonamento de dose para os níveis de dose 4, 5 e 6 consistirão em escalas de dose ~ 2 vezes, enquanto todas as etapas de escalonamento de dose subsequentes (se houver) seriam planejadas com incrementos de dose aproximados de 50% (Tabela 3).

[00363] Após cada nível de dose completado, a segurança preliminar e os dados de PK serão analisados pelo Patrocinador e pelo IP para decidir sobre o escalonamento para o próximo nível de dose planejado. Cada decisão de aumento de dose será baseada em dados cegos de segurança preliminar, tolerabilidade e PK coletados em todos os indivíduos de um determinado grupo de doses durante ao menos 72 horas após a dose e dados de PK preliminares obtidos durante ao menos 72 horas após a dose. O número mínimo de indivíduos avaliáveis (isto é, indivíduos que concluíram no mínimo os procedimentos de estudo pós-dose de 72 horas) necessários para revisão será $N = 7$ por grupo de dose. Quaisquer informações clinicamente relevantes adicionais a partir de 72 horas após a dose até a reunião de revisão será comunicada pelo investigador na

reunião de revisão. Com o progresso do estudo, os dados de segurança cumulativos dos grupos de doses anteriores serão regularmente analisados, bem como parte de cada decisão de escalonamento de dose atendida. As doses planejadas podem ser modificadas, se suportadas por dados preliminares DE PK, segurança e/ou tolerabilidade das uma ou mais doses anteriores, e podem ser reduzidas ou repetidas, mas não aumentadas, a menos que uma alteração substancial ao protocolo do estudo seja emitida e submetida à Autoridade Sanitária (AS) competente e ao Comitê de Ética Independente (CEI).

[00364] Haverá ao menos 10 dias entre o último indivíduo do grupo de dose anterior e o primeiro indivíduo do GD a seguir.

[00365] As doses de NOAEL nos estudos de toxicologia de BPL de 4 semanas em ratos ou macacos cynomolgus serão usadas para guiar o limite superior de exposição alvo neste estudo (para obter detalhes, consulte o Exemplo 21, Seção 3.3.2).

3.5. Seleção de dose, Parte 2

[00366] A intensidade de dose para a Parte 2 será selecionada com base nos dados preliminares de segurança e PK na Parte 1, e não excederá 1/3 de uma dose avaliada como bem tolerada na Parte 1, a fim de fornecer uma margem de segurança de cerca de 3 vezes se a BA da FP2 SC em pacientes humanos com sobrepeso for substancialmente menor que aquela determinada em macacos Cynomolgus magros (BA absoluta mediante doses IV únicas de 1,0 mg/kg 99%). Como os valores de $C_{máx}$ observados mediante a dosagem IV (50 mg/kg de PC) no estudo DE TK de macaco cynomolgus de 4 semanas foram apenas cerca de 2 vezes mais altos que o observado com a administração SC da mesma dose, espera-se que uma redução de 3 vezes de uma dose SC bem tolerada forneça também margens adequadas para uma exposição máxima segura ($C_{máx}$) esperada para uma infusão IV de FP2 com taxa constante ao longo de 30 minutos. Por exemplo, se a dose SC de

30 mg administrada no Grupo de Dose 5 for considerada segura e bem tolerada, a dose IV para a Parte 2 poderia ser selecionada com base neste GD e seria 1/3 de 30 mg ou 10 mg. Isto será baseado na suposição de que a BA absoluta mediante a dose SC em indivíduos com sobrepeso é tão baixa quanto ~33% e, portanto, a intensidade da dose IV de 10 mg irá assegurar que a ASC após a administração IV não excederá a ASC obtida após a administração SC de 30 mg. Uma vez que a BA é calculada a partir da ASC (não $C_{\text{máx}}$) e a suposição DE BA de 33% é conservativa, é provável que a intensidade da dose IV de 1/3 da dose SC produza $C_{\text{máx}}$ (isto é, final da infusão) menor que aquela de 30 mg SC.

3.6. Critérios de interrupção

3.6.1. Critérios individuais de interrupção - Parte 1

[00367] Como a Parte 1 do estudo envolve apenas uma única administração SC de FP2, critérios de parada individuais para o fármaco de estudo (como a interrupção da dosagem) não são aplicáveis. Entretanto, um indivíduo randomizado não receberá o fármaco do estudo se ele/ela for retirado do estudo (consulte o Exemplo 21, Seção 10.2).

3.6.2. Critérios individuais de interrupção - Parte 2

[00368] A infusão IV será descontinuada em caso de EAs medicamente importantes, significando um risco potencial para indivíduos conforme julgado pelo(s) Investigador(s). Tais EAs medicamente importantes incluem - mas não se limitam - aos seguintes achados:

[00369] O indivíduo tem um QT absoluto corrigido, de acordo com a fórmula de Fridericia ($QTcF$) de ≥ 500 ms ou um aumento no $QTcF$ a partir da linha de base de >60 ms em 2 medições sucessivas (com intervalo de 15 minutos) após a primeira ocorrência.

[00370] Indivíduo com taquicardia definida como frequência cardíaca supina em repouso >100 bpm persistindo durante ao menos 15 minutos após a primeira ocorrência com base no monitoramento contínuo da fre-

quência cardíaca.

[00371] Indivíduo com bradicardia definida como frequência cardíaca supina em repouso <45 bpm persistindo durante ao menos 15 minutos após a primeira ocorrência com base no monitoramento contínuo da frequência cardíaca.

[00372] Indivíduo que desenvolveu hipertensão definida como pressão arterial sistólica em repouso (SBP) acima de 180 mmHg e persiste por ao menos 15 minutos após a primeira ocorrência.

[00373] O indivíduo experimenta um evento adverso grave ou sério e o Investigador acredita que, por razões de segurança, é do melhor interesse do indivíduo descontinuar a infusão IV.

[00374] Uma vez descontinuada por uma dessas razões, a administração do fármaco do estudo deve ser considerada definitivamente terminada (isto é, não será reiniciada novamente. Razões para a descontinuação do fármaco do estudo serão documentadas).

3.6.3. Critérios de interrupção do estudo

[00375] A progressão do estudo (dentro de um GD ainda não concluído ou a progressão para um nível de dose mais alto) será mantida em espera se, a qualquer momento:

- 2 indivíduos forem retirados do estudo (independentemente do grupo ou período de dosagem) devido à experiência de qualquer evento adverso medicamente importante ou sério (EAS) avaliado pelo Investigador como possivelmente, provavelmente ou muito provavelmente relacionado ao fármaco em estudo, ou

- 1 indivíduo experimentar um EAS avaliado pelo Investigador como possivelmente, provavelmente ou muito provavelmente relacionado ao fármaco do estudo.

[00376] Um DRC interno, independente da equipe de estudo clínico, pode ser convocado (vide Seção 11.8). O propósito do DRC seria analisar todos os dados de segurança não cegos. Após a conclusão dessa

análise de segurança detalhada, uma das recomendações a seguir seria feita:

Continuar com o estudo conforme planejado (isto é, não há preocupações significativas sobre a segurança).

Continuar com o estudo repetindo a dose atual em mais indivíduos.

Continuar com o estudo em uma dose entre a dose atual e a próxima dose planejada, ou em uma dose entre a dose atual e a dose inferior anterior.

Encerrar o estudo.

4. POPULAÇÃO DE INDIVÍDUOS

[00377] A triagem para indivíduos elegíveis será realizada dentro de 28 dias antes da administração do fármaco do estudo.

[00378] Para ambas as Partes 1 e 2, ao menos 2 indivíduos de reserva adicionais serão admitidos no Dia 2 do período com pacientes internados e serão submetidos a todas as avaliações que levam à dosagem para assegurar que um grupo de dose completo seja randomizado.

[00379] Indivíduos adicionais podem ser inscritos se forem necessárias substituições; cada indivíduo substituto completará todo o estudo para o indivíduo que está substituindo, de acordo com o cronograma de randomização (consulte a Seção 5 do Protocolo, Alocação do fármaco em estudo e cegamento). Nenhum indivíduo pode participar de mais de um grupo de dose ou parte deste estudo. Os indivíduos de reserva podem ser submetidos a nova triagem para participação em um outro grupo de doses no estudo.

[00380] Na Parte 1, quatro homens e 4 mulheres (randomizados como 3 ativos para 1 placebo em cada grupo de sexo) serão inscritos no grupo da primeira dose onde se planeja administrar o fármaco do estudo não diluído (isto é, formulação não diluída de 50 mg/mL) para

permitir a correspondência de indivíduos com o grupo de dose IV correspondente na Parte 2 do estudo.

[00381] Os critérios de inclusão e exclusão para inscrição de indivíduos neste estudo são descritos nas 2 subseções a seguir. Se houver uma pergunta sobre os critérios de inclusão ou exclusão abaixo, o Investigador consultará com o representante adequado do Patrocinador e resolverá quaisquer problemas antes da inscrição de um indivíduo no estudo. Renúncias não são permitidas.

[00382] Para uma discussão das considerações estatísticas da seleção do indivíduo, consulte a seção 11.2, Determinação do tamanho da amostra, no Exemplo 21.

4.1. Critérios de inclusão

[00383] Cada potencial paciente atenderá a todos os seguintes critérios para ser admitido no estudo:

Homem ou mulher

[00384] 18 a 45 anos de idade, inclusive.

[00385] Índice de massa corporal (IMC) entre 25,0 e 29,9 kg/m² (inclusive), e peso corporal ≥80 kg.

[00386] Saudável com base em exame físico, histórico médico, sinais vitais, exames clínicos laboratoriais e ECG de 12 derivações realizado na triagem e na linha de base (Dia -2 e/ou Dia -1). Se qualquer um dos resultados for anormal, o indivíduo pode ser incluído somente se o Investigador julgar que as anormalidades ou desvios do normal não são clinicamente significativos. Essa determinação será registrada nos documentos originais do indivíduo e assinaladas com as iniciais pelo investigador.

[00387] Cada indivíduo precisa assinar um termo de consentimento informado (TCI) indicando que ele ou ela compreende os propósitos e procedimentos necessários para o estudo e que estão dispostos a participar do estudo.

[00388] As mulheres serão sem potencial de gravidez, definido como:

Em pós-menopausa

[00389] Um estado pós-menopausa é definido como nenhuma menstruação por ao menos 12 meses sem uma causa médica alternativa, e um nível de hormônio folículo-estimulante (FSH) na triagem na faixa pós-menopausa (>40 UI/L ou mIU/mL). Entretanto, se o indivíduo tiver tido amenorreia por menos de 12 meses, então 2 medições de FSH (1 pode vir dos registros médicos do indivíduo) são necessárias para confirmar o estado pós-menopausa. Todas as mulheres devem ter um teste de gravidez por gonadotropina coriônica β -humana (hCG) sérica negativa na triagem; e um teste de urina para gravidez negativo na admissão, no Dia -2.

Permanentemente estéril

[00390] Os métodos de esterilização permanentes incluem histerectomia, salpingectomia bilateral, procedimentos de oclusão/ligação bilateral das trompas e ooforectomia bilateral ou, de outro modo, ser incapaz de engravidar, conforme documentado por registros médicos. Todas as mulheres devem ter um teste de gravidez de hCG sérica negativo na triagem; e um teste de urina para gravidez negativo na admissão, no Dia -2.

[00391] Uma frequência cardíaca em repouso (após o indivíduo estar supino durante 5 minutos) entre 50 e 90 batimentos por minuto (bpm). Se a frequência cardíaca estiver fora da faixa, até 2 avaliações repetidas são permitidas.

[00392] Pressão arterial (após o indivíduo estar supino por 5 minutos) entre 90 e 140 mmHg de sistólica, inclusive, e não mais que 90 mmHg de diastólica. Se a pressão arterial estiver fora da faixa, até 2 avaliações repetidas são permitidas.

[00393] Os homens concordarão em usar preservativos (inclusive

homens que tiveram vasectomias) mesmo que sua parceira esteja grávida (isto é para assegurar que o feto não seja exposto ao fármaco do estudo através de absorção vaginal) e não doar espermatozoides durante o estudo e durante 3 meses após a conclusão do estudo. Os indivíduos do sexo masculino devem encorajar sua parceira do sexo feminino a usar um método de contracepção eficaz (por exemplo, contraceptivos orais de prescrição médica, injeções contraceptivas, dispositivo intrauterino, método de barreira dupla e adesivo contraceptivo) além do preservativo usado pelo indivíduo do estudo masculino.

[00394] Dispostos a aderir às proibições e restrições especificadas no protocolo de estudo.

[00395] Os indivíduos gostarão e tipicamente comerão os itens alimentícios que serão fornecidos para avaliação da ingestão de alimentos de 24 horas (pelo menos a entrada principal e um dos pratos laterais dos menus almoço e jantar), e terão um padrão de refeição habitual de 3 refeições principais por dia (café da manhã, almoço e jantar).

[00396] Assinarão um termo de consentimento informado separado se concordarem em fornecer uma amostra de DNA opcional para pesquisa. A recusa em dar consentimento para as uma ou mais amostras de DNA opcional para pesquisa não exclui um indivíduo da participação no estudo.

4.2. Critérios de exclusão

[00397] Qualquer potencial paciente que atenda a quaisquer dos seguintes critérios será excluído da participação no estudo:

[00398] Histórico ou estado atual de doença significativa ou distúrbios médicos, incluindo (mas não se limitando a) doença cardiovascular (incluindo arritmias cardíacas, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica), doença endócrina ou metabólica (por exemplo, diabetes, hiper/hipotireoidismo, hipertrigliceridemia

grave [> 400 mg/dL]), doença hematológica (por exemplo, doença de von Willebrand ou outros distúrbios de sangramento), doença respiratória, doença hepática ou gastrointestinal, doença neurológica ou psiquiátrica, distúrbios oftalmológicos (incluindo distúrbios ou cataratas da retina), doença neoplásica, distúrbio da pele, distúrbio renal ou qualquer outra doença que o investigador considere deve excluir o indivíduo ou que poderia interferir com a interpretação dos resultados do estudo.

[00399] Tratamento cirúrgico anterior para obesidade ou alterações recentes no peso corporal ($\geq 5\%$) devido a dieta, inclusive programas de perda de peso comerciais ou tratamento farmacológico dentro de 6 meses da triagem.

[00400] Histórico de vida de qualquer distúrbio alimentar ou alto risco de distúrbio alimentar (usando o Questionário sobre padrões de alimentação e de peso-5 [QEW-5]²⁵). Consulte a Tabela 1.

[00401] Histórico de vida com malignidade ou histórico familiar de suscetibilidade a malignidades definidas como o mesmo tipo de câncer em ao menos 2 parentes próximos (definidos como pais, irmãos, crianças, avós, tias, tios, sobrinhos, sobrinhas) no mesmo lado da família, ou mais de 1 tipo de câncer em uma única pessoa que é um parente próximo, ou parentes próximos que tiveram câncer em uma idade jovem (< 50 anos de idade), ou um parente próximo com cânceres que ocorrem em ambos dentro um par de órgãos (por exemplo, ambos os rins), ou mais de 1 câncer de infância em irmãos, ou câncer de mama em um parente do sexo masculino, ou câncer que ocorre em muitas gerações (por exemplo, avós, pai, filho) também serão excluídos.

[00402] Histórico de resultados anormais ou positivos para testes de triagem de câncer de rotina (por exemplo, antígeno prostático específico [PSA] para homens, esfregaço de Papanicolau [PAP] ou ma-

mograma para mulheres).

[00403] Síndromes genéticas que predispõem ao câncer (por exemplo, BRCA1 e BRCA2, síndrome de Lynch, síndromes de poliposições familiares, síndrome de Li-Fraumeni e síndromes de neoplasia endócrina múltipla).

[00404] Aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) excedendo o limite superior do normal (LSN) da faixa de referência do laboratório clínico na Triagem ou na admissão no Dia -2.

[00405] Bilirrubina total que exceda o LSN em 1,5 vezes (isto é, 1,5x LSN), para levar em conta níveis de bilirrubina ligeiramente elevados em indivíduos com síndrome de Gilbert (hiperbilirrubinemia não hemolítica de baixo grau congênita inócua devido ao polimorfismo de UGT1A1).

[00406] Hemoglobina, hematócrito ou contagem de eritrócitos abaixo do limite inferior do normal da faixa de referência do laboratório clínico na triagem ou na admissão no Dia -2.

[00407] Glicose sanguínea em jejum anormal (isto é, > 125 mg/dL ou > 6,9 mmol/L; plasma da matriz da amostra de sangue venoso) e/ou hemoglobina A1c (HbA_{1c}) (isto é, > 6,4% [Cromatografia Líquida de alta eficiência] ou > 42 mmol/mol Hb) na Triagem ou no Dia 2. As medições de glicose sanguínea podem ser repetidas durante o período de triagem em caso de suspeita de não conformidade dietária com o período de jejum de um dia para o outro necessário.

[00408] Creatinina sérica acima do LSN da faixa de referência do laboratório clínico na triagem ou na admissão no Dia -2.

[00409] Níveis de hormônio estimulante da tireoide (TSH) fora dos limites normais da faixa de referência do laboratório clínico na triagem.

[00410] Tenha tomado quaisquer terapias não permitidas, Terapias pré-estudo e concomitantes, até 30 dias antes da primeira dose planeja-

da do fármaco do estudo.

[00411] Histórico de abuso de fármacos ou álcool de acordo com os critérios do Manual diagnóstico e estatístico de distúrbios mentais (5a Edição) (DSM-V) dentro de 2 anos antes da Triagem, ou resultados positivos de teste para álcool ou fármacos de abuso (incluindo mas não se limitando a barbituratos, opiatos, cocaína, canabinóides, anfetaminas e benzodiazepinas) na Triagem ou na admissão no Dia - 2.

[00412] Alergias, hipersensibilidade ou intolerância conhecidas a qualquer um dos excipientes de FP2 (consulte IB, Seção 2.3, Informações de formulação).

[00413] Tenha doado sangue ou produtos sanguíneos (aproximadamente 450 mL) ou tenha perdido uma quantidade significativa de sangue dentro de 2 meses antes da primeira administração da fármaco de estudo.

[00414] Tenha recebido um fármaco investigacional (incluindo vacinas de investigação) ou usado um dispositivo médico investigacional invasivo dentro de um mês ou dentro de um período menor que 10 vezes a meia-vida do fármaco, o que for mais longo, antes da primeira dose planejada do fármaco do estudo.

[00415] Grávida ou lactante ou que planeje engravidar enquanto inscrita neste estudo ou dentro do período de 12 dias após a última dose do tratamento do estudo

[00416] Um homem que planeje ser pai de uma criança enquanto estiver admitido neste estudo ou no período de 12 meses após a última dosagem do fármaco do estudo.

[00417] Histórico de antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) ou anticorpo da hepatite C (anti-HCV) positivo, ou outra doença hepática clinicamente ativa, ou testes positivos para HBsAg ou antiHCV na Triagem.

[00418] Apresentar histórico de anticorpo positivo contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou testes positivos para HIV na Triage

[00419] Tenha passado por cirurgia de grande porte (ou seja, que exige anestesia geral) em 4 semanas antes da dosagem, ou que não tenha se recuperado completamente da cirurgia, ou que tenha cirurgia programada durante o período em que o indivíduo espera participar do estudo ou em 4 semanas após a última dosagem de administração do fármaco do estudo. Nota: Indivíduos com procedimentos cirúrgicos programados para serem conduzidos sob anestesia local podem participar se forem aprovados pelo Investigador.

[00420] O indivíduo fuma cigarros (ou equivalente) e/ou usou produtos à base de nicotina dentro de 3 meses antes da administração do fármaco do estudo ou tem um teste positivo para cotinina na triagem ou na admissão no Dia -2.

[00421] Bebe, em média, mais de 1.200 mL (isto é, 5 xícaras, volume total combinado) de chá/café/cacau/cola/ bebidas cafeinadas (por exemplo, bebida energética) por dia.

[00422] Indivíduos que sejam veganos ou vegetarianos, tenham alergias alimentares ou intolerâncias alimentares.

[00423] Problemas psicológicos e/ou emocionais, que tornariam o consentimento informado inválido ou limitariam a capacidade do indivíduo de cumprir os requisitos do estudo.

[00424] O indivíduo não consegue ou não quer ser submetido a múltiplas venopunções devido à baixa tolerabilidade ou à falta de fácil acesso às veias.

[00425] Apresentar qualquer condição para a qual, na opinião do investigador, a participação não seria do melhor interesse do indivíduo (por exemplo, comprometimento do bem-estar) ou que possa impedir, limitar ou confundir as avaliações especificadas no protocolo

[00426] Funcionários do Patrocinador, do Investigador ou do cen-

tro de estudo, com envolvimento direto no estudo proposto ou em outros estudos sob a direção do investigador ou centro de estudo, bem como membros da família dos funcionários ou do Investigador ou Patrocinador.

[00427] O indivíduo que viva em uma instituição sob ordem de um tribunal ou autoridade.

[00428] Selecionado aleatoriamente em um grupo de doses anteriores deste estudo.

4.3. Proibições e restrições

[00429] Adicionalmente, potenciais pacientes estarão dispostos e serão capazes de aderir às seguintes proibições e restrições durante o curso do estudo, para serem elegíveis para a participação:

[00430] Concordar em seguir todos os requisitos que serão atendidos durante o estudo, conforme observado nos critérios de inclusão e exclusão (por exemplo, requisitos contraceptivos).

[00431] Exercício extenuante pode afetar as avaliações especificadas pelo estudo e os resultados laboratoriais de segurança; por essa razão, exercícios vigorosos (por exemplo, corrida de longa distância de 5 km/dia, levantamento de peso, ou qualquer atividade física à qual o indivíduo não esteja acostumado) devem ser evitados começando três (3) dias antes da triagem, ao longo do estudo, e até a conclusão da visita de fim do estudo.

[00432] Os indivíduos serão instruídos a evitar doar sangue durante ao menos 3 meses após o término do estudo (isto é, a visita de fim do estudo).

[00433] Não é permitido o consumo de álcool ou produtos contendo álcool desde ao menos 24 horas antes da triagem e antes da admissão na UPC no Dia -2 até o final do período de internação no Dia 5, e pelo menos 24 horas antes de todas as outras visitas clínicas ambulatoriais. Durante os dias restantes do estudo, o consumo de álcool deve ser limi-

tado a uma quantidade máxima de 24 gramas por dia em homens (isto é, 0,5 L de cerveja/dia ou 0,25 L de vinho/dia ou 3 copos [2 cL por copo] de destilado/dia) e 12 gramas por dia em mulheres (isto é, 0,25 L de cerveja/dia ou 0,125 L de vinho/dia ou 1,5 copos [2 cL por copo] de destilado/dia para mulheres).

[00434] Os indivíduos não podem consumir nenhum alimento ou bebida contendo suco de toronja, laranja-da-terra (inclusive qualquer geleia de laranja) ou quinina (por exemplo, água tônica) a partir de 48 horas antes do Dia 1 até o Dia 5, o final do período de internação.

[00435] Os indivíduos absterão do uso de quaisquer produtos contendo metilxantina (por exemplo, barras ou bebidas de chocolate, café, chás, colas ou bebidas energéticas) a partir de 48 horas antes da administração do fármaco em estudo no Dia 1 e até o Dia 5. Em outros dias entre Triagem e a visita de acompanhamento, os indivíduos serão instruídos a não beber, em média, mais de 1.200 mL de chá/café/cacau/cola (5 xícaras, volume total combinado) por dia.

[00436] Os indivíduos serão instruídos a se absterem do consumo de sementes de papoula por ao menos 72 horas antes da admissão ao UPC, uma vez que isso pode interferir com a triagem de fármacos.

[00437] Não é permitido fumar cigarros (ou equivalente) e/ou usar produtos à base de nicotina a partir de 3 meses antes da administração do fármaco em estudo até a conclusão da visita de final do estudo.

[00438] Os indivíduos não consumirão quaisquer alimentos ou bebidas além daqueles fornecidos pela equipe do local de estudo durante a fase em clínica.

[00439] Concordearão em seguir os requisitos contraceptivos, conforme observado nos critérios de inclusão. Não há informações sobre o efeito da FP2 sobre o esperma ou sua produção no corpo, nem há informações sobre os efeitos sobre o desenvolvimento do feto. É importante que o indivíduo e os parceiros do indivíduo não engravidem duran-

te o estudo ou até 3 meses após o estudo. Os indivíduos precisam informar ao Investigador se seu parceiro engravidar durante o estudo ou nos 3 meses após o término do estudo (isto é, a visita de fim do estudo).

5. ALOCAÇÃO DO FÁRMACO EM ESTUDO E CEGAMENTO

Parte 1

[00440] Todos os indivíduos que permanecerem elegíveis para participação no estudo serão randomizados antes da administração do fármaco em estudo no Dia 1. Um cronograma de randomização gerado por computador será fornecido pelo Patrocinador e retido na farmácia da UPC.

[00441] Dentro de cada GD, os indivíduos serão aleatoriamente designados para tratamento ativo (FP2) ou placebo, com base em um cronograma de randomização gerado por computador e preparado antes do estudo pelo, ou sob a supervisão do, Patrocinador. A randomização será equilibrada com o uso de blocos aleatoriamente permutados. Dentro de cada GD, um total de 6 indivíduos receberá FP2 e 2 indivíduos receberão placebo. Para o GD na Parte 1 que será correlacionado com a Parte 2, 4 mulheres e 4 homens serão inscritos, com uma randomização de 3:1 (3 FP2 e 1 placebo) para cada grupo de sexo.

[00442] Para cada GD, os indivíduos serão separados em 4 subgrupos (n=até 2/subgrupo) e dosados em dias diferentes. No Dia 1 em cada GD, o primeiro subgrupo (grupo sentinela) de 2 indivíduos será designado aleatoriamente para FP2 ou placebo em uma razão de 1:1, e será administrado aproximadamente ao mesmo tempo no mesmo dia para permitir a avaliação de segurança e tolerabilidade até 72 horas. Quaisquer EAs relatados/observados nos indivíduos dosados no primeiro subgrupo que possam afetar a dosagem dos indivíduos restantes no GD serão comunicados ao Patrocinador antes

da randomização e dosagem de indivíduos adicionais. Os 6 indivíduos restantes (1 placebo, 5 FP2) serão aleatoriamente atribuídos a FP2 ou placebo em uma razão de 5:1 (5 FP2 e 1 placebo). Após os indivíduos sentinela terem sido dosados, em cada GD, os 6 indivíduos restantes receberão suas doses ao longo de aproximadamente 3 dias (com intervalo de ao menos 24 horas) em grupos de 2 (dosagem com intervalo de aproximadamente 2 horas).

[00443] Um farmacêutico não cego na UPC preparará doses individuais do fármaco em estudo do indivíduo de acordo com o cronograma de randomização e irá aplicar um marcador cego antes da dispensação e mascarar a seringa de injeção para evitar que o cegamento seja acidentalmente desfeito pela cor da solução. A administração do fármaco em estudo será feita por pessoal do estudo não envolvidos em quaisquer avaliações de segurança do estudo. O Investigador será dotado de um código de randomização lacrado para cada indivíduo, contendo detalhes codificados do fármaco em estudo. Esses códigos lacrados serão mantidos juntos em uma área de acesso limitado, que é acessível 24 horas por dia. Todos os códigos de randomização, abertos ou lacrados, serão coletados após o final da participação do indivíduo no estudo.

[00444] Os dados que possam potencialmente desfazer o cegamento quanto à atribuição do fármaco em estudo (isto é, concentrações séricas do fármaco em estudo, dados de anticorpos antifármaco contra FP2, dados de preparação/responsabilidade do fármaco em estudo, alocação de tratamento) serão manuseados com cuidado especial para assegurar que a integridade do cegamento seja mantida e o potencial para viés seja minimizado. Isso pode incluir a produção de disposições especiais, como segregar os dados em questão da vista pelos investigadores, a equipe clínica ou outros, conforme adequado, até o momento em que a base de dados seja bloqueada e o cegamen-

to seja desfeito. Qualquer acesso da equipe local ou do estudo aos dados de PK será anonimizado (isto é, apenas dados em nível de grupo e/ou números de indivíduos fictícios atribuídos, se forem dados participante individual).

[00445] Em circunstâncias normais, o cegamento não deve ser desfeito até que todos os indivíduos tenham concluído o estudo e a base de dados tenha sido finalizada. Caso contrário, o cegamento quanto a um participante individual do estudo deve ser desfeito apenas se um tratamento de emergência/curso de ação específico for ditado pelo conhecimento do status de tratamento do indivíduo. Em tais casos, o investigador poderia, em uma emergência, determinar a identidade do fármaco em estudo entrando mediante a abertura do código lacrado. É recomendado que o Investigador entre em contato com o patrocinador ou seu representante, se possível, para discutir a situação específica, antes de desfazer o cegamento. O contato por telefone com o patrocinador ou seu representante estará disponível 24 horas por dia, 7 dias por semana. Caso o cegamento seja desfeito, o patrocinador será informado o mais rápido possível. Data, hora e razão para desfazer o cegamento serão documentadas no documento de origem.

[00446] Os indivíduos que tenham o cegamento de sua atribuição de fármaco em estudo desfeito devem continuar a retornar para as avaliações programadas.

[00447] Em geral, os códigos de randomização serão completamente divulgados apenas quando o estudo estiver concluído e a base de dados clínicos tiver sido travada. Entretanto, para revisão de DRC não cega, os códigos de randomização e, se necessário, a tradução de códigos de randomização em grupos de tratamento e placebo será divulgada àqueles autorizados.

Parte 2

[00448] Como a Parte 2 é de rótulo aberto com um único tratamen-

to, e todos os indivíduos receberão a mesma dose IV de FP2, nenhuma randomização ou outra disposição especial é necessária à atribuição de tratamento.

[00449] Os indivíduos serão selecionados para corresponder a participantes individuais do grupo de dose SC de referência da Parte 1 do estudo, quanto a sexo, idade (± 5 anos) e peso corporal (± 5 kg).

Partes 1 e 2

[00450] Para ambas as Partes 1 e 2, e para cada GD, ao menos 2 indivíduos de reserva adicionais serão admitidos no Dia -2 e serão submetidos a todas as avaliações levando à dosagem para assegurar que um grupo de dose completo seja randomizado.

[00451] Os números de randomização serão atribuídos sequencialmente aos indivíduos elegíveis começando com 1001 na Parte 1 e 3001 na Parte 2. Indivíduos adicionais podem ser inscritos como substitutos para assegurar que, na Parte 1, ao menos 7 indivíduos por grupo de dose completem no mínimo os procedimentos de estudo de 72 horas pós-dose e, na Parte 2, que 6 indivíduos completem os procedimentos de estudo por um tempo equivalente a pelo menos 2 meias-vidas de FP2 (determinado com base nos dados de PK de grupos de dose anteriores na Parte 1). Os indivíduos substitutos assumirão o mesmo tratamento dos indivíduos que estão substituindo e receberão um novo número de randomização que será igual ao número de randomização do indivíduo sendo substituído, mas o primeiro dígito será substituído por um '2' na Parte 1 e um '4' na Parte 2. Por exemplo, o indivíduo 1004 será substituído pelo indivíduo 2004 na Parte 1 e o indivíduo 3006 será substituído pelo indivíduo 4006 na Parte 2. Na Parte 2, todos os indivíduos receberão FP2 de maneira aberta.

6. DOSAGEM E ADMINISTRAÇÃO

6.1 Fármaco em estudo

[00452] A FP2 é fornecida sob a forma de uma solução estéril para injeção que será armazenada a -40 °C e protegida da luz. A solução tem aparência castanho-amarelada e tem uma concentração de FP2 de 50 mg/mL em 10 mM de fosfato de sódio, 8% de sacarose e 0,04% de polissorbato 20, a um pH de 6,5. A FP2 é fornecida congelada em frascos de vidro R2 com um volume de preenchimento de 1,2 mL (Tabela 68).

[00453] O tampão de formulação usado na formulação de FP2 será fornecido para este estudo para também ser usado como a formulação de placebo e como um diluente na preparação das doses iniciais de FP2 SC (GD 1 a GD 4). Ela é uma solução estéril transparente que consiste em fosfato de sódio 10 mM, 8,0% de sacarose e 0,04 % de polissorbato 20. O tampão de formulação será usado para preparar as injeções de placebo. O tampão de formulação é fornecido congelado em frascos de vidro R2 com um volume de preenchimento de 1,2 mL.

Tabela 68: Descrição dos fármacos em estudo

Composto ativo:	FP2
Formas de dosagem	Solução de 50 mg/mL para injeção SC e infusão IV de curto prazo.
Diluente:	Tampão de formulação contendo 10 mM de fosfato de sódio, 8,0% de sacarose e 0,04% de polissorbato 20.
Concentrações:	Para as administrações SC, a formulação de FP2 será reconstituída com um volume adequado de tampão de formulação para preparar diluições de 0,5 mg/mL (GD 1), 5,0 mg/mL (GD 2 e GD 3) e 10,0 mg/mL (GD 4); a formulação de 50 mg/mL não diluída também será usada (GD 5, GD 6, GD 7). Para a administração IV, a formulação de FP2 será reconstituída com um volume adequado de tampão de formulação para preparar uma diluição de 10,0 mg/mL.
Placebo (Parte 2):	Tampão de formulação contendo 10 mM de fosfato de sódio, 8,0% de sacarose e 0,04% de polissorbato 20.

[00454] Devido à diferença de aparência entre o produto farmacêutico FP2 (solução castanho-amarelada) e o placebo (solução límpida e incolor), o farmacêutico não cego seguirá as instruções no Manual de manuseio do produto medicinal investigacional (IMP) para manter o cegamento do estudo e evitar a visualização do produto pelo pessoal do estudo e indivíduos na Parte 1.

[00455] Instruções detalhadas para preparo da dose, procedimentos de dosagem e condições de armazenamento do fármaco do estudo serão fornecidas separadamente ao local do estudo em um documento de orientação adicional.

Dosagem da parte 1:

[00456] O fármaco do estudo será administrado pela equipe local designada, treinada e qualificada, que é independente da equipe do estudo e não estará envolvida em nenhum outro aspecto da conduta do estudo clínico. Após um jejum de um dia para o outro de ao menos 10 horas, o fármaco do estudo (FP2 ou placebo) será administrado usando seringas de insulina de 1,0 mL (GD 1, GD 2 e GD 5) ou seringas de 2,0 mL (GD 3, GD 4, GD 6 e GD 7) como uma dose SC única (volume máximo de 2 mL) no quadrante inferior direito do abdômen no Dia 1. Para cada grupo de dose, os indivíduos serão separados em 4 subgrupos (n= até 2/subgrupo) e dosados em dias diferentes. Dois indivíduos sentinela receberão suas doses primeiro (1 placebo, 1 FP2) no mesmo dia, aproximadamente no mesmo horário, e completarão um período de vigilância de segurança de 72 horas antes que os indivíduos subsequentes no GD possam receber suas doses. Após a análise dos dados de segurança cegos, até 2 indivíduos adicionais podem receber doses por dia, de maneira escalonada (com intervalo de aproximadamente 2 horas, com um indivíduo recebendo a dose às ~7:00 e um indivíduo recebendo a dose às ~9:00) até que todos os indivíduos no grupo de dosagem tenham completado a dosagem.

[00457] O tempo zero (0) é o tempo de injeção do fármaco de estudo.

[00458] Todas as injeções SC serão feitas na parede abdominal anterior evitando a área de 2 polegadas (~ 5 cm) ao redor do umbigo. Antes de qualquer injeção, o pessoal do local responsável inspecionará/apalpará o local de injeção planejado. As injeções não devem ser aplicadas em uma área da parede abdominal avaliada como anormal.

[00459] Um médico experiente e treinado em medicina de emergência, bem como equipamentos de emergência (inclusive medicamentos prontos para uso para o tratamento de anafilaxia), estarão imediatamente disponíveis na sala de administração, o tempo todo, durante a administração do fármaco em estudo.

Dosagem da parte 2:

[00460] Uma dose única de FP2 será administrada como uma infusão de taxa constante ao longo de 30 minutos com o uso de um dispositivo de infusão automático (Braun Perfusor® Compact S ou dispositivo equivalente) por meio de um cateter permanente em uma veia adequada do antebraço, através de uma linha separada com o uso de um conjunto de administração com um filtro. A dosagem será realizada aproximadamente na mesma hora a cada dia, mas de forma desalinhada (um indivíduo por dia às ~7:00 e um indivíduo às ~9:00 horas da manhã). Dois indivíduos sentinela receberão suas doses primeiro, e os próximos 2 indivíduos receberão suas doses ao menos 24 horas após os dois indivíduos sentinela receberem suas doses, seguidos pelos últimos 2 indivíduos a serem tratados ao menos 24 horas depois. Um indivíduo sentinela será dosado primeiro e completará um período de vigilância com segurança de 72 horas antes que os indivíduos subsequentes possam ser dosados. Os 5 indivíduos restantes serão subdivididos em subgrupos (dosados com intervalo de ao menos 24 horas), de modo que não mais que 2 indivíduos recebam doses a cada dia (com intervalo de aproximadamente 2

horas).

[00461] O tempo zero (0) é o tempo de início da infusão IV do fármaco de estudo.

[00462] Como nenhuma comparação de placebo é prevista para a administração IV de FP2, nenhuma medida para a ocultação do fármaco de estudo é necessária.

[00463] Um médico experiente e treinado em medicina de emergência, bem como equipamentos de emergência (inclusive medicamentos prontos para uso para o tratamento de anafilaxia), estarão imediatamente disponíveis na sala de administração, o tempo todo, durante a administração do fármaco em estudo.

[00464] Pode haver problemas técnicos, exigindo interrupção temporária da administração do fármaco do estudo (por exemplo, falha do cateter permanente e necessidade de colocação de um novo). Nesse caso, a infusão pode ser reiniciada assim que possível, e o tempo de interrupção e a respectiva razão devem ser documentados.

7. ADESÃO AO TRATAMENTO

[00465] O fármaco do estudo será administrado como uma injeção SC (Parte 1) ou como uma infusão IV (Parte 2) por pessoal qualificado do local do estudo e os detalhes de cada administração serão registrados no sistema eletrônico de coleta de dados, conforme aplicável [Parte 1 SC: data da injeção, horário de injeção, volume da dose injetado, sítio de injeção; Parte 2 IV: horários de início e de parada da infusão IV e volume infundido].

8. TERAPIA ANTERIOR E CONCOMITANTE AO ESTUDO

[00466] Terapias anteriores ao estudo administradas até 30 dias antes da primeira dose do fármaco de estudo serão registradas. Ao longo do estudo, nenhuma terapia (medicamentos com prescrição ou de venda liberada, inclusive vacinas, vitaminas, suplementos minerais, suplementos nutricionais, suplementos herbais [inclusive erva de São João, extrato

de alho e chás herbais]) é permitida dentro dos 30 dias anteriores à primeira dose planejada do fármaco em estudo e durante o estudo, exceto paracetamol. Se for necessário que um indivíduo receba medicamentos de prescrição ou de não prescrição durante o estudo, um indivíduo pode ser inscrito ou continuar no estudo com o acordo e a aprovação pelo patrocinador (ou designado) e pelo Investigador Principal.

[00467] Se a administração de qualquer terapia concomitante se tornar necessária, ela será relatada na seção adequada do formulário de relatório de caso eletrônico (eCRF). As informações registradas incluirão uma descrição do fármaco, duração do tratamento, regime de dosagem, via de administração e sua indicação.

[00468] O uso de paracetamol é permitido até 3 dias antes de cada administração do fármaco em estudo. Ao longo do estudo, um máximo de três doses por dia de 500 mg de paracetamol, e não mais que 3 gramas por semana, serão permitidas para o tratamento de dor de cabeça ou outra dor.

[00469] Terapias concomitantes serão registradas ao longo do estudo começando com o início da primeira dose do fármaco do estudo até a visita de fim do estudo. Terapias concomitantes também precisam ser registradas além da visita de fim do estudo, apenas em conjunto com eventos adversos novos ou piora e eventos adversos graves que satisfaçam os critérios.

9. Avaliações do estudo

9.1. Procedimentos do estudo

9.1.1. Visão geral

[00470] O Cronograma de Tempo e Eventos resume a frequência e o tempo de PK, imunogenicidade, PD, biomarcador exploratório, farmacogenômica e medições de segurança aplicáveis a este estudo.

[00471] A temporização das refeições e dos questionários de EAV é especificada no cronograma das refeições e dos questionários DE

EAV.

[00472] Se múltiplas avaliações estiverem agendadas para o mesmo ponto no tempo, e/ou se uma ou mais avaliações estiverem agendadas para o mesmo horário que uma refeição, recomenda-se que os procedimentos sejam executados na seguinte sequência: sinais vitais, ECG, PK, coleta de sangue, questionários EAV para classificações de apetite, refeição, e questionários EAV para palatabilidade do alimento (após o primeiro bocado de alimento). As coletas de sangue para avaliações de PK devem ser mantidas tão próximas quanto possível do tempo especificado. Quando um ECG precisa ser executado no mesmo ponto no tempo que a PK, a amostra para PK precisa ser coletada imediatamente após a conclusão do ECG. Outras medições podem ser feitas mais cedo que os pontos no tempo especificados, se necessário. A ordem de múltiplas avaliações no mesmo ponto no tempo precisa ser a mesma ao longo do estudo. As datas e os horários das avaliações reais serão registrados na documentação de origem e no formulário eCRF.

[00473] Os sinais vitais (isto é, pressão arterial [PA], frequência cardíaca [FC]) devem ser registrados do braço oposto a partir do qual as amostras de sangue estão sendo tomadas, quando for exequível (exceto durante o tempo de infusão IV).

[00474] O teste de gravidez será realizado em todas as mulheres na triagem e ao longo do estudo. Um teste sérico de gravidez pode ser realizado na triagem e o teste de gravidez de urina será obtido em todos os outros pontos no tempo no Cronograma de Tempo e Eventos.

Tabela 69: Volume de sangue a ser coletado de cada indivíduo (parte 1 e parte 2 do estudo)

Tipo de amostra	Volume aproximado por amostra (mL)	Número de amostras por indivíduo	Volume aproximado total de sangue (mL) ^a
Laboratórios de segurança			
- Hematologia	3	14	42
- Química clínica	5	14	70
- Coagulação	3	14	42
- Painel de lipídios	3	5	15
Química sérica ^b	5	1	5
- Sorologia (HIV, hepatite)			
- Teste de gravidez com β -hCG sérico ^c	5	1	5
TSH	3	1	3
FSH ^c	3	1	3
HbA1c	3	1	3
Amostras de farmacocinética	3	20	60
Imunogenicidade	7,5	4	30
Amostras exploratórias de biomarcador	3	9	27
Amostra de farmacogenômica ^d	10	1	10
Total aproximado ^e			315

^a Calculado como o número de amostras multiplicado pela quantidade de sangue por amostra.

^b A química sérica inclui testes de sorologia (HBsAg, anticorpo anti-HCV, anticorpos para HIV 1 e 2) e gravidez de β -hCG sérico.

^c Apenas em indivíduos do sexo feminino.

^d Uma amostra de sangue será coletada apenas de indivíduos que se consentiram fornecer uma amostra de DNA opcional para pesquisa.

^e Amostras repetidas ou não programadas podem ser coletadas por razões de segurança ou problemas técnicos com as amostras. Nota: Uma cânula IV permanente pode ser usada para coleta de amostra de sangue. [Se for usado um obturador, a perda de sangue devido ao descarte não é esperada.]

[00475] Esses volumes podem ser ajustados nos manuais de laboratório finais desde que a quantidade máxima de sangue coletado de cada indivíduo neste estudo não exceda 500 mL (permitindo alterações no tamanho ou disponibilidade do tubo de coleta de sangue). Amostras de

sangue adicionais podem ser coletadas, se necessário, para avaliações adicionais de segurança, imunogenicidade ou PK com base nos dados emergentes, mas o volume de sangue total coletado de um indivíduo durante este estudo não excederá a quantidade estabelecida neste protocolo do estudo sem aprovações anteriores do Comitê de Ética Independente (CEI) e autoridade sanitária. Amostras repetidas ou não programadas podem ser tomadas por razões de segurança ou por questões técnicas com as amostras que não exigem aprovação prévia de IEC e autoridade sanitária.

[00476] Para cada indivíduo, a quantidade máxima de sangue coletado neste estudo não excederá 500 mL. O volume total de sangue a ser coletado de cada indivíduo será de aproximadamente 315 mL.

9.1.2. Período de triagem (partes 1 e 2)

[00477] Potenciais pacientes serão vistos para uma visita de triagem dentro de 28 dias antes da administração do fármaco do estudo no Dia 1 para determinar a elegibilidade dos indivíduos para participação do estudo. Se o indivíduo atender aos critérios para inscrição, ele/ela será admitido(a) na UPC no Dia -2.

[00478] Antes da realização de qualquer procedimento do estudo, o investigador (ou pessoa designada do estudo) irá rever e explicar o TCI escrito para cada indivíduo. Nenhum procedimento de estudo (incluindo jejum para testes laboratoriais de estudo) pode ser realizado até que o indivíduo assine o TCI. Para visitas de triagem, todas as avaliações relatadas pelo indivíduo devem ser conduzidas antes de quaisquer testes, procedimentos ou consultas para interromper indivíduos que não satisfaçam nenhum desses critérios de entrada.

[00479] O Investigador (ou equipe de estudo designada) também irá analisar e explicar o TCI escrito para amostras de pesquisa genética opcionais antes da amostragem de sangue para farmacogenômica.

[00480] Todos os eventos adversos, sejam graves ou não graves,

serão relatados a partir do momento em que um formulário de consentimento informado assinado e datado é obtido até o último procedimento de estudo no fim da visita de estudo, e também por questionamento direto em pontos de tempo específicos. (Consulte o Cronograma de tempo e eventos.)

[00481] A retestagem de valores anormais que poderiam levar à exclusão só será permitida uma vez. O novo teste pode ocorrer durante uma visita não programada. Se quaisquer testes de triagem forem repetidos, os resultados dos testes atenderão aos requisitos de elegibilidade e estarão disponíveis para revisão do investigador antes da admissão ao UPC (por exemplo, Dia -2).

9.1.3. Período de tratamento como paciente internado (partes 1 e 2)

Dias -2 e -1 (linha de base)

[00482] Os indivíduos qualificados serão admitidos na UPC no Dia -2 e serão submetidos a avaliações de segurança de linha de base (Dia -2) e coleta de ECG de linha de base (tempo correlacionado aos ECGs do Dia 1) no Dia -1 conforme especificado no Cronograma de tempo e eventos. No Dia -1 os indivíduos serão submetidos a uma medição da ingestão de alimentos em 24 horas e completarão questionários de EAV para avaliar as classificações de apetite e palatabilidade alimentar.

Dia 1/ Randomização e dosagem

[00483] Após a confirmação de que todos os critérios de inscrição são atendidos, indivíduos elegíveis serão randomizados no Dia 1 logo antes da dosagem do fármaco de estudo.

[00484] O fármaco do estudo será administrado sob a supervisão do IP ou de seu designado. Consulte o Cronograma de tempo e eventos para obter detalhes e pontos no tempo do procedimento do estudo.

[00485] Para cada nível de dose na Parte 1 e na Parte 2, os indivíduos serão separados em subgrupos e receberão doses em dias diferentes, de modo que não mais que 2 indivíduos receberão suas doses

por dia. Dois indivíduos sentinela na Parte 1 (1 placebo, 1 FP2) e 1 indivíduo sentinela na Parte 2 (FP2) receberão suas doses primeiro e completarão um período de vigilância de segurança de 72 horas, antes que indivíduos subsequentes no grupo de doses possam ser dosados. Após a análise dos dados de segurança, até 2 indivíduos adicionais receberão suas doses de maneira escalonada (com intervalo de aproximadamente 2 horas) por dia até que todos os indivíduos tenham completado a dosagem.

Dias 3 até o Dia 5

[00486] No Dia 3, a medição da ingestão de alimentos de 24 horas e a administração de questionários EAV serão repetidas.

[00487] Os indivíduos permanecerão continuamente domiciliados na UPC para avaliações de segurança, tolerabilidade, PK e PD até a manhã do Dia 5 quando, ao completarem as avaliações do estudo, podem receber alta.

9.1.4. Período ambulatorial (partes 1 e 2)

[00488] Os indivíduos retornarão ao UPC em jejum (ao menos 10 horas) para avaliações de segurança, tolerabilidade, PK, PD e imunogenicidade, conforme detalhado no Cronograma de tempo e eventos. A conclusão da visita de fim do estudo constitui o final de uma participação do indivíduo no estudo. Todas as tentativas razoáveis devem ser feitas para conduzir visitas ambulatoriais nos pontos no tempo agendados (isto é, dia específico para cada visita), mas uma janela dentro de ± 1 dia é permitida até a visita da Semana 4 (Dia 28) e uma janela de ± 3 dias é permitida para as visitas ambulatoriais restantes fora da visita de fim do estudo. Todas as visitas subsequentes precisam ser agendadas em relação à data da primeira dose do fármaco em estudo (Dia 1) e não à data da visita reagendada anterior.

Início de retirada

[00489] Se um indivíduo se retirar do estudo por qualquer razão an-

tes do final do período ambulatorial, então as avaliações de fim do estudo devem ser obtidas.

9.2. Farmacocinética e imunogenicidade

[00490] Amostras de sangue venoso serão coletadas ao longo do tempo, conforme especificado no Cronograma de tempo e eventos. Os tempos de amostragem de PK podem ser ajustados com base nos dados de PK preliminares provenientes de grupos de dose anteriores (por exemplo, tempos de amostragem tardios podem ser omitidos se as concentrações séricas de FP2 estiverem abaixo do limite inferior de quantificação [(LQI)]. A data e hora reais de cada coleta de PK e amostra de sangue de imunogenicidade (AAF) serão registradas no eCRF no sistema eletrônico de coleta de dados. Os indivíduos que terminam prematuramente a participação do estudo devem ter amostras de avaliação finais coletadas no momento do término.

9.2.1. Avaliações

[00491] As amostras coletadas para análises da concentração sérica de FP2 e do anticorpo contra FP2 podem ser adicionalmente usadas para avaliar aspectos de segurança ou eficácia que abordam preocupações que surgem durante ou após o período do estudo, para caracterização adicional da imunogenicidade ou para a avaliação de biomarcadores relevantes. A confidencialidade dos indivíduos será mantida.

9.2.2. Procedimentos analíticos

Farmacocinética

[00492] As amostras séricas serão analisadas para determinar as concentrações de FP2 com o uso de um método de imunoensaio validado, específico e sensível por ou sob a supervisão do patrocinador.

Imunogenicidade

[00493] A detecção e caracterização de anticorpos anti-FP2 e de anticorpo potencial para GDF15 endógeno no soro serão realizadas

com o uso de um método de ensaio validado por ou sob a supervisão do patrocinador. Todas as amostras coletadas para detecção de AAFs serão também avaliadas quanto à concentração sérica de FP2 para permitir a interpretação dos dados do anticorpo.

9.2.3. Parâmetros farmacocinéticos

[00494] Os parâmetros farmacocinéticos de FP2 serão calculados a partir dos perfis de concentração sérica-tempo com o uso de análises não compartimentais. Os parâmetros farmacocinéticos após uma administração única de FP2 incluirão, mas não se limitam aos seguintes:

C_{max} : Concentração sérica máxima observada.

T_{max} Tempo para atingir a concentração sérica máxima observada.

ASC_{inf} Área sob a concentração sérica em função da curva de tempo desde o tempo zero até o infinito com extrapolação da fase terminal.

$ASC_{última}$: Área sob a concentração sérica versus a curva de tempo do tempo zero até o tempo correspondente à última concentração quantificável.

$T_{1/2}$ Meia-vida de disposição terminal.

CL: Depuração sistêmica total (apenas IV).

CL/F: Depuração sistêmica total aparente após administração extravascular (apenas SC).

V_z : Volume de distribuição com base na fase terminal (apenas IV).

V_z/F : Volume aparente de distribuição com base na fase terminal após administração extravascular (apenas SC).

F (%): Biodisponibilidade absoluta de SC a ser calculada como a fração da dose administrada disponível sistemicamente, expressa como uma porcentagem. A biodisponibilidade absoluta é calculada utilizando-se a seguinte equação.

$$F(\%) = \frac{AUC_{SC} \times Dose_{IV}}{AUC_{IV} \times Dose_{SC}} \times 100\%$$

9.2.4. Avaliações de imunogenicidade

[00495] Os anticorpos Anti-FP2 serão avaliados em amostras de sangue coletadas de todos os indivíduos de acordo com o Cronograma de tempo e eventos. Adicionalmente, amostras de sangue também devem ser coletadas na visita de fim do estudo, de indivíduos que sejam retirados do estudo. Essas amostras serão testadas pelo Patrocinador ou pelo designado do Patrocinador.

[00496] As amostras de sangue serão triadas para anticorpos que se ligam à FP2 e o título de amostras positivas confirmadas será relatado. Outras análises podem ser realizadas para caracterizar adicionalmente a imunogenicidade de FP2.

9.3. Avaliações farmacodinâmicas

[00497] O peso corporal será medido em duplicata pela manhã, antes do café da manhã e depois do desjejum, conforme detalhado no Cronograma de tempo e eventos. Os indivíduos serão pesados em uma balança calibrada, enquanto usam uma camisola ou roupas íntimas em ambiente interno sem sapatos.

[00498] A ingestão de alimento em vinte e quatro horas será avaliada no Dia -1 e no Dia 3, mediante o fornecimento de 4 refeições (café da manhã, almoço, lanche e jantar) que serão servidas no mesmo horário em ambos os dias. As refeições serão padronizadas entre os dias (refeições idênticas no dia -1 e no dia 3). As refeições também serão padronizadas entre indivíduos de modo que a composição e o tamanho da porção sejam iguais para todos os indivíduos e serão baseadas em preferências locais e diretrizes, conforme avaliado pelos dietistas do estudo. Cada item de cada refeição será pesado antes e depois do consumo e os gramas consumidos de cada item alimentício serão calculados e registrados. As calorias consumidas serão estimadas com base nos gramas consumidos de cada item alimentício e seu teor nutricional. A alteração do Dia 1 para o Dia 3 em ingestão de calorias de 24 horas será avaliada. Nos dias em que a ingestão de alimento não é

registrada (Dias -2, 1, 2, 4 e 5), toda refeição (incluindo café da manhã e lanche) deve ser diferente das refeições fornecidas nos Dias -1 e 3.

[00499] Questionários EAV para avaliar as classificações de apetite (fome, terço, náusea e plenitude) serão administrados a cada hora durante as horas de vigília no Dia -1 e no Dia 3, a cada 3 horas durante as horas de vigília nos Dias 1, 2, 4 e 5 e logo antes e no final de cada refeição (Dias -1 ao Dia 5). Questionários EAV para avaliar a palatabilidade dos alimentos (que podem indicar possíveis aversões de alimentos) incluirão questões referentes à agradabilidade do odor, sabor e textura do alimento da refeição e serão completados pelos indivíduos imediatamente após terem consumido o primeiro bocado da entrada principal de cada refeição (Dias -1 ao Dia 5). Para uma descrição detalhada dos pontos no tempo em que os questionários de EAV serão administrados referem-se ao cronograma de tempo e evento para ingestão de alimentos e perguntas de EAV.

9.6. Avaliações de segurança

9.6.2. Testes laboratoriais clínicos

[00500] Serão coletadas amostras de sangue em jejum para química, hematologia, coagulação, lipídios e amostra de urina para urinálise. Os indivíduos irão jejuar de um dia para o outro ao menos 10 horas antes de todas as coletas de amostras de laboratório. Para horários de avaliações laboratoriais clínicas, consulte o Cronograma de tempo e eventos. O investigador irá analisar o relatório de laboratório, documentar essa análise, e registrar quaisquer alterações clinicamente relevantes que ocorram durante o estudo na seção de eventos adversos do eCRF. Os relatórios do laboratório serão arquivados com os documentos de origem.

[00501] Os seguintes testes serão realizados pelo laboratório local:

Painel hematológico

-hemoglobina

-contagem de plaquetas

- hematócrito

- porcentagem de reticulócitos

-Contagem de glóbulos vermelhos (RBC)

-Contagem de células brancas do sangue (WBC) com diferencial

Nota: Uma avaliação de leucócitos pode incluir quaisquer células anormais, que serão, então, relatadas pelo laboratório. Uma avaliação de CVS pode incluir anormalidades na contagem de CVS, parâmetros de CVS ou morfologia DE CVS, que serão então relatados pelo laboratório. Além disso, quaisquer outras células anormais em um esfregaço sanguíneo também serão relatadas.

Painel de coagulação

- tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) -tempo de protrombina (PT)

Painel químico

- sódio	- fosfatase alcalina
- potássio	- creatina fosfoquinase (CPK)
- cloreto	-ácido láctico desidrogenase (LDH)
- bicarbonato	-ácido úrico
- nitrogênio de ureia sanguínea	- cálcio

(NUS)

- creatinina	- fosfato
- glicose	- albumina
- aspartato aminotransferase (AST)	- proteína total
- alanina aminotransferase (ALT)	- magnésio
- gama glutamiltransferase (GGT)	
- bilirrubina total	
- bilirrubina direta*	

* Apenas se a bilirrubina total estiver elevada

Painel de lipídios

-colesterol total	- lipoproteína de alta densidade (HDL)-colesterol
- triglicerídeos	- lipoproteína de baixa densidade (LDL)- colesterol

Exame de urina

Fita reagente	Sedimento (se o resultado da fita for anormal)
-gravidade específica	-célula vermelha do sangue
-pH	-células brancas do sangue
-glicose	-células epiteliais
-proteína	-cristais
-sangue	-cilindros
-cetonas	-bactérias
-bilirrubina	
-urobilinogênio	
-nitrito	
-esterase de leucócitos	

[00502] Se o resultado da fita for anormal, será usada microscopia para medir o sedimento.

[00503] No exame microscópico, observações além da presença de CBS, CVS e cilindros também podem ser relatadas pelo laboratório.

Outros testes laboratoriais

[00504] Os seguintes testes laboratoriais serão realizados em pontos no tempo indicados no Cronograma de tempo e eventos:

O Teste de Gravidez por soro e urina (β -hCG) será conduzido para todas as mulheres

FSH (apenas mulheres), TSH e HbA1c

Sorologia (anticorpos para HIV 1 e 2, HBsAg e anticorpo anti-HCV

Fármaco na urina (anfetamina, barbituratos, benzodiazepinas, canabinoides, cocaína, opiatos, metadona) e triagem de cotinina

Teste de bafômetro

9.6.3. Eletrocardiograma

[00505] ECGs padrão de 12 derivações serão coletados conforme especificado no Cronograma de tempo e eventos. Cada ECG será impresso e armazenado no Arquivo Médico do Indivíduo no local do estudo. Além disso, os dados de ECG serão transferidos eletronicamente para um laboratório de ECG especializado (Nabios GmbH, Munique, Alemanha) para análise centralizada de acordo com as recomendações da ICH E14. Detalhes da metodologia de análise de ECG, o tempo de leituras e aplicação e formato dos resultados para reuniões de escalonamento de dose serão detalhados em um Manual de ECG separado.

[00506] Os ECGs de 12 derivações serão capturados em triplicata com menos de 2 minutos de separação em cada ponto no tempo após os indivíduos terem estado tranquilamente em uma posição supina durante ao menos 5 minutos, e abster-se de falar ou mover braços ou pernas. Durante a realização dos ECGs, os indivíduos devem estar em um ambiente tranquilo sem distrações (por exemplo, televisão, telefones celulares). Se múltiplas avaliações estiverem agendadas para o mesmo ponto no tempo, e/ou se uma ou mais avaliações estiverem agendadas para o mesmo horário que uma refeição, recomenda-se que os procedimentos sejam executados na seguinte sequência: sinais vitais, ECG, PK, coleta de sangue, questionários EAV para classificações de apetite, refeição, e questionários EAV para palatabilidade do alimento (após o primeiro bocado de alimento). As coletas de sangue para avaliações de PK devem ser mantidas tão próximas quanto possível do tempo especificado. Quando um ECG precisa ser executado no mesmo ponto no tempo que a PK, a amostra para PK precisa ser coletada imediatamente após a conclusão do ECG. Outras medições podem ser feitas mais cedo que os pontos no tempo especificados, se necessário. A ordem de múltiplas avaliações no mesmo ponto no tempo precisa ser a mesma ao longo do estudo.

[00507] Os ECGs serão feitos em triplicata em cada ponto no tempo agendado para avaliações mais precisas de alteração do intervalo QTc. Os ECGs obtidos no Dia -1 devem ser correlacionados aos ECGs obtidos no Dia 1. Em cada ponto no tempo no qual ECGs em triplicata são necessários, 3 traçados de ECG individuais devem ser obtidos o mais próximo possível em sucessão, mas a não mais que 2 minutos de intervalo. O conjunto completo de triplicatas deve ser concluído em menos de 4 minutos.

[00508] A média das medições em triplicata em cada ponto no tempo no Dia 1 servirá como valor basal compatível com o tempo de cada indivíduo para os parâmetros correspondentes no Dia 1.

[00509] Além do processo de leitura central fora do local dos ECGs, cada ECG deve ser revisado após a coleta por um médico qualificado do local do estudo para resultados de possível relevância clínica de segurança (por exemplo, prolongamento do intervalo QTc). Quaisquer achados patológicos e respectivas intervenções médicas (se houver) serão documentados no eCRF.

9.6.4. Monitoramento contínuo de ECG com derivação II (apenas parte 2)

[00510] O monitoramento contínuo de ECG com derivação II só será conduzido na Parte 2 no Dia 1, a partir de 30 minutos antes de iniciar a infusão IV e até 2 horas após o término da infusão. A critério do investigador (ou designado), o monitoramento contínuo de ECG com derivação II pode ser estendido. Esses dados são para monitoramento visual em tempo real e qualquer anormalidade detectada pelo dispositivo de monitoramento de ECG ou pelo investigador será impressa e retida como dados de origem. Uma medição de ECG de 12 derivações não programada também deve ser realizada assim que possível após uma anormalidade ser identificada. Quaisquer anormalidades clinicamente significativas serão registradas como eventos

adversos.

9.6.5. Sinais vitais

[00511] As medições de pressão arterial e FC serão avaliadas na posição supina com um dispositivo oscilométrico completamente automatizado. Técnicas manuais serão usadas apenas se um dispositivo automatizado não estiver disponível. Os sinais vitais devem ser medidos com o uso do braço oposto a partir do qual amostras de sangue estão sendo coletadas (exceto durante o tempo de infusão IV).

[00512] As medições de pressão sanguínea e pulso/frequência cardíaca devem ser precedidas por ao menos 5 minutos de descanso em um ambiente tranquilo sem distrações (por exemplo, televisão, telefones celulares). Em todos os pontos no tempo, as medições únicas de PA e FC serão executadas e registradas.

[00513] O mesmo método para as medições de temperatura corporal (isto é, timpânico) será usado para todas as medições para todos os indivíduos ao longo de toda a duração do estudo.

[00514] Os pontos no tempo para esses exames são especificados no Cronograma de tempo e eventos.

9.6.6. Exame físico

[00515] Um exame físico completo compreende um exame médico de rotina incluindo: aparência geral, neurológico, olhos, ouvido/nariz/garganta, tireoide, cardiovascular, respiratório, abdominal/gastrointestinal, hepático, músculo-esquelético e dermatológico.

[00516] Um breve exame físico inclui a avaliação da pele, sistema respiratório, sistema CV, abdômen (fígado, baço) e SNC.

[00517] Os pontos no tempo para esses exames são especificados no Cronograma de tempo e eventos. Uma nova descoberta clinicamente significativa (na opinião do investigador) não observada na triagem será capturada como um EA.

9.6.7. Reações alérgicas/hipersensibilidades gerais

[00518] Todos os indivíduos serão observados e cuidadosamente monitorados quanto ao desenvolvimento de qualquer reação alérgica durante o estudo e quanto a qualquer reação à infusão durante a administração do fármaco do estudo IV na Parte 2.

[00519] Um médico estará imediatamente disponível no local o tempo todo durante a administração do fármaco do estudo.

[00520] Todos os indivíduos serão observados cuidadosamente quanto aos sintomas de uma reação de infusão durante e após a administração IV, conforme indicado no Cronograma de tempo e eventos. O investigador deve usar julgamento clínico na avaliação da intensidade de quaisquer reações de infusão.

[00521] Se uma reação de infusão for observada, um tratamento como paracetamol oral e/ou anti-histamínico oral/IV e/ou β -agonistas inalados e/ou corticosteroides IV e/ou epinefrina IV pode ser administrado, dependendo da natureza da reação alérgica e da gravidade dos sintomas. As seguintes precauções devem ser aplicadas durante a administração IV da fármaco em estudo na Parte 2:

[00522] Antes de uma infusão ser iniciada, os funcionários adequados, medicamentos (por exemplo, epinefrina, β -agonistas inalados, anti-histamínicos e corticosteroides) e outros requisitos, como soluções de infusão para tratar reações alérgicas, incluindo anafilaxia, estarão disponíveis.

[00523] Se um indivíduo tiver uma reação de infusão moderada ou grave, a infusão deve ser encerrada imediatamente e o indivíduo deve ser tratado adequadamente de acordo com diretrizes institucionais.

[00524] Os indivíduos que interromperam o fármaco do estudo devido a uma reação de infusão serão solicitados a retornar pelas avaliações necessárias em todas as visitas programadas através da visita de fim do estudo.

[00525] As reações após a administração do fármaco do estudo po-

dem ocorrer de 1 a 21 dias após uma infusão ou injeção e a apresentação pode ser variável em sinais e sintomas. e nem sempre evidente (incluindo, mas não se limitando a, mialgia e/ou artralgia com febre e/ou erupção cutânea [que não representa sinais e sintomas de outras síndromes clínicas reconhecidas], e pode ser acompanhada por outros sintomas incluindo prurido, edema facial, mão ou lábio, disfagia, urticária, dor de garganta e/ou dor de cabeça). Qualquer reação alérgica ou hipersensibilidade deve ser registrada como um EA e o tipo de reação deve ser indicado. Caso um indivíduo sofra uma reação retardada à infusão ou à injeção, o indivíduo será solicitado a fornecer amostras não programadas adicionais (urina, soro e plasma para marcadores inflamatórios). Toda tentativa deve ser feita para coletar essas amostras o mais próximo possível do início dos um ou mais eventos adversos sugestivos de uma reação retardada de hipersensibilidade. Essas amostras serão usadas para tentar entender a etiologia dos sintomas. No caso de uma reação de pele (isto é, erupção cutânea) ter sido observada, será solicitado ao indivíduo permissão para obter biópsias de pele, novamente para que seja usada para entender melhor a causa da erupção cutânea.

9.6.8. Reação local no sítio de injeção (Parte 1)

[00526] O local de injeção após a administração SC do fármaco em estudo será avaliado quanto à reação local no local de injeção nos pontos de tempo indicados no Cronograma de tempo e eventos.

[00527] Qualquer reação adversa (por exemplo, dor, eritema e/ou endurecimento) deve ser documentada e deve ser caracterizada conforme descrito em Toxicity Grading Scale for Healthy Adult and Adolescent Volunteers Enrolled in Preventive Vaccine Clinical Trials⁷, com base nos seguintes 4 parâmetros: 1) grau de dor, 2) sensibilidade, 3) eritema/vermelhidão, 4) endurecimento/inchaço. Consulte os detalhes na Tabela 70 abaixo.

Tabela 70: Escala de classificação de toxicidade para reações do sítio de infusão e de injeção local

Reação local ao produto injetável	Leve (Grau 1)	Moderado (Grau 2)	Grave (Grau 3)	Potencial ameaça à vida (Grau 4)
Dor	Não interfere com a atividade	Uso repetido de analgésico não narcótico >24 horas ou interfere com a atividade	Qualquer uso de analgésico narcótico ou evita a atividade diária	Visita a PS ou hospitalização
Tenacidade	Desconforto moderado ao toque	Desconforto com movimento	Desconforto significativo em repouso	Visita a PS ou hospitalização
Eritema/vermelhidão ^a	2,5 a 5 cm	5,1 a 10 cm	>10 cm	Necrose ou dermatite esfoliativa
Endurecimento/inchaço ^b	2,5 a 5 cm e não interfere com a atividade	5,1 a 10 cm ou interfere com a atividade	>10 cm ou evita a atividade diária	- Necrose

ER = sala de emergência

^aEm adição à classificação da reação local medida no maior diâmetro único, a medição deve ser registrada como uma variável contínua.

^bEndurecimento/inchaço devem ser avaliados e classificados com o uso da escala funcional bem como da medição real.

[00528] Todas as reações locais no sítio de injeção capturadas como EAs com achados visuais (por exemplo, vermelhidão, endurecimento, edema) devem ser fotografadas juntamente com uma régua métrica para avaliação posterior.

9.7. Coleta e manipulação de amostra

[00529] As datas e horários reais da coleta de amostras serão registrados no eCRF. Se as amostras de sangue forem coletadas através de uma cânula permanente, uma quantidade adequada (1 mL) de fluido

sanguíneo ligeiramente maior que o volume de espaço morto da trava foi removida da cânula e descartada antes de cada amostra de sangue ser coletada. Após a coleta da amostra de sangue, a cânula será lavada com 0,9% de cloreto de sódio e carregada com um volume igual ao volume de espaço morto da trava. Se for usado um obturador, a perda de sangue devido ao descarte não é esperada. A lavagem com heparina não é permitida.

[00530] Consulte o Cronograma de tempo e eventos para obter os horários e frequência de todas as coletas de amostras.

[00531] Instruções para a coleta, manuseio, armazenamento e transporte de amostras são encontradas no manual de laboratório que será fornecido. A coleta, o manuseio, o armazenamento e o transporte de amostras estarão sob as condições de temperatura controlada especificadas e, onde aplicável, conforme indicado no manual de laboratório.

10. CONCLUSÃO/INTERRUPÇÃO, PELO INDIVÍDUO, DO TRATAMENTO DO ESTUDO/ RETIRADA DO ESTUDO

10.1. Conclusão

[00532] Um indivíduo será considerado como tendo concluído o estudo se ele ou ela tiver concluído a avaliação da visita de fim do estudo.

10.2. Interrupção do tratamento do estudo/retirada do estudo

[00533] Um indivíduo será automaticamente retirado do estudo por qualquer uma das seguintes razões:

Perdido para acompanhamento

Retirada de consentimento

Morte

[00534] Se um indivíduo se retirar do estudo por qualquer razão antes do final do Período ambulatorial, então as avaliações de fim do estudo devem ser obtidas. Se o indivíduo estiver disposto a retornar

para quaisquer visitas até a visita final de visita, quaisquer informações adicionais serão coletadas e quaisquer procedimentos serão realizados conforme permitido.

[00535] Se um indivíduo for perdido para acompanhamento, todos os esforços razoáveis foram tomados pela equipe do local do estudo para entrar em contato com o indivíduo e determinar o motivo da descontinuação/retirada. As medidas tomadas para dar seguimento deviam ser documentadas.

[00536] Quando um indivíduo se retira antes de completar o estudo, a razão para a retirada deve ser documentada no eCRF e no documento de origem. O fármaco de estudo atribuído ao indivíduo que se retirou não pode ser atribuído a um outro indivíduo. Indivíduos que se retiram podem ser substituídos.

[00537] Se o IP ou o Patrocinador acredita (por exemplo, por razões de segurança ou razões de tolerabilidade) que é no melhor interesse do indivíduo descontinuar a participação adicional do estudo, isso é permitido, mas o indivíduo ainda deve completar as avaliações do estudo através da visita de fim do estudo.

11. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

[00538] A análise estatística será feita pelo patrocinador ou sob a autoridade do patrocinador.

[00539] Nenhum teste de hipótese formal está planejado, devido à natureza exploratória e descritiva do estudo.

11.1. Informações dos indivíduos

[00540] Todos os indivíduos que recebem ao menos uma dose parcial do fármaco do estudo serão incluídos nas estatísticas descritivas e análises de segurança.

11.2. Determinação do tamanho de amostra

[00541] Não há dados de PK humana disponíveis para FP2, portanto, para este estudo inicial de Fase 1 FIH, nenhum cálculo de ta-

manho de amostra formal foi realizado. O número de indivíduos planejados para cada grupo de doses é consistente com tamanhos de amostra costumeiros em estudos únicos de fase 1 de dose ascendente de novos fármacos em que o objetivo primário do estudo é a segurança e tolerabilidade e um dos objetivos secundários é avaliar o perfil de PK. Em cada grupo de doses, 6 indivíduos serão randomizados para FP2 e 2 indivíduos serão randomizados para o placebo; dessa forma, a razão entre fármaco ativo do estudo e placebo será de 3:1 dentro de cada grupo de dose. Espera-se que o número de indivíduos planejados forneça informações suficientes sobre a segurança, tolerabilidade e farmacocinética de FP2 para permitir a avaliação do potencial para desenvolvimento clínico adicional. Dois indivíduos que receberam placebo por grupo de dose devem ser suficientes para permitir o julgamento de segurança e tolerabilidade em cada nível de dose e, se adequado, os indivíduos com placebo serão agrupados ao término do estudo para fins de análise de dados. Se não for adequado agrupar indivíduos com placebo devido a problemas como variância heterogênea, então métodos estatísticos alternativos podem ser explorados (transformação logarítmica, etc.) de modo que todos os dados possam ser usados na análise.

[00542] O tamanho da amostra de 6 indivíduos tratados com FP2 por nível de dose é suficiente para estimar a probabilidade de um sinal de segurança (por exemplo, hipersensibilidade). Presumindo-se um risco verdadeiro de um sinal de segurança de ~10%, 6 indivíduos recebendo fármaco ativo permitem detectar pelo menos um evento com uma probabilidade de ~47%; ao mesmo tempo em que presume um risco de ~50%, a probabilidade de detectar pelo menos um evento é de aproximadamente 98%.

[00543] Para parâmetros farmacocinéticos, 6 indivíduos (3 homens; 3 mulheres) recebendo administrações IV de FP2 na Parte 2 devem

fornecer precisão adequada para a estimativa da biodisponibilidade absoluta. Espera-se que o tamanho da amostra de 6 indivíduos forneça precisão adequada para estimar a ASC de FP2 mediante administração IV e sirva como um teste de desempenho para a avaliação de atributos de qualidade farmacêutica da forma de dosagem SC.

11.3. Análises farmacocinéticas

[00544] Todos os indivíduos que recebem ao menos uma dose de fármaco do estudo e têm ao menos uma amostra de PK e de imunogenicidade coletada após a dose serão incluídos nas análises e relatos dos dados de PK. Os indivíduos serão excluídos da análise de PK se seus dados não permitirem a avaliação precisa da PK (por exemplo, administração incompleta do fármaco do estudo; informações ausentes sobre os tempos de dosagem e amostragem; dados de concentração não suficientes para o cálculo do parâmetro PK).

[00545] Estatísticas descritivas (médias, medianas, desvios-padrão e coeficientes de variação) serão usadas para sumarizar as concentrações séricas de FP2 em cada ponto de tempo de amostragem e também para os parâmetros de PK da FP2 para cada GD. Todas as concentrações séricas abaixo da menor concentração quantificável (ALQ) serão imputadas como zero na estatística de sumário, e todos os indivíduos e amostras excluídos das análises de PK serão claramente documentados. Os parâmetros de PK também serão sumarizados por GD.

[00546] Os perfis de concentração de FP2 sérica média e/ou mediana serão plotados em relação ao perfil completo após a administração do fármaco de estudo. Para os gráficos médios, os valores de ALQ serão ajustados para zero. Para perfis de tempo de concentração sérica individual, os valores de BLQ até a primeira concentração medida serão ajustados para zero e após a última concentração medida será eliminada da análise.

[00547] A análise estatística dos dados de PK será realizada para

todos os indivíduos que recebem ao menos uma dose de FP2. $C_{\text{máx}}$ e a ASC médias geométricas serão plotadas em função da dose para avaliar visualmente a proporcionalidade da dose. A proporcionalidade da dose mediante administração SC de FP2 pode ser examinada com o uso de análises de regressão linear de dados $C_{\text{máx}}$ e ASC transformados em log natural (modelo de potência). Análises adicionais dos dados podem ser realizadas conforme necessário.

[00548] A biodisponibilidade absoluta para SC será calculada como a fração da dose administrada disponível sistemicamente, expressa como uma porcentagem. Para examinar a biodisponibilidade individual, a razão entre ASC_{inf} normalizada para dose individual a partir da administração SC versus a média geométrica da ASC_{inf} normalizada por dose a partir do grupo de administração IV será calculada e expressa como uma porcentagem. A ASC parcial_(0 a 4 semanas) pode ser usada em vez da ASC_{inf} , se considerada adequada. A biodisponibilidade absoluta de FP2 para SC será derivada calculando-se a média da biodisponibilidade absoluta individual para SC descrita acima. Os intervalos de confiança de noventa e cinco por cento e plotagens da biodisponibilidade absoluta individual de SC podem também ser explorados.

11.4. Análises de imunogenicidade

[00549] A incidência de anticorpos anti-FP2 será sumarizada para todos os indivíduos que recebem ao menos 1 dose de FP2 e têm amostras adequadas para a detecção de anticorpos contra FP2 (isto é, indivíduos com ao menos 1 amostra obtida após a dosagem de FP2).

[00550] Será fornecida uma lista de indivíduos que são positivos para anticorpos contra FP2. Os títulos máximos de anticorpos contra FP2 também serão relatados para indivíduos que são positivos para anticorpos contra FP2.

[00551] A incidência de anticorpos neutralizantes (NABs) para FP2 será sumarizada para indivíduos que são positivos para anticorpos contra FP2 e têm amostras avaliáveis para NABs para FP2.

11.5. Análises farmacodinâmicas (peso corporal, ingestão de alimentos) e exploratórias

Avaliações de PD (EAV) e biomarcadores

[00552] As análises farmacodinâmicas serão realizadas em todos os indivíduos que receberam ao menos 1 dose do fármaco de estudo (FP2 ou placebo) e com ao menos 1 avaliação de PD após o tratamento. Para cada dose, as estatísticas descritivas serão calculadas em cada ponto no tempo para cada ponto final de PD (por exemplo, peso, ingestão de alimentos) e resultados de PD exploratórios (EAV) e parâmetro de biomarcador. Os parâmetros podem ser exibidos graficamente 1) para cada indivíduo e 2) como valores médios +/- desvio padrão (ou outras medidas de sumário adequadas) por dose vs. tempo de amostragem planejado para cada ponto final do teste para avaliação visual dos efeitos relacionados à dose. Análises estatísticas descritivas adicionais podem incluir alteração e alteração percentual em relação aos valores de linha de base (isto é, pré-dose) de biomarcadores farmacodinâmicos e exploratórios selecionados.

[00553] Os biomarcadores farmacodinâmicos e exploratórios podem ser analisados com o uso de um modelo de efeito misto adequado para um design de painel sequencial de dose única ascendente. O modelo de efeitos mistos pode incluir fatores fixos para tratamento, visita, tratamento por interação de visita, linha de base e linha de base por interação de visita, com um fator aleatório para o indivíduo. Covariantes de linha de base podem também ser incluídas no modelo (por exemplo, idade, sexo, peso, etc.). Se adequado, as diferenças (placebo agrupado por tratamento) na alteração da média dos mínimos quadrados a partir da linha de base e intervalos de confiança de 90% para a diferença nas médias po-

dem ser obtidas usando o erro quadrático médio a partir do modelo linear e fazendo referência a uma distribuição t. A média dos quadrados mínimos e os intervalos de confiança de 90% para a alteração dos pontos finais de teste de PD/biomarcador a partir da linha de base (pré-dose) podem também ser calculados pelo grupo de tratamento.

[00554] Análises exploratórias adicionais podem ser realizadas conforme necessário. Os parâmetros de PD, como EAV, podem ser sumarizados ao longo do tempo dentro de uma visita com o uso de área sob a curva (método trapezoidal) ou média ponderada de tempo antes da análise no modelo de efeitos mistos lineares descrito acima.

11.6. Análises farmacocinéticas/farmacodinâmicas

[00555] As relações entre os dados de PK e PD podem ser exploradas. Quando adequado, as concentrações séricas de fármaco e as medições de PD correspondentes podem ser plotadas para avaliar sua relação. Se considerado adequado, um modelo adequado pode ser aplicado para descrever a relação de efeito de exposição.

[00556] A relação PK/PD pode ser investigada graficamente e, se considerada adequada, pode ser adicionalmente analisada com o uso de um método estatístico adequado. As exposições de PK ($C_{\text{máx}}$ e/ou ASC_{inf}) versus as variáveis de PD (por exemplo, peso, ingestão de alimento, EAV) podem ser graficamente examinadas. Se a representação gráfica da relação for considerada razoável, então esses dados podem ser analisados estatisticamente com o uso de um modelo adequado.

[00557] As exposições de PK ($C_{\text{máx}}$ e/ou ASC_{inf}) versus as variáveis de segurança (por exemplo, resposta de ECG) podem ser graficamente exploradas. Se a representação gráfica da relação for considerada razoável, então esses dados podem ser analisados estatisticamente com o uso de um modelo adequado.

11.7. Análises de segurança

[00558] O relato dos dados de segurança de todos os indivíduos

que recebem ao menos 1 dose de FP2 ou placebo incluirá a incidência e o tipo de eventos adversos, juntamente com valores absolutos e alterações em: pressão arterial, frequência cardíaca, dados clínicos laboratoriais e dados de ECG de 12 derivações da pré-dose para o ponto no tempo pós-dose final.

Eventos adversos

[00559] Os termos literais usados na eCRF pelos investigadores para identificar eventos adversos foram codificados usando-se MedDRA conforme descrito no Exemplo 1. Os eventos adversos emergentes do fármaco do estudo são eventos adversos com início durante a fase de intervenção ou que são consequência de uma condição pré-existente que piora desde a linha de base. Todos os eventos adversos relatados serão incluídos na análise. Para cada evento adverso, a porcentagem de indivíduos que experimentou ao menos 1 ocorrência do dado evento foi sumarizada por grupo de tratamento. Além disso, comparações entre grupos de intervenção serão fornecidas, se adequado.

[00560] Sumários, listagens, conjuntos de dados ou narrativas de indivíduos podem ser fornecidos, conforme for adequado, para aqueles indivíduos que morrem, que descontinuem o fármaco do estudo devido a um evento adverso, ou que experimentam um evento adverso grave ou muito grave.

Testes laboratoriais clínicos

[00561] Os dados laboratoriais serão sumarizados por tipo de teste laboratorial. As faixas de referência e os resultados acentuadamente anormais (especificado no plano estatístico de análise) serão usados no sumário dos dados laboratoriais. As estatísticas descritivas serão calculadas na linha de base para valores observados e alteração em relação à linha de base de cada ponto de tempo programado. As alterações dos resultados da linha de base serão apresentadas em tabu-

lações cruzadas pré e pós-intervenção (com classes para faixas abaixo, dentro e acima do normal). Será fornecida uma lista de indivíduos com quaisquer resultados laboratoriais fora das faixas de referência. Uma listagem de indivíduos com quaisquer resultados laboratoriais apreciavelmente anormais também será fornecida.

Eletrocardiograma (ECG)

[00562] As variáveis de ECG que foram analisadas foram frequência cardíaca, intervalo PR, intervalo QRS, intervalo QT e intervalo QTc usando-se os seguintes métodos de correção: QT corrigido, de acordo com a fórmula de Bazett (QTcB), QT corrigido, de acordo com a fórmula de Fridericia (QTcF).^{1,19,14,16}

[00563] As estatísticas descritivas dos intervalos QTc e as alterações em relação à linha de base duplo-cega foram sumarizados em cada ponto de tempo programado. As porcentagens de indivíduos com intervalo QTc > 450 ms, > 480 ms, ou > 500 ms foram sumarizadas, assim como as porcentagens de indivíduos com aumentos do intervalo QTc em relação à linha de base < 30 ms, 30 a 60 ms, ou > 60 ms.

[00564] Todas as alterações importantes na forma de onda de ECG que foram as alterações das leituras em relação à linha de base foram reportadas (por exemplo, alteração na morfologia da onda T ou a ocorrência de ondas U).

[00565] A relação entre as concentrações séricas em JNJ-64379090 e o ponto final de teste $\Delta\Delta\text{QTc}$ primário (alteração corrigida do placebo em relação ao tempo de QTc basal compatível) pode ser quantificada com o uso de uma abordagem de modelagem de efeitos mistos lineares ou não lineares, se aplicável.

Sinais vitais

[00566] As estatísticas descritivas dos valores de FC e pressão arterial (sistólica e diastólica) (supina) e as alterações a partir da linha de base serão sumarizadas em cada ponto no tempo programado. As

porcentagens de indivíduos com valores fora dos limites clinicamente importantes serão sumarizadas.

Exame físico

[00567] As estatísticas descritivas das alterações a partir da linha de base serão sumarizadas em cada ponto no tempo programado.

11.8. Análise interina/comitê de revisão de dados

[00568] Nenhuma análise interina está planejada. Entretanto, uma revisão cega de dados pode ser executada pela equipe de estudo após cada grupo de dosagem estar completo, com o propósito de tomar uma decisão de escalonamento de dose.

12. RELATÓRIO DE EVENTOS ADVERSOS

[00569] O relato e a análise oportunos, acurados e completos das informações de segurança de estudos clínicos são cruciais para a proteção de indivíduos, investigadores e patrocinador, e são obrigados por agências regulatórias em todo o mundo. O patrocinador estabeleceu Procedimentos Padrão de Operação em conformidade com requisitos normativos em todo o mundo para assegurar o relato adequado de informações de segurança; todos os estudos clínicos conduzidos pelo patrocinador ou suas afiliadas serão conduzidos de acordo com esses procedimentos.

Método para detecção de eventos adversos e eventos adversos sérios

[00570] Deve-se tomar cuidado para não introduzir viés ao detectar EAs ou EASs. Questionamento verbal aberto e não condutivo ao indivíduo é o método preferencial para questionar sobre a ocorrência de eventos adversos.

Eventos adversos solicitados

[00571] Os EAs solicitados são eventos locais e sistêmicos predefinidos para os quais o indivíduo é especificamente questionado. Neste estudo, as reações no local da injeção (como dor ou comichão) serão solicitadas conforme especificado no Cronograma de Tempo e

Eventos.

Eventos adversos não solicitados

[00572] EAs não solicitados são todos os eventos adversos relatados espontaneamente (isto é, para os quais o indivíduo não é especificamente questionado).

12.1. Definições

12.1.1. Definições e classificações de eventos adversos

Evento adverso

[00573] Um evento adverso é qualquer ocorrência médica desfavorável em um estudo clínico indivíduo administrado um produto medicinal (investigacional ou não investigacional). Um evento adverso não tem necessariamente uma relação causal com o tratamento. Um evento adverso pode, portanto, ser qualquer sinal desfavorável e não intencional (incluindo um achado anormal), sintoma, ou doença temporariamente associada ao uso de produto medicinal (investigacional ou não investigacional), quer sejam ou não relacionados àquele produto medicinal (investigacional ou não investigacional). (Definição pela Conferência Internacional sobre Harmonização [ICH]).

[00574] Isto inclui qualquer ocorrência que seja nova no início ou agravada em gravidade ou frequência em relação à condição basal, ou resultados anormais de procedimentos diagnósticos, incluindo anormalidades de testes laboratoriais.

[00575] O patrocinador coleta eventos adversos começando com a assinatura do TCI.

Eventos adversos sérios

[00576] Um evento adverso sério baseado no ICH e nas diretrizes Guidelines on Pharmacovigilance for Medicinal Products for Human Use da EU (união europeia) é qualquer ocorrência médica desfavorável que em qualquer dose:

Resulta em morte

Ameaça a vida

(O indivíduo estava em risco de morte no momento do evento. Isso não refere-se a um evento que hipoteticamente poderia ter causado morte se fosse mais grave).

Exige internação hospitalar ou prolongamento de hospitalização existente

Resulta em deficiência/incapacidade persistente ou significativa

É uma anomalia congênita/defeito de nascimento

É uma suspeita de transmissão de qualquer agente infeccioso através de um produto medicinal

É medicamento importante*

*Julgamento médico e científico deve ser exercido na decisão do fato de se o relato acelerado é também adequado em outras situações, como eventos médicos importantes que podem não ser imediatamente ameaçadores da vida ou resultam em morte ou hospitalização, mas que podem por em perigo o indivíduo ou podem precisar de intervenção para evitar um dos outros resultados mencionados na definição acima. Estes devem normalmente ser considerado graves.

[00577] Se um evento adverso sério e inesperado ocorreu para o qual a evidência sugere uma relação causal entre o fármaco de estudo e o evento (por exemplo, morte por anafilaxia), o evento foi reportado como uma reação adversa suspeita, séria e inesperada, mesmo se foi um componente do desfecho do estudo (por exemplo, mortalidade de todas as causas).

Evento adverso não listado (inesperado)/informações de segurança de referência

[00578] Um evento adverso é considerado não incluído na lista se a natureza ou gravidade não é consistente com as informações aplicáveis de referência sobre a segurança do produto. Para FP2, a ex-

pectativa de um evento adverso será determinada se ele está listado ou não na procura do Investigador.

Evento adverso associado ao uso da intervenção

[00579] Um evento adverso é considerado associado ao uso da intervenção se a atribuição for possível, provável, ou muito provável pelas definições mencionadas na Seção 12.1.2, Definições de atribuição.

[00580] Nenhum estudo clínico foi conduzido com FP2, portanto, nenhum dado está disponível sobre os efeitos de FP2 em seres humanos.

12.1.2. Definições de atribuição

Não relacionado

[00581] Um evento adverso que não estava relacionado com o uso do fármaco.

Duvidoso

[00582] Um evento adverso para o qual uma explicação alternativa é mais provável, por exemplo um ou mais fármacos concomitantes, doenças concomitantes, ou a relação no tempo sugere que uma relação causal é improvável.

Possível

[00583] Um evento adverso que possa dever-se ao uso do fármaco. Uma explicação alternativa, por exemplo, fármacos concomitantes, doenças concomitantes, é inconclusiva. A relação no tempo é razoável; portanto, a relação causal não pode ser excluída.

Provável

[00584] Um evento adverso que possa dever-se ao uso do fármaco. A relação no tempo é sugestiva (por exemplo, confirmada pela suspensão do fármaco ("dechallenge")). Uma explicação alternativa é menos provável, por exemplo, um ou mais fármacos concomitantes, uma ou mais doenças concomitantes.

Muito provável

[00585] Um evento adverso que é mencionado como uma reação adversa possível e não pode ser razoavelmente explicado por uma explicação alternativa, por exemplo, um ou mais fármacos concomitantes, uma ou mais doenças concomitantes. A relação em tempo é muito sugestiva (por exemplo, confirmada pela suspensão e reintrodução do fármaco ("dechallenge" e "rechallenge").

Critérios de gravidade

[00586] Uma avaliação do grau de gravidade foi feita usando-se os seguintes descritores categóricos:

Leve: Consciência de sintomas que são facilmente tolerados, causando desconforto mínimo e não interferindo com as atividades diárias.

Moderado: Suficiente desconforto está presente para causar interferência com a atividade normal.

Grave: Sofrimento extremo, causando significativo comprometimento funcional ou incapacitação. Impedimento de atividades diárias normais.

[00587] O investigador precisa usar julgamento clínico na avaliação da gravidade dos eventos não diretamente experimentados pelo indivíduo (por exemplo, alterações laboratoriais).

12.1. Relato de situações especiais

[00588] Eventos de segurança de interesse sobre uma intervenção do patrocinador no estudo que podem exigir relato/comunicação imediato e/ou avaliação de segurança incluem, mas não se limitam a:

Sobredosagem de uma intervenção de estudo do patrocinador

Suspeita de abuso/uso indevido de uma intervenção de estudo do patrocinador

Exposição acidental ou ocupacional a uma intervenção de estudo do patrocinador

Erro de medicação envolvendo um produto do patrocinador (com ou sem exposição do indivíduo/paciente à intervenção de estudo do patrocinador, por exemplo, confusão de nome)

[00589] O relato de situações especiais precisa ser registrado no eCRF. Qualquer relato de situações especiais que atendam aos critérios de um evento adverso sério precisa ser registrado na página de eventos adversos sérios do eCRF.

12.3. Procedimentos

12.3.1. Todos os eventos adversos

[00590] Todos os eventos adversos e relatos de situações especiais, sérios ou não sérios, serão reportados a partir do momento em que seja obtido um TCI assinado e datado até à conclusão do último procedimento relacionado com o estudo do indivíduo (que pode incluir o contato para acompanhamento de segurança). Eventos adversos sérios, incluindo aqueles relatados espontaneamente ao investigador na visita de fim de estudo, serão reportados no formulário para eventos adversos sérios. O patrocinador avaliará quaisquer informações de segurança que sejam relatadas espontaneamente por um investigador além do período especificado no protocolo.

[00591] Todos os eventos que atendam à definição de um evento adverso sério serão reportados como eventos adversos sérios, independentemente de serem avaliações específicas do protocolo.

[00592] Todos os eventos adversos, independentemente da seriedade, gravidade, ou presumida relação com a intervenção de estudo, serão registrados com o uso de terminologia médica no documento de origem e no eCRF. Sempre que possível, diagnósticos devem ser dados quando sinais e sintomas se devem a uma etiologia comum (por exemplo, tosse, corrimento nasal, espirros, dor de garganta e congestão da cabeça devem ser reportados como "infecção do trato respiratório superior"). Os investigadores registrarão no eCRF seu parecer so-

bre a relação do evento adverso com a terapia de estudo. Todas as medidas necessárias para a gestão de eventos adversos serão registradas no documento de origem e reportadas de acordo com as instruções do Patrocinador.

14. INFORMAÇÕES SOBRE O FÁRMACO DE ESTUDO

14.1. Descrição física do fármaco do estudo

[00593] A FP2 fornecida para este estudo é uma solução estéril castanho-amarelada, com uma concentração de 50 mg/mL em 10 mM de fosfato de sódio, 8% de sacarose e 0,04% de polissorbato 20, a um pH de 6,5.

[00594] A FP2 é fornecida congelada em um frasco de vidro com um volume de enchimento de 1,2 mL.

[00595] A formulação de tampão fornecida para este estudo é uma solução estéril transparente que consiste em 10 mM de fosfato de sódio, 8,0% de sacarose e 0,04% de polissorbato 20. O tampão da formulação será usado para preparar as injeções de placebo e como diluente na preparação das doses iniciais de FP2 SC.

[00596] O tampão de formulação é fornecido congelado em um frasco de vidro com um volume de enchimento de 1,2 mL.

[00597] Será fabricado e fornecido sob a responsabilidade do Patrocinador. A lista de excipientes é fornecida acima.

14.2. Embalagem

[00598] O fármaco de estudo (FP2 e o tampão de formulação para diluição de FP2 e para uso como placebo) será fornecido sob a forma de suprimentos a granel. O fármaco do estudo será armazenado em uma farmácia trancada e transferido apenas para um membro de equipe de estudo adequadamente qualificado para administração após a preparação para infusão IV (Parte 2) ou uma preparação cega para uma injeção SC (Parte 1).

14.3. Rotulagem

[00599] Os rótulos do fármaco em estudo conterão informações para atender às exigências regulatórias aplicáveis.

14.4. Preparação, manuseio e armazenamento

[00600] Todo o fármaco do estudo será armazenado em temperaturas controladas na faixa de -30 °C a -40 °C e protegido da luz.

[00601] Para os quatro grupos de dose SC planejados iniciais, o produto farmacêutico será diluído antes do uso até a concentração necessária (GD 1 0,5 mg/mL; GD 2 e GD 3 5,0 mg/mL; GD 4 10,0 mg/mL) com o uso do tampão de formulação. O produto farmacêutico para administração IV será diluído a uma concentração de 10 mg/mL e administrado com filtração em linha.

Referências

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 VWW, Mohammad MG, Kuffner T, *et al.* The TGF- β superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: A pleiotrophic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth Factors*. 2011;29(5):187-195.
3. Diretriz da EMA. 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. Agência Europeia de Medicamentos; Comitê para produtos medicinais para uso humano (CHMP - "Committee for Medicinal Products for Human Use"); 20 de julho de 2017.
4. Diretriz da EMA. EMEA/CHMP/SWP/28367/07 (2007). Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products. Agência Europeia de Medicamentos; Comitê para produtos medicinais para uso humano (CHMP); 19 de julho de 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, julho de 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, setembro de 2007).

8. Fejzo MS (2018), Sazonova OV, Sathirapongsasuti JF, Hallgrímsdóttir IB, 23 and Me 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) e 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. Disponível em http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_adult_09_10/obesity_adult_09_10.htm Acessado em 23 de maio de 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 e 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 e 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 de maio de 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 e 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 e Eckel RH. Treatment of obesity: weight loss and bariatric surgery. *Circ Res*. 2016;118:1844-1855.

23. Organização Mundial da Saúde (2012), Blood Donor Selection: Guidelines on Assessing Donor Suitability for Blood Donation. Genebra. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138212/> Acessado em 21 de junho de 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

Exemplo 22: Resultados do teste clínico.

[00602] Um teste clínico foi conduzido de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 21, com as seguintes exceções: (1) A parte 2 do estudo (biodisponibilidade absoluta) não foi conduzida; (2) O critério de inclusão definindo a idade do participante foi alterado para aumentar o limite superior de idade elegível para 55 anos; (3) O critério de exclusão baseado no participante tendo um teste de urina positivo para cotinina foi modificado para permitir a inclusão de fumantes leves e intermitentes que estavam dispostos a se abster de fumar durante o período interno. A dosagem foi completada para as Coortes 1

a 6, enquanto a dosagem para a Coorte 7 está em andamento. Quarenta e oito indivíduos, divididos em seis coortes de oito indivíduos cada (coortes 1 a 6), foram expostos a doses únicas de FP2 ou placebo correspondentes. Em cada coorte, 6 indivíduos receberam dosagem de FP2 e 2 indivíduos receberam dosagem de placebo correspondente. Abaixo está um sumário das doses de FP2 (ou placebo correspondente) administradas a cada coorte de 1 a 6 (Tabela 71):

Tabela 71. Dosagem das coortes 1 a 6.

Coorte	Dosagem
Coorte 1	0,8 mg
Coorte 2	2,5 mg
Coorte 3	7,5 mg
Coorte 4	15 mg
Coorte 5	30 mg
Coorte 6	60 mg

[00603] Informações de segurança e tolerabilidade cegas estão disponíveis para todos os indivíduos dosados (Coortes 1 a 6). Os resultados farmacocinéticos (PK) e farmacodinâmicos (PD) sumarizados do grupo estão disponíveis para as Coortes 1 a 5.

Segurança e tolerabilidade: O tratamento foi geralmente considerado seguro e bem tolerado.

Farmacocinética

[00604] Os dados farmacocinéticos estavam disponíveis para as Coortes 1 a 5. Para doses crescentes de FP2 administradas, as exposições aumentaram de uma maneira aproximadamente proporcional à dose. $T_{\text{máx}}$ ocorreu no Dia 6 e $T_{1/2}$ foi de aproximadamente 12 dias, suportando assim a dosagem semanal.

Tabela 72. Farmacocinética de doses únicas ascendentes de FP2.

Parâmetro farmacocinético	0,8 mg (n=6) Média (DP)	2,5 mg (n=6) Média (DP)	7,5 mg (n=6) Média (DP)	15 mg (n=6) Média (DP)	30 mg (n=6) Média
AUC₇₂(µg.h/ml)	3,36 (2,94)	9,71 (5,33)	27,3 (5,31)	46,1 (20,2)	128,9
C₇₂ (µg/ml)	0,0691 (0,0572)	0,208 (0,0935)	0,592 (0,0975)	1,05 (0,456)	2,65

C₇₂ representa 72% de C_{máx}

Farmacodinâmica.

[00605] A avaliação da ingestão de alimentos foi conduzida na linha de base (Dia -1) e novamente no Dia 3 após a administração do fármaco do estudo. A T_{máx} observada durante as primeiras 4 coortes deste estudo SAD está em ~Dia 6, e a concentração plasmática de FP2 no Dia 3 é ~70 a 80% da concentração alcançada no Dia 6.

[00606] Para avaliar a ingestão de alimentos, quatro refeições padronizadas (café da manhã, almoço, lanche, jantar) foram fornecidas aos indivíduos; cada indivíduo recebeu as mesmas refeições (mesmos itens alimentícios e as mesmas quantidades) em ambos os dias (isto é, dias -1 e 3). As calorias consumidas das 4 refeições foram somadas para se obter o total de calorias consumidas na linha de base (Dia -1) e no Dia 3. As alterações na ingestão de alimentos a partir da linha de base até o Dia 3 foram usadas como uma medição exploratória do modo de ação farmacodinâmico da FP2.

[00607] As alterações na ingestão de alimentos foram variáveis em ambos os indivíduos recebendo placebo e recebendo fármaco ativo, com alterações no Dia 3 em relação à linha de base de aproximadamente $\pm 20\%$ nas Coortes 1 a 4. No entanto, a ingestão de alimento diminuiu em mais de 50% (faixa de 55-96%) em 4 dos 6 indivíduos tratados com 30 mg (Coorte 5) de FP2. Em comparação, nenhum dos grupos placebo agregados (10 indivíduos) alcançou reduções na ingestão de alimentos $> 30\%$. Nesse mesmo grupo de dose (Coorte 5, 30 mg), os 2 indivíduos que apresentaram a maior diminuição na ingestão de alimento (reduções de -85% e -96% na ingestão de alimento) também foram os indivíduos que atingiram as maiores exposições de FP2). O valor mediano da porcentagem de alteração na ingestão de alimentos da linha de base para o Dia 3 após a dose para os indivi-

duos em placebo ou em FP2 é apresentado na Tabela 73.

Tabela 73. Alterações na ingestão de alimentos a partir da linha de base (Dia -1) até o Dia 3 em indivíduos tratados com placebo ou com doses crescentes de FP2.

Coort (número de indivíduos)	Valor mediano para porcentagem de alteração na ingestão de alimentos, da linha de base até o Dia 3 (5°, 95° percentil)
Placebo (N=10)	-11,7 (-28,6, 15,6)
Coorte 1 (N=6)	2,3 (-17,7, 14,8)
Coorte 2 (N=6)	0,7 (-24,0, 16,1)
Coorte 3 (N=6)	-9,9 (-26,3, 11,8)
Coorte 4 (N=6)	-10,8 (-29,8, 5,8)
Coorte 5 (N=6)	-33,7 (-92,1, 14,8)
Coorte 6 (cego)* (N=8)	-35,1 (-68,4, 1,9)

[00608] Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes e com referência a modalidades específicas da mesma, ficará evidente para o versado na técnica que várias alterações e modificações podem ser feitas na mesma sem que se afaste do espírito e do escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, caracterizado por compreender administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o indivíduo estar com sobrepeso.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o indivíduo ter um IMC de 25 kg/m² ou mais.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o indivíduo ter o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 0,8 mg.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 2,5 mg.

8. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 7,5 mg.

9. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 15 mg.

10. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 30 mg.

11. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 60 mg.

12. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 90 mg.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada por meio de injeção subcutânea.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a composição ser administrada ao indivíduo uma vez por semana.

15. Método para diminuição da ingestão de alimentos em um indivíduo, caracterizado por compreender administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêticamente aceitável, sendo que a dita proteína de fusão é administrada em uma dose na faixa de 0,8 mg a 90 mg, e sendo que o peso do indivíduo é de 80 kg ou mais.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o indivíduo estar com sobrepeso.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado por o indivíduo ter um IMC de 25 kg/m² ou mais.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por o indivíduo ter o IMC na faixa de 25 kg/m² a 29,9 kg/m².

19. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,8 mg, 2,5 mg, 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg e 90 mg.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 0,8 mg.

21. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 2,5 mg.

22. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 7,5 mg.

23. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 15 mg.

24. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 30 mg.

25. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 60 mg.

26. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada em uma dose de 90 mg.

27. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada por meio de injeção subcutânea.

28. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por a composição ser administrada ao indivíduo uma vez por semana.

29. Método para diminuição do peso corporal em um indivíduo, caracterizado por compreender administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacologicamente aceitável, sendo que a dita composição é administrada em uma dose em uma faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a dita composição ser administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

31. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

32. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

33. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

34. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado

por a composição ser administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

35. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

36. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

37. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

38. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada por meio de injeção subcutânea.

39. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a composição ser administrada ao indivíduo uma vez por semana.

40. Método para diminuição da ingestão de alimento em um indivíduo, caracterizado por compreender administrar uma composição que compreende uma proteína de fusão compreendendo SEQ ID NO: 92 e ao menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável, sendo que a dita composição é administrada em uma dose na faixa de 0,01 mg/kg a 1,08 mg/kg.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado por a dita composição ser administrada em uma dose selecionada do grupo que consiste em: 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,36 mg/kg, 0,72 mg/kg e 1,08 mg/kg.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,01 mg/kg.

43. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,03 mg/kg.

44. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,09 mg/kg.

45. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,18 mg/kg.

46. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,36 mg/kg.

47. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 0,72 mg/kg.

48. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada em uma dose de 1,08 mg/kg.

49. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a proteína de fusão ser administrada por meio de injeção subcutânea.

50. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado por a composição ser administrada ao indivíduo uma vez por semana.

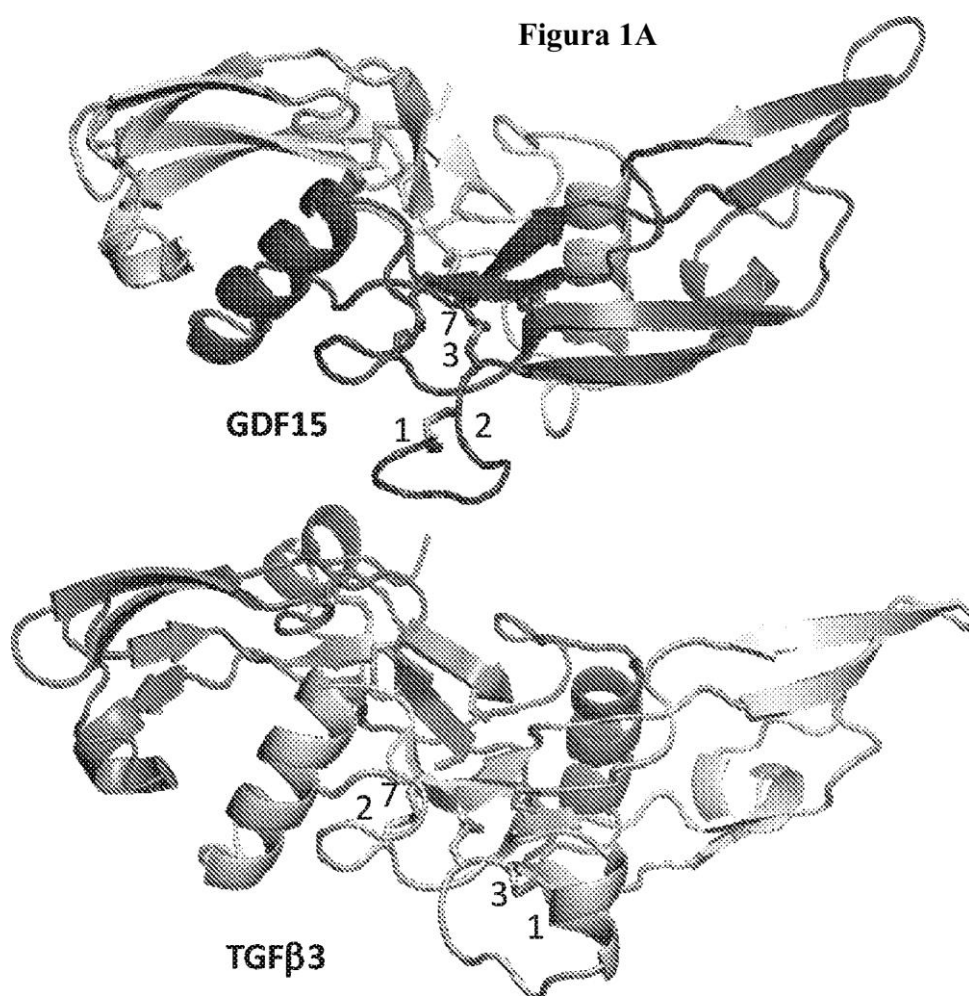
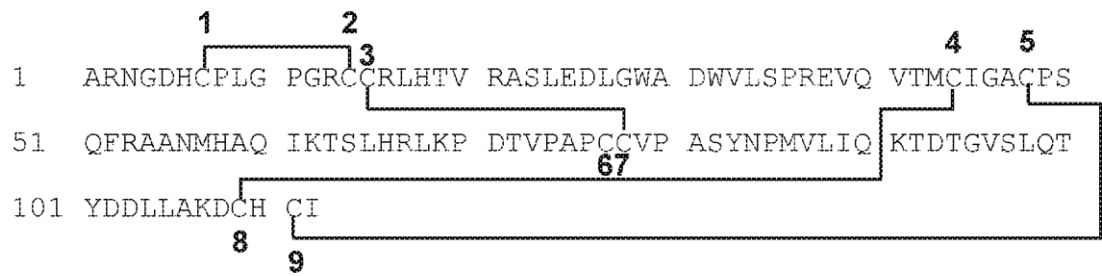
Figura 1A

Figura 1B

GDF15



TGFβ3

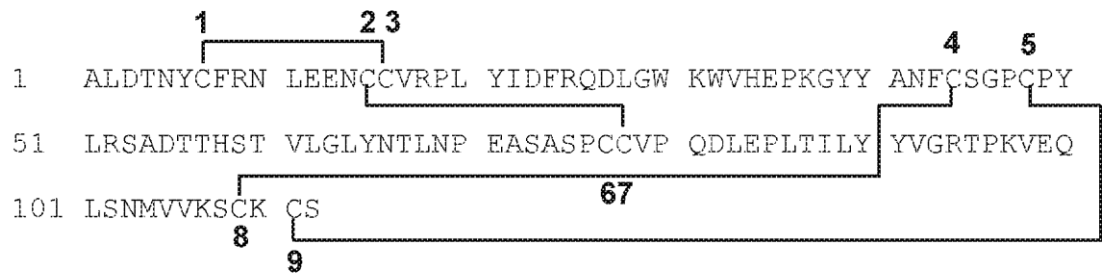


Figura 2

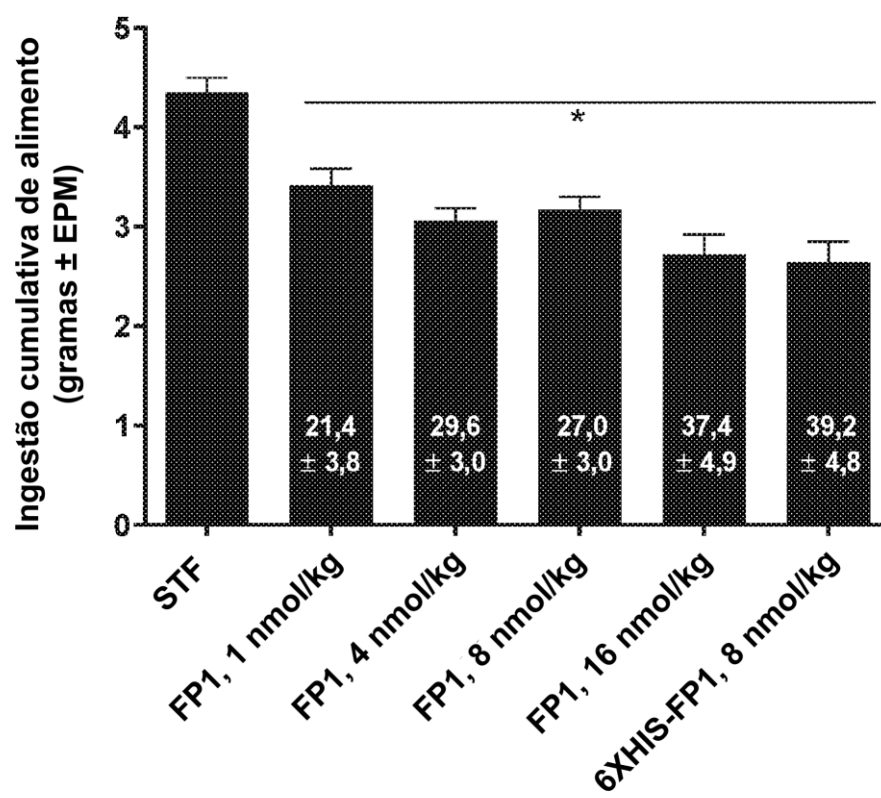


Figura 3

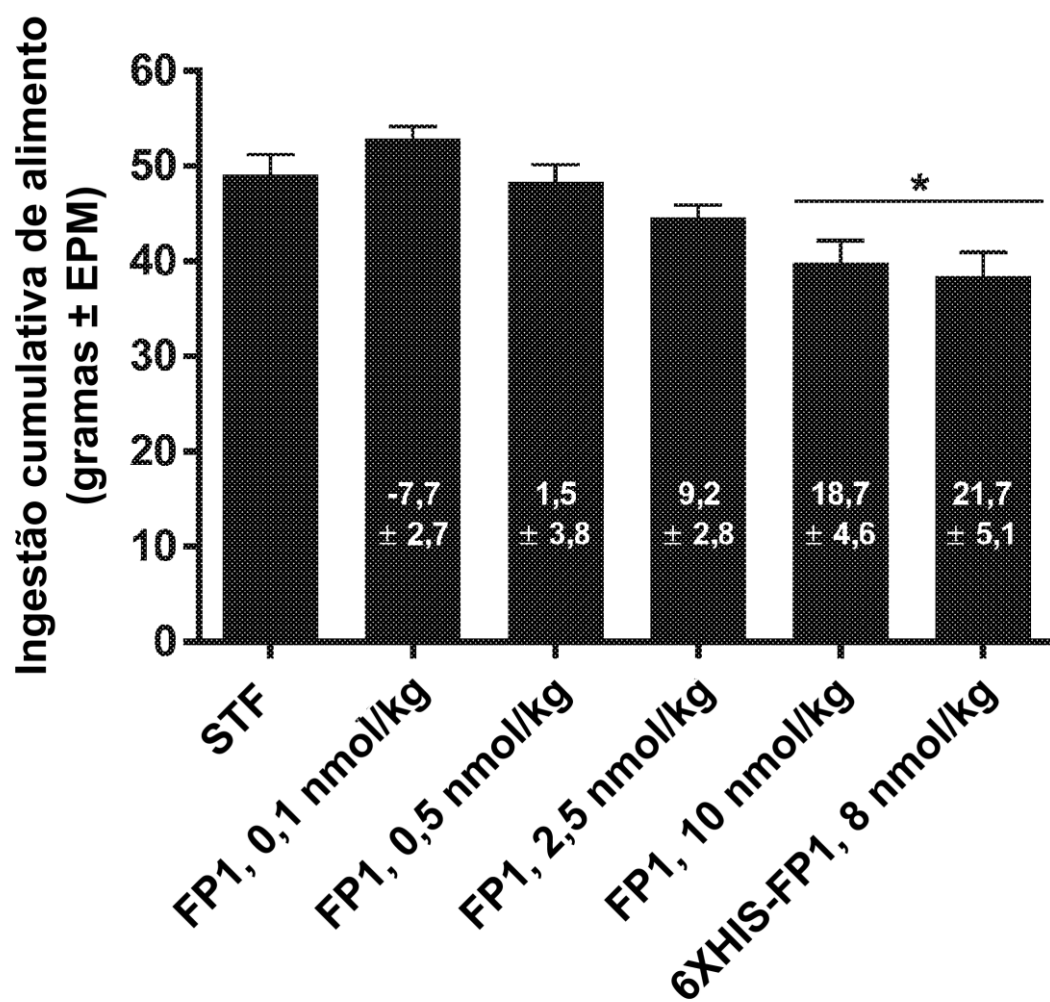


Figura 4

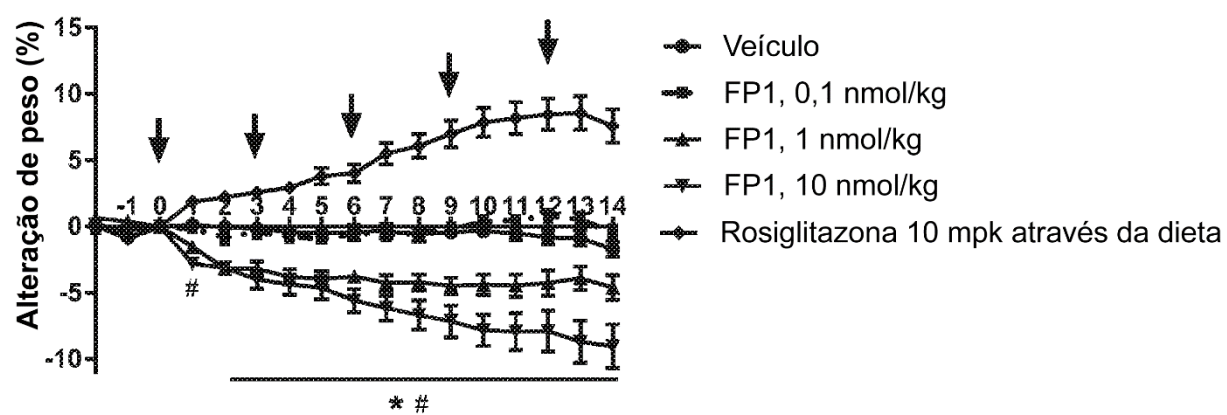


Figura 5A

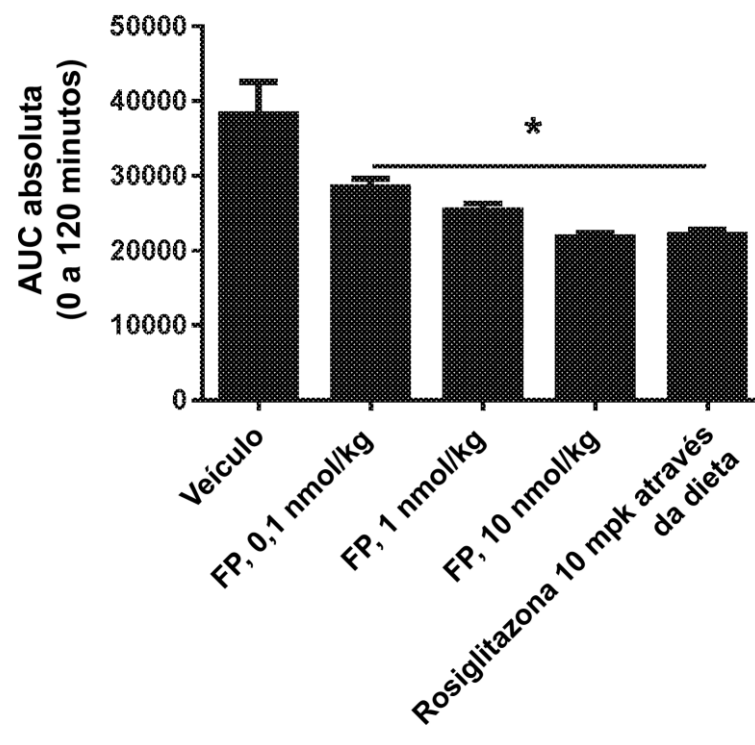


Figura 5B

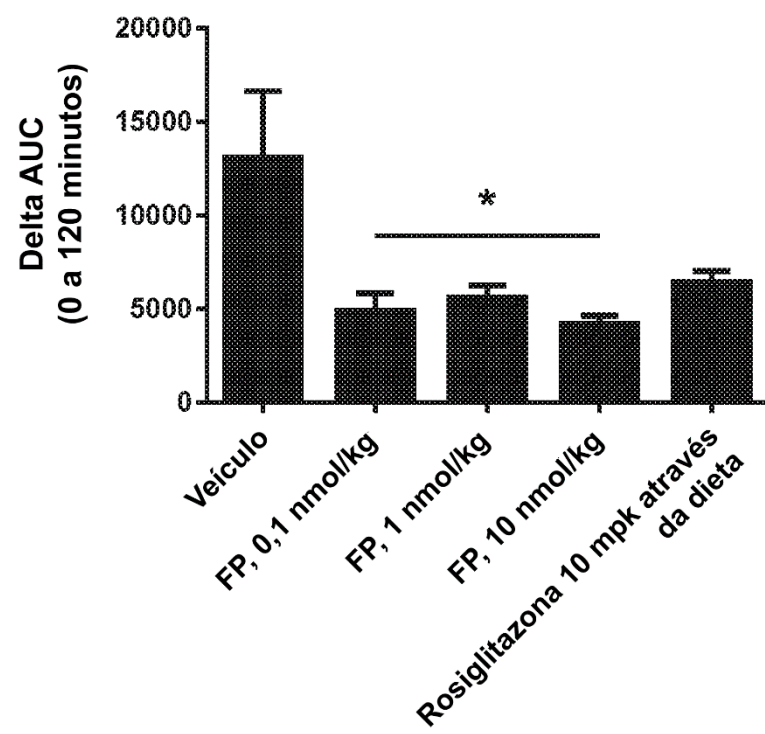


Figura 6

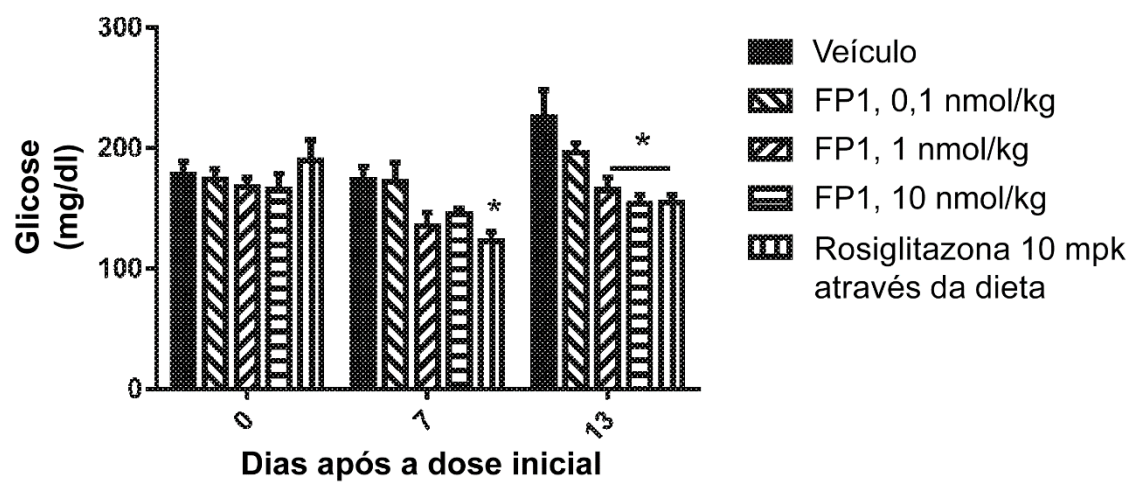


Figura 7

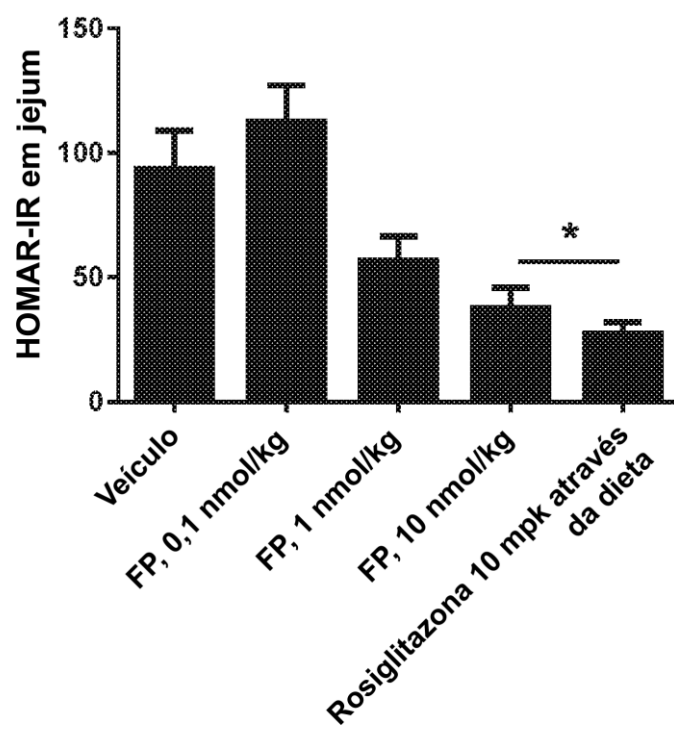


Figura 8

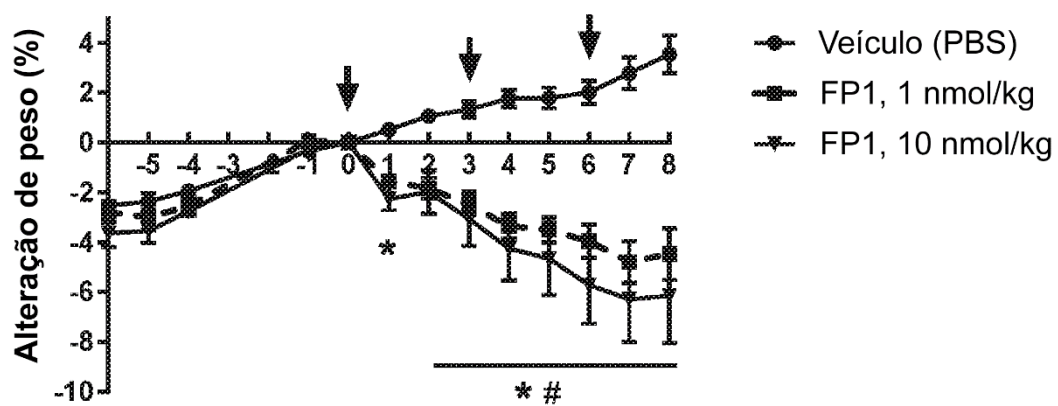


Figura 9

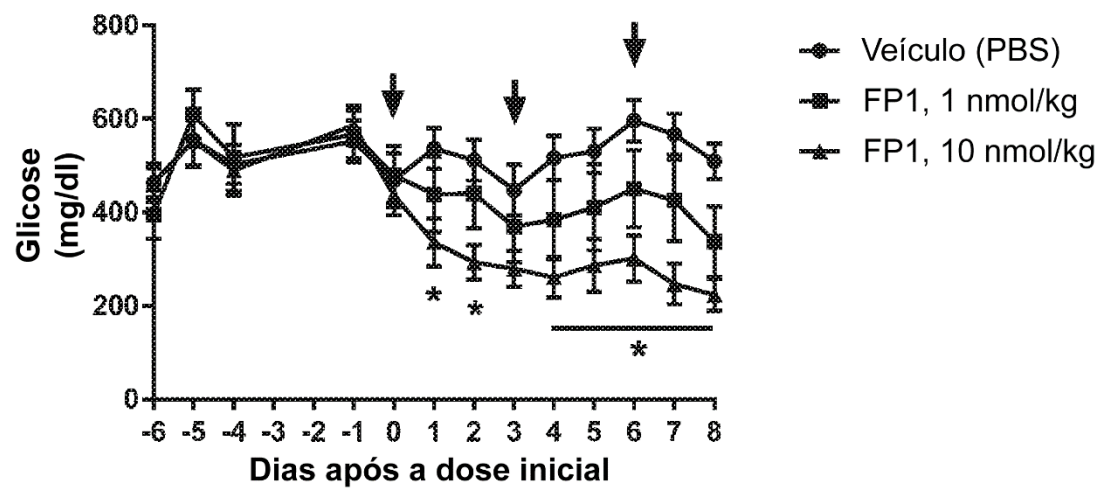


Figura 10

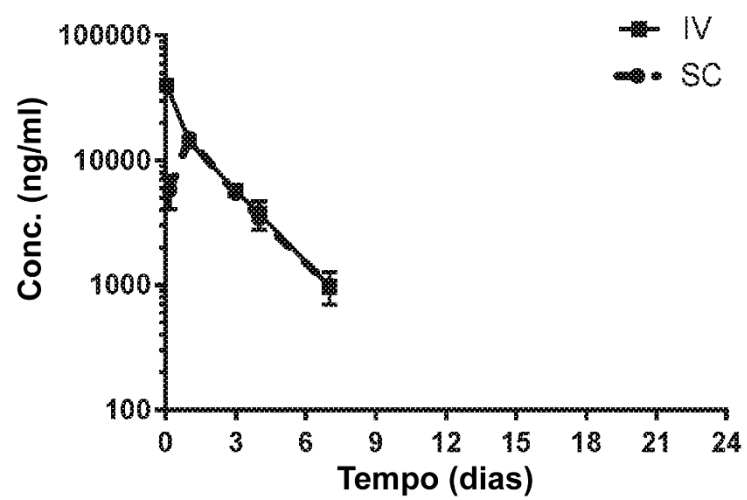


Figura 11

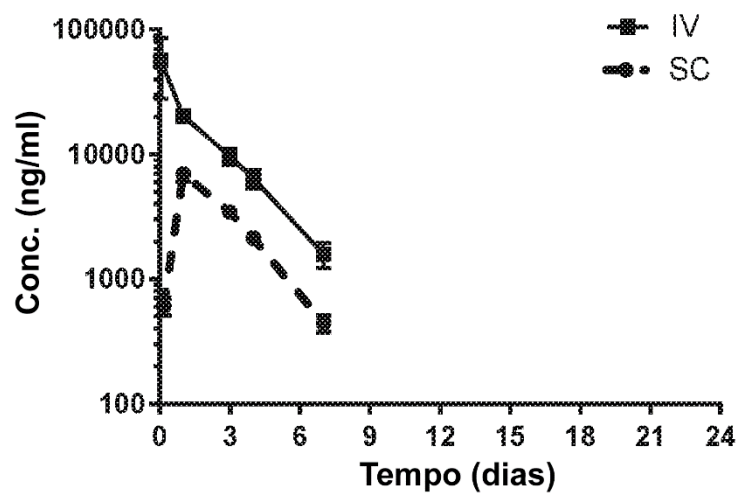


Figura 12

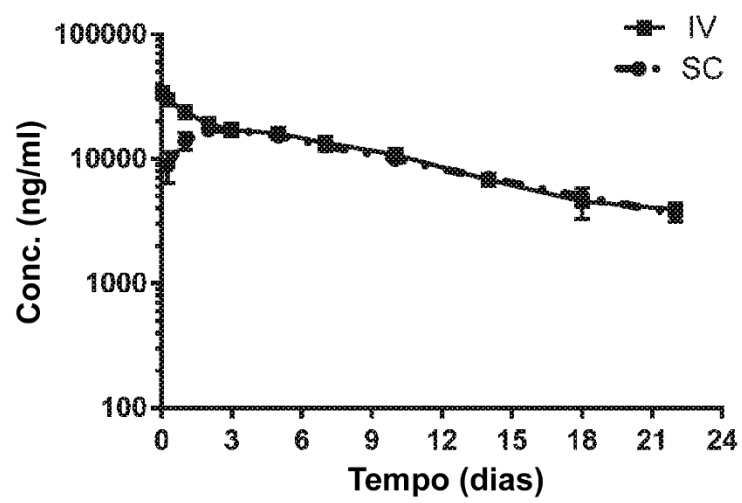


Figura 13

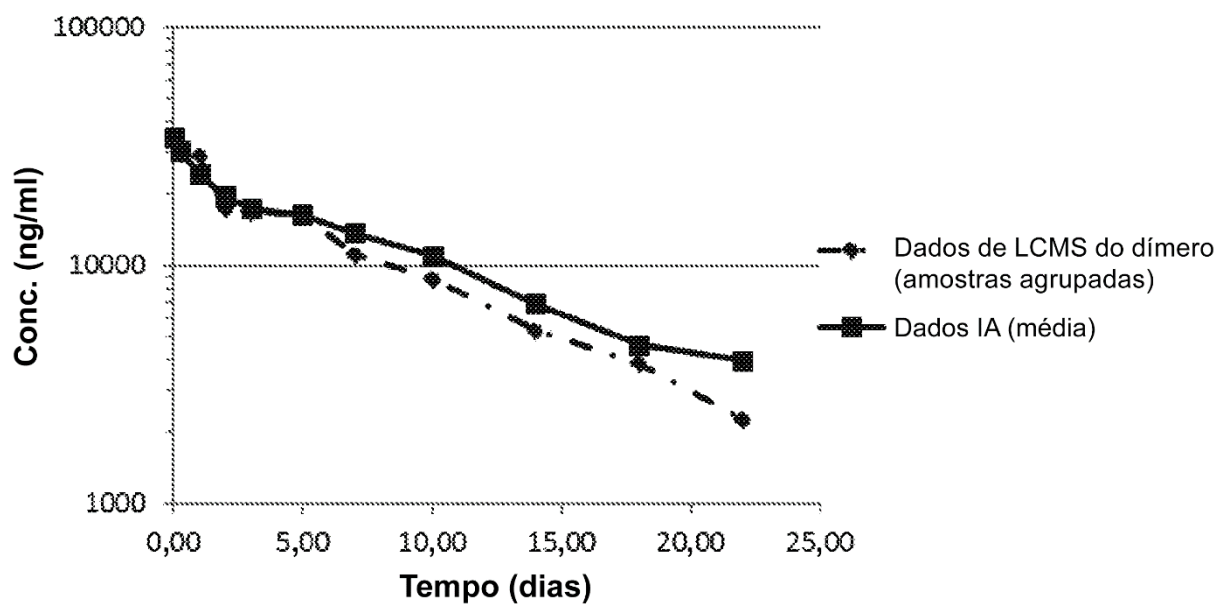


Figura 14

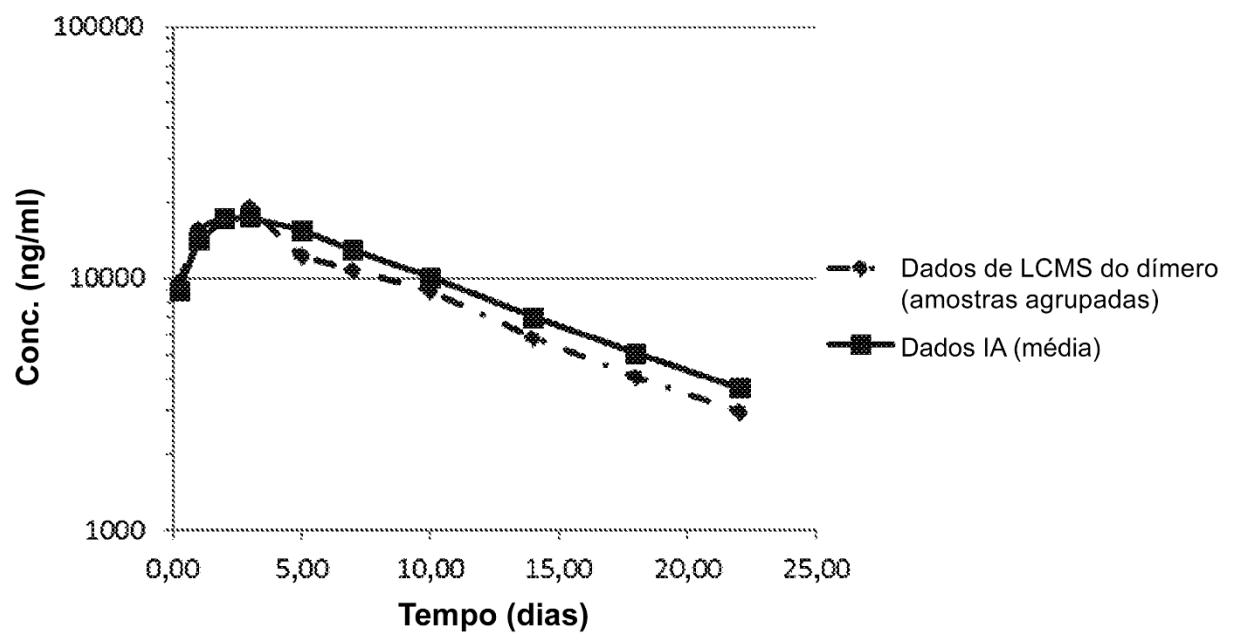


Figura 15

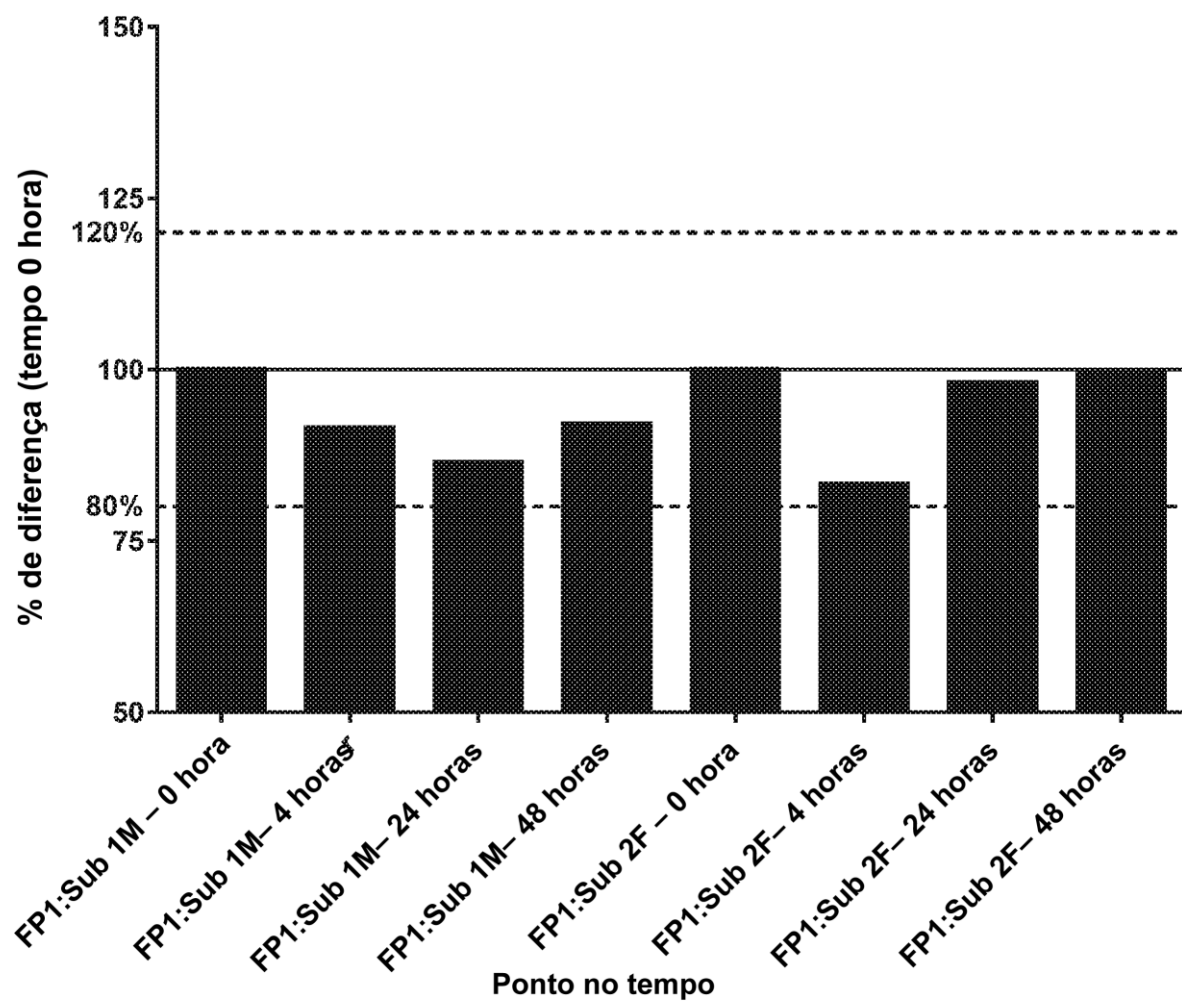


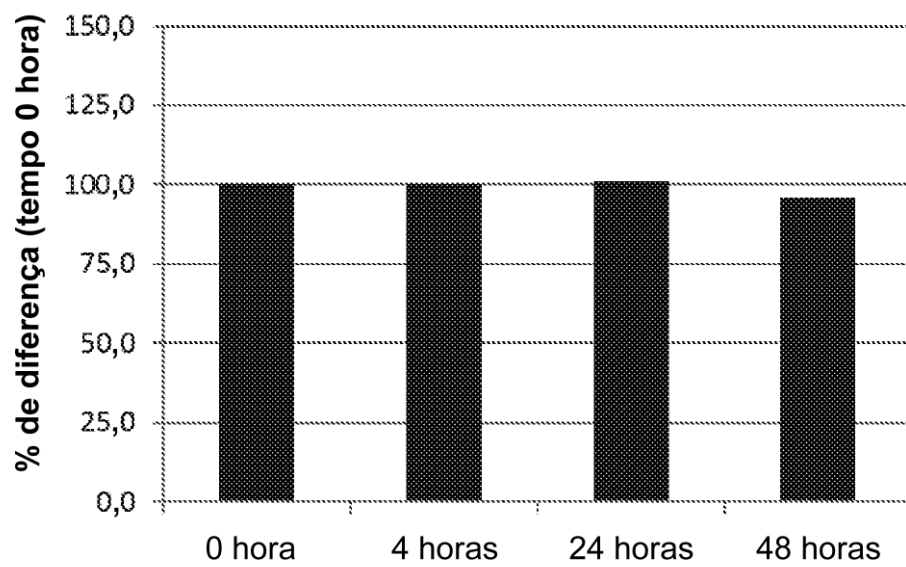
Figura 16

Figura 17

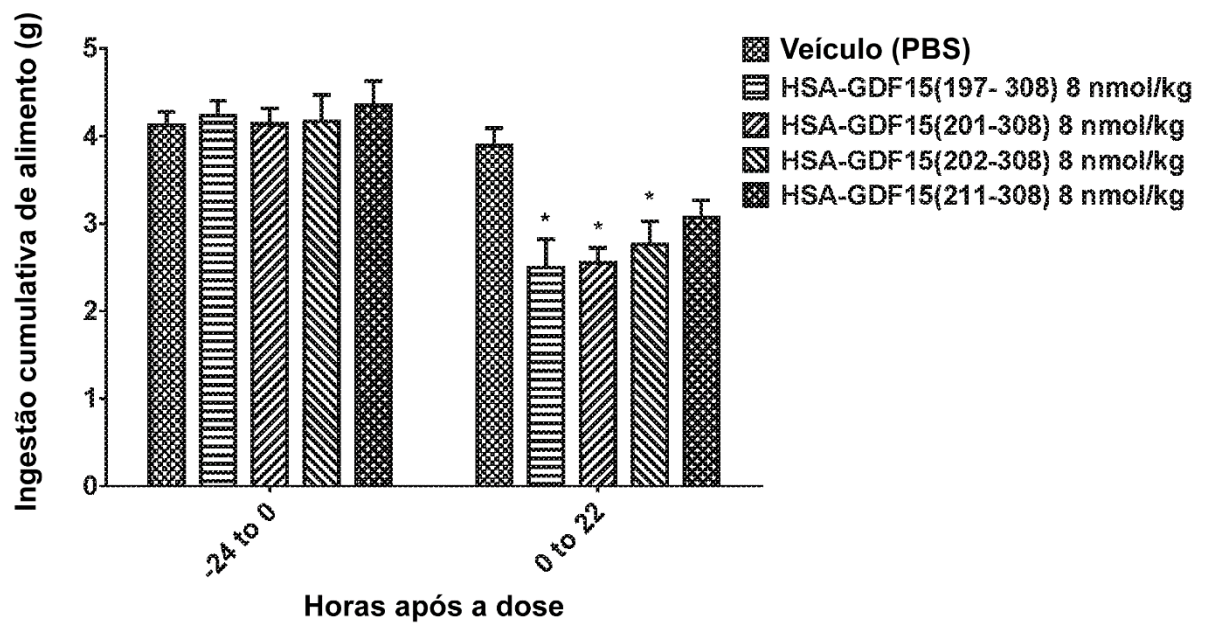


Figura 18

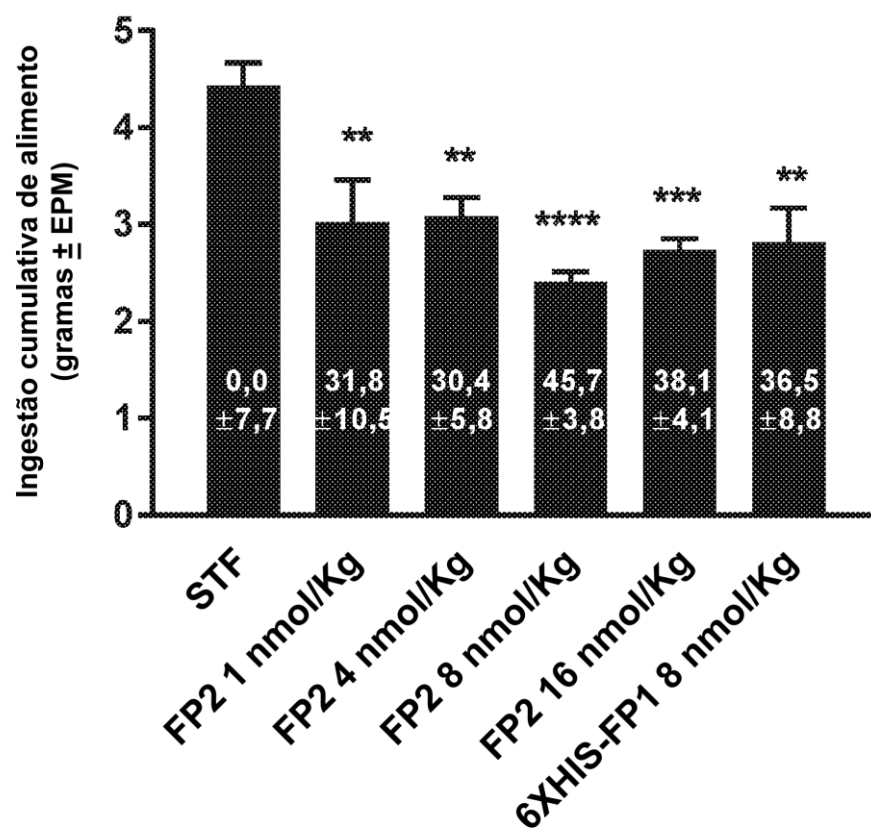


Figura 19

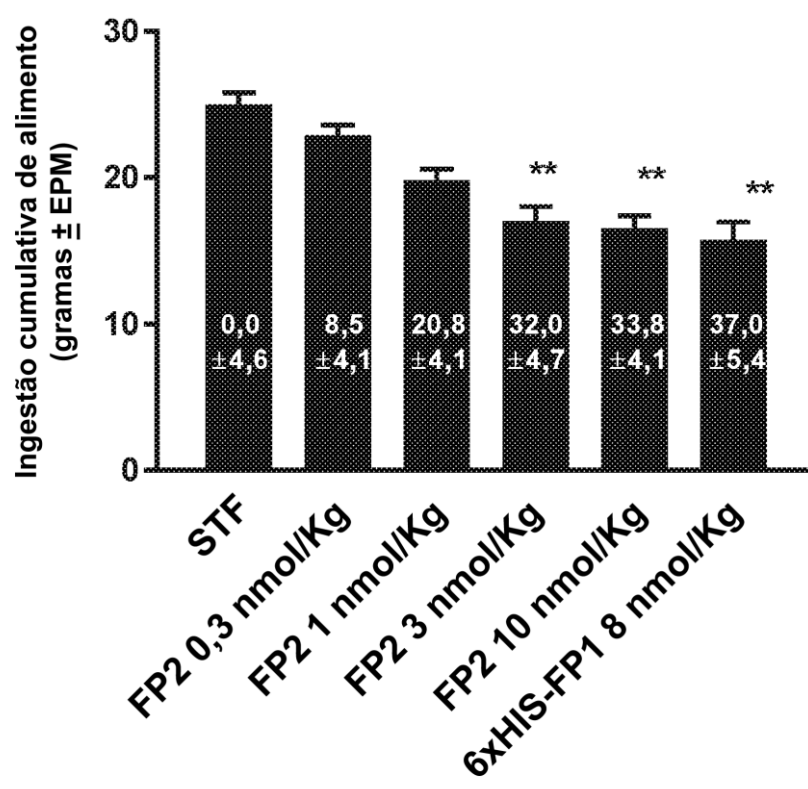


Figura 20

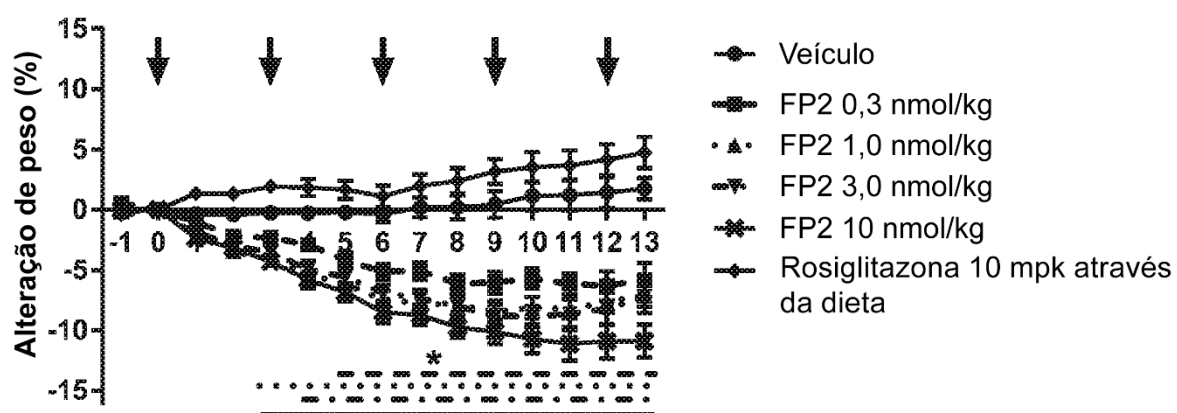


Figura 21A

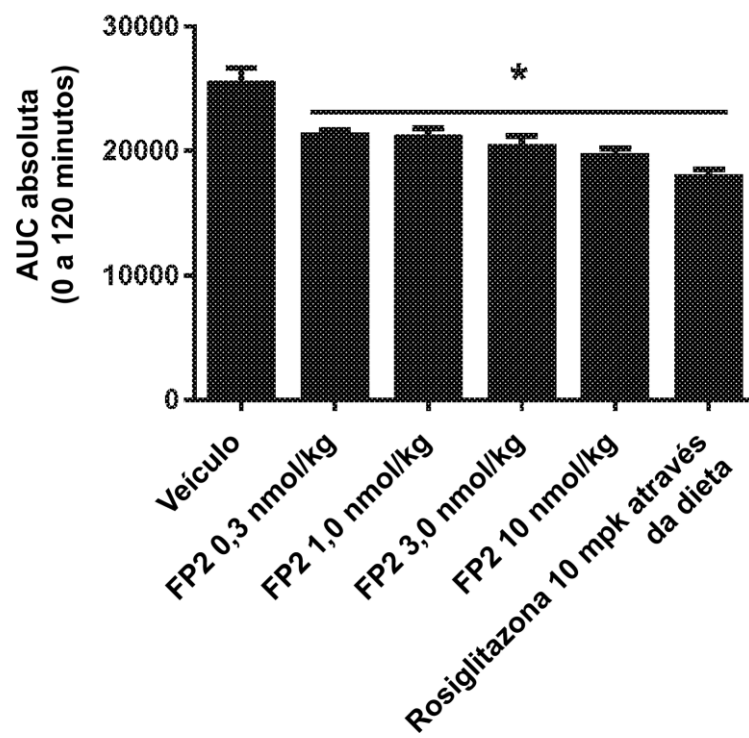


Figura 21B

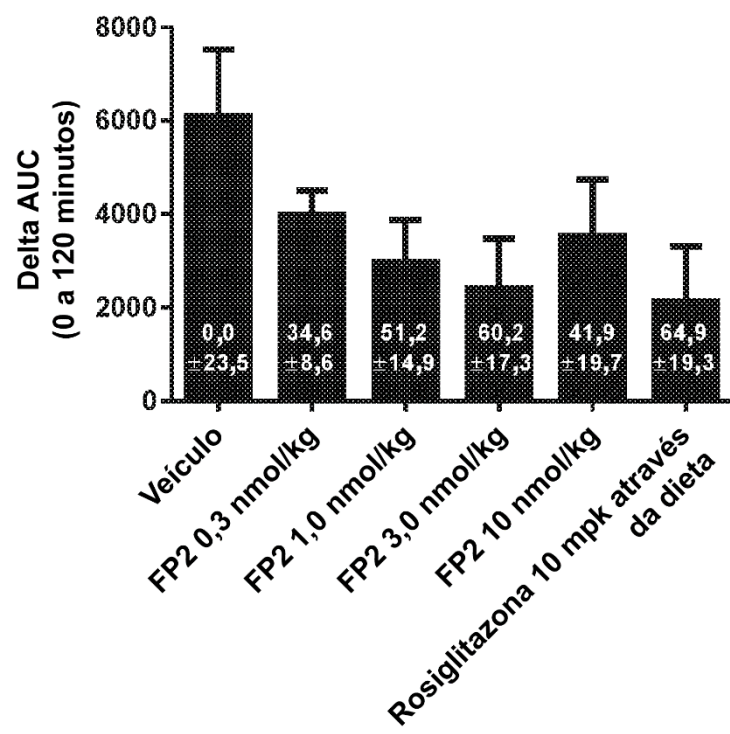


Figura 22A

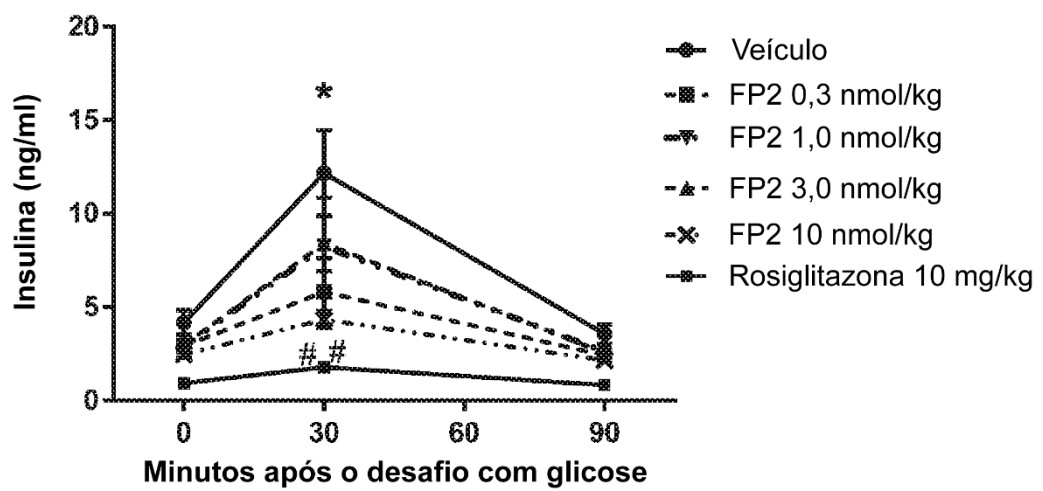


Figura 22B

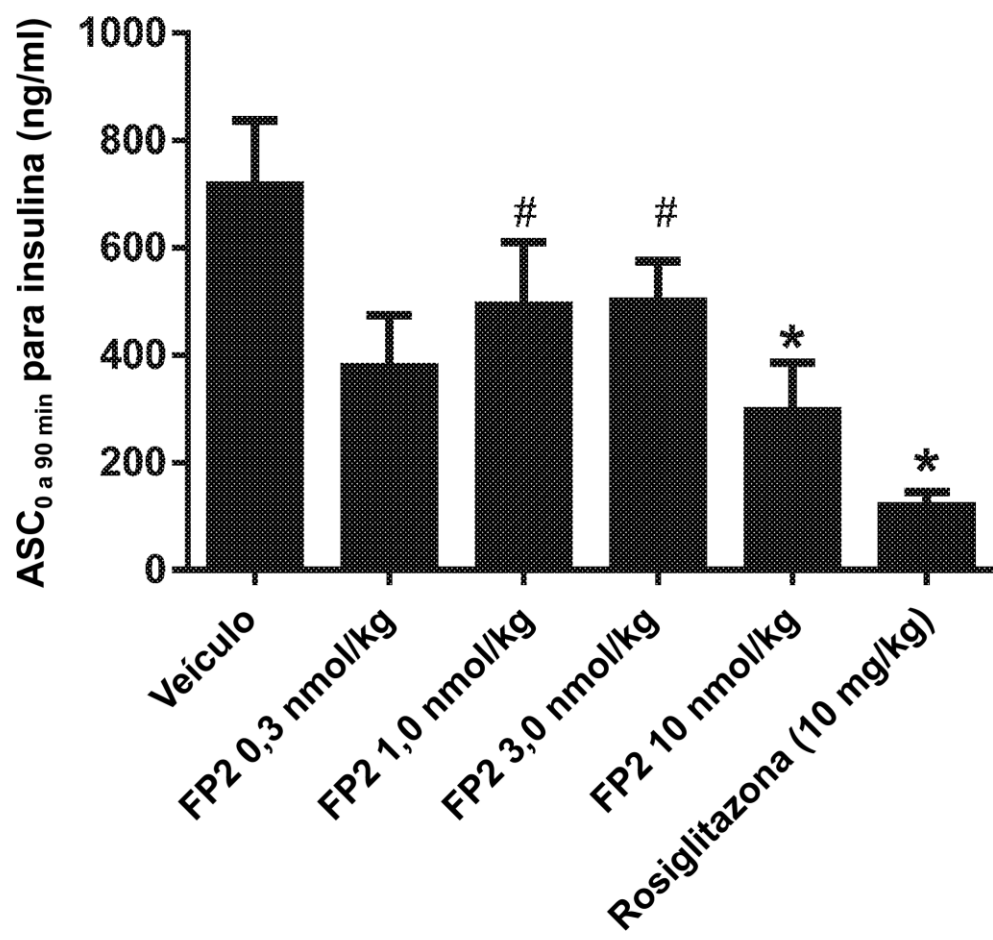


Figura 23

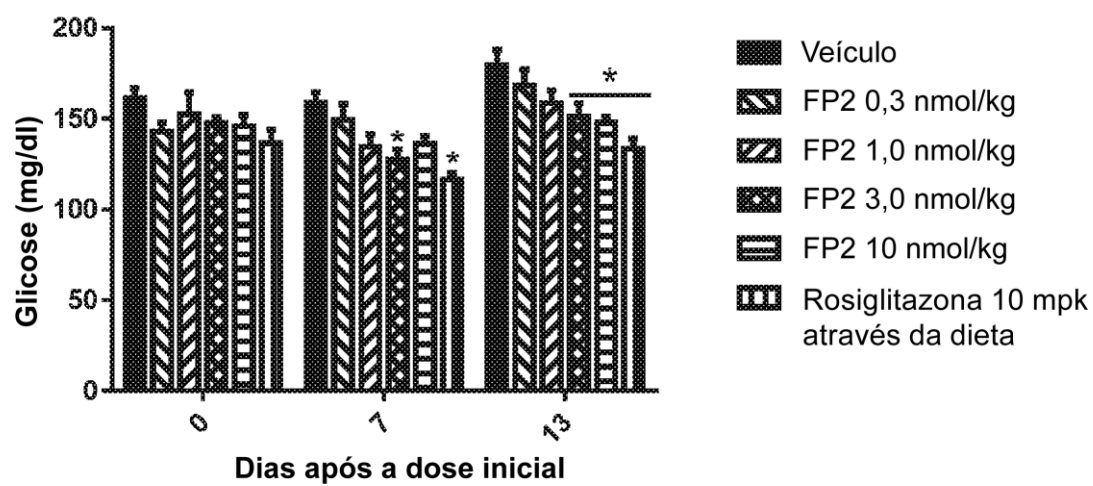


Figura 24

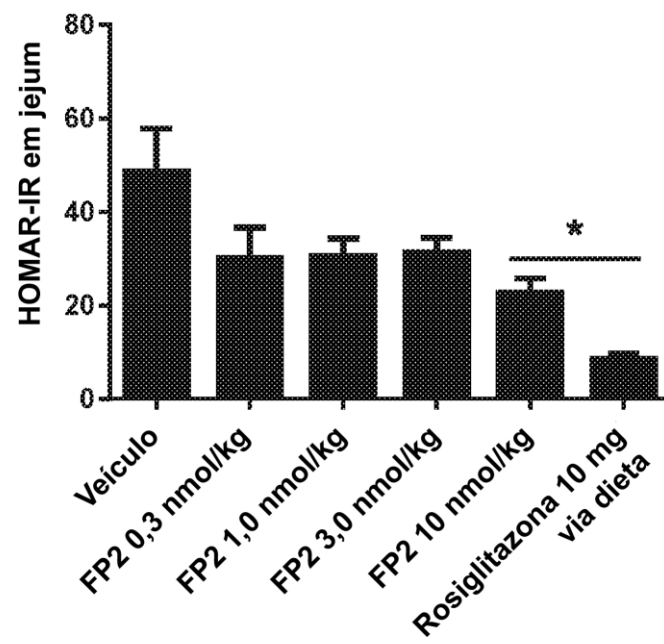


Figura 25

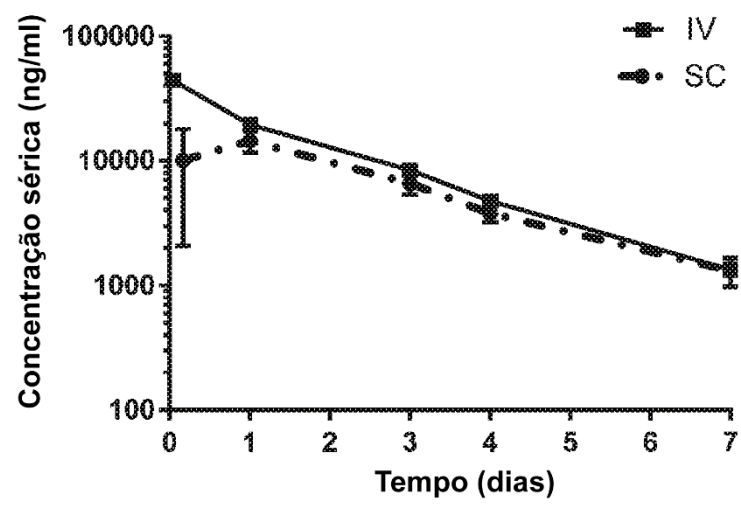


Figura 26

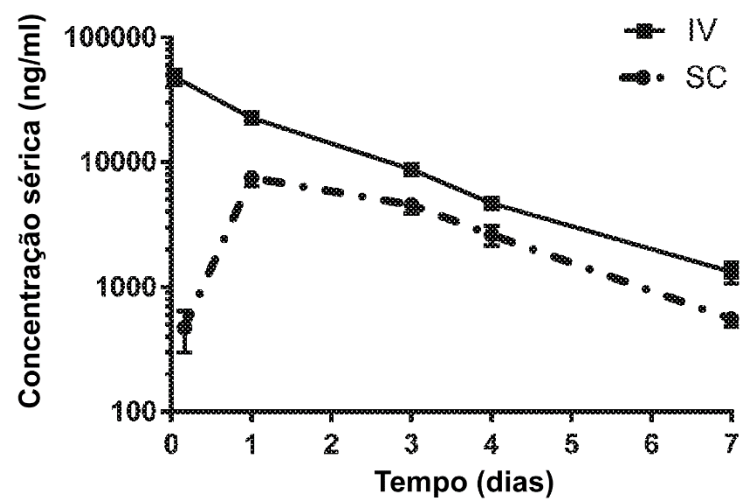


Figura 27

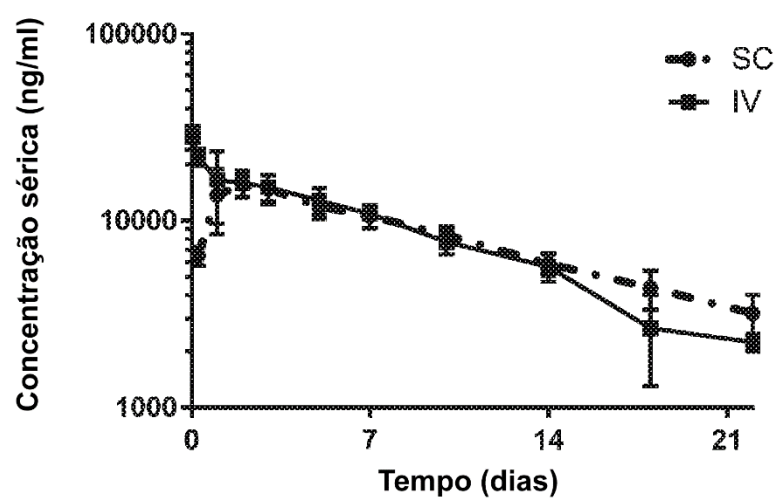


Figura 28

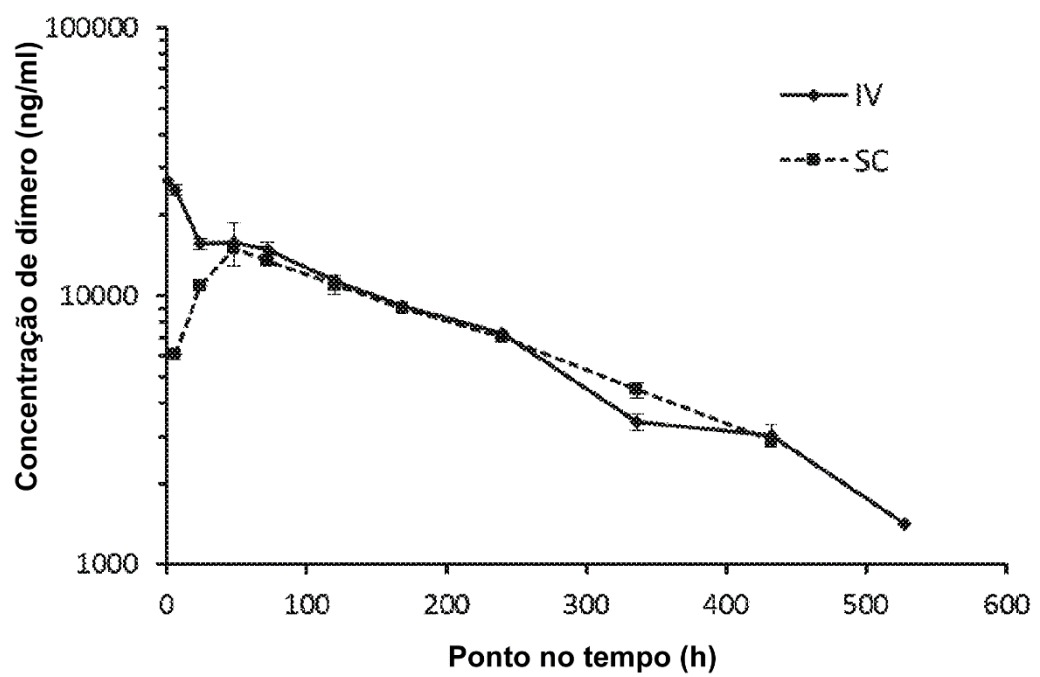
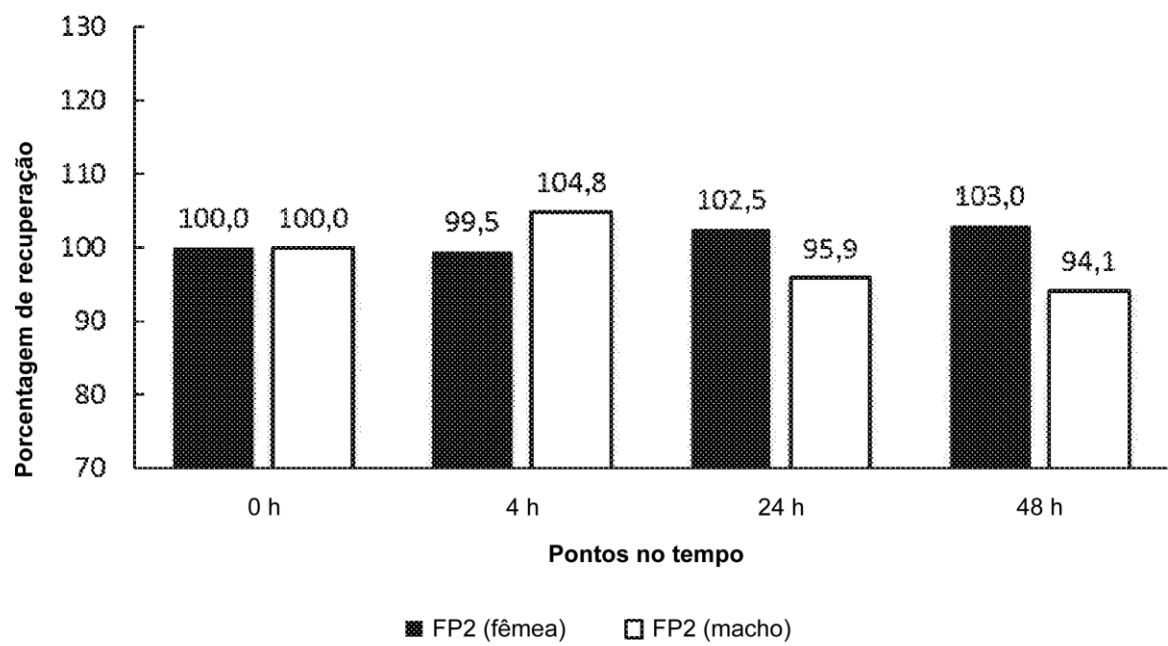


Figura 29

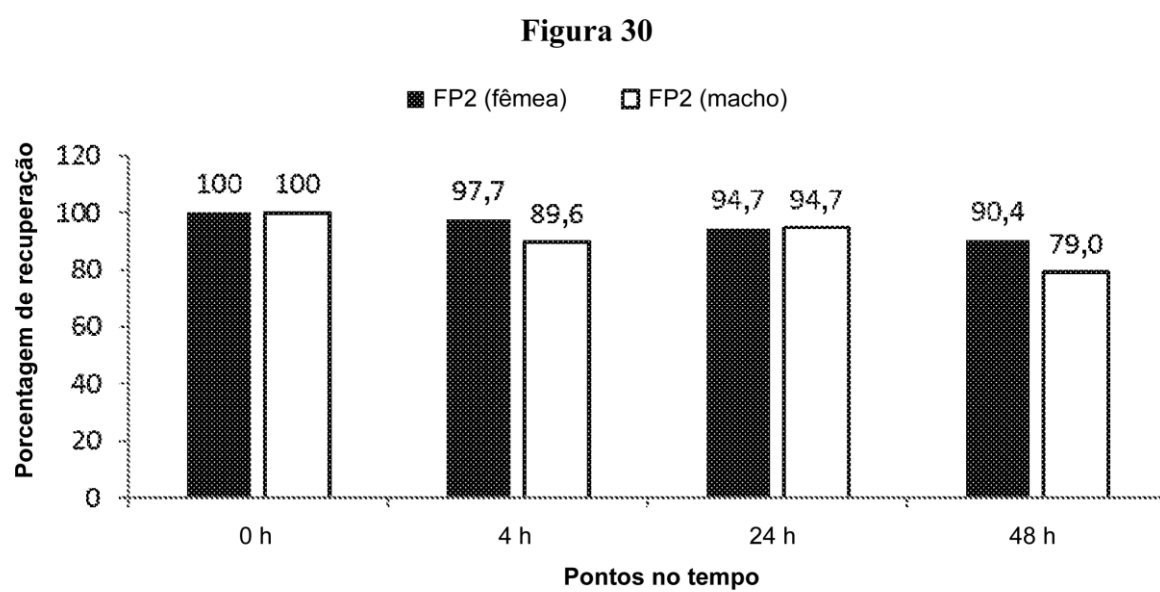


Figura 31

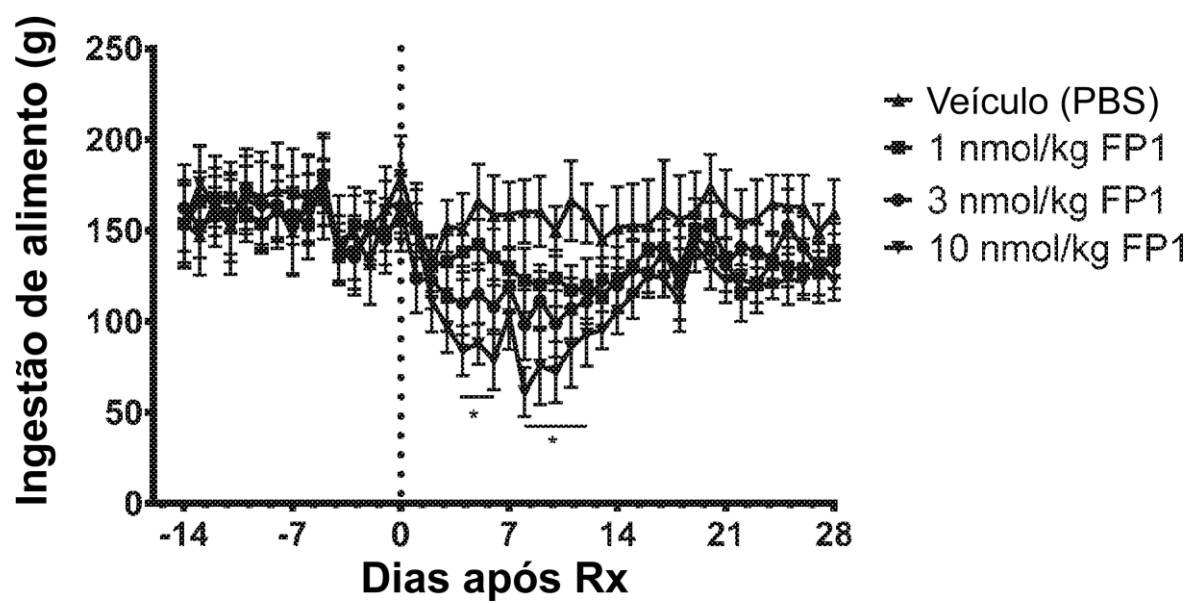


Figura 32

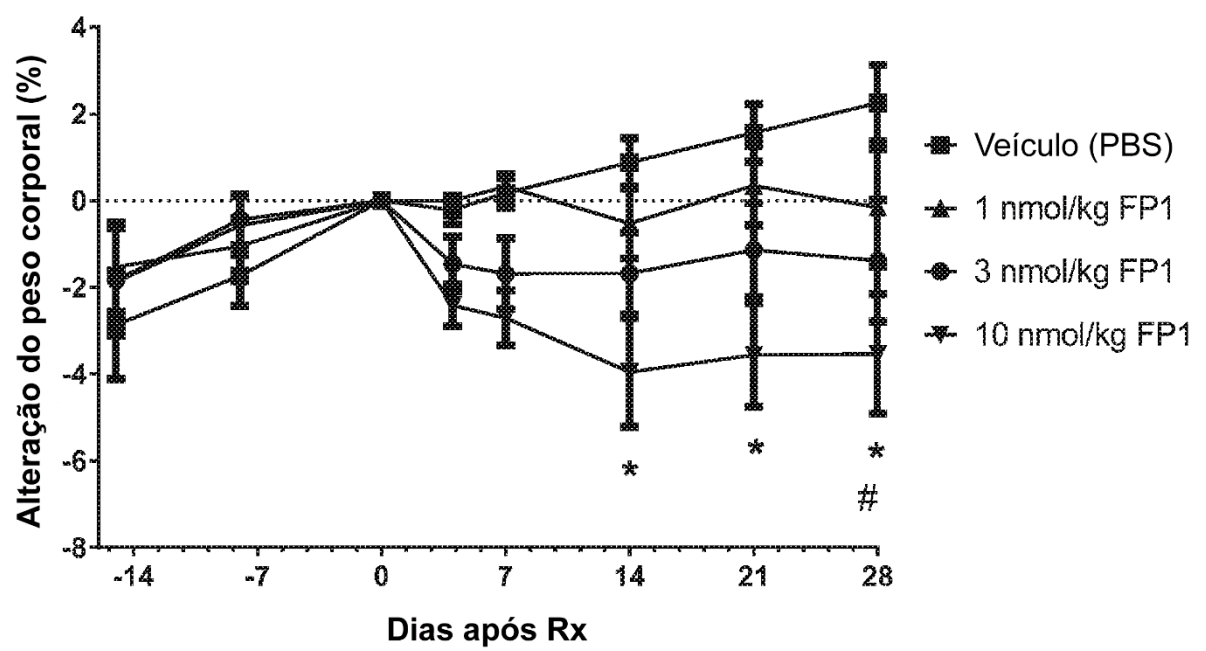


Figura 33

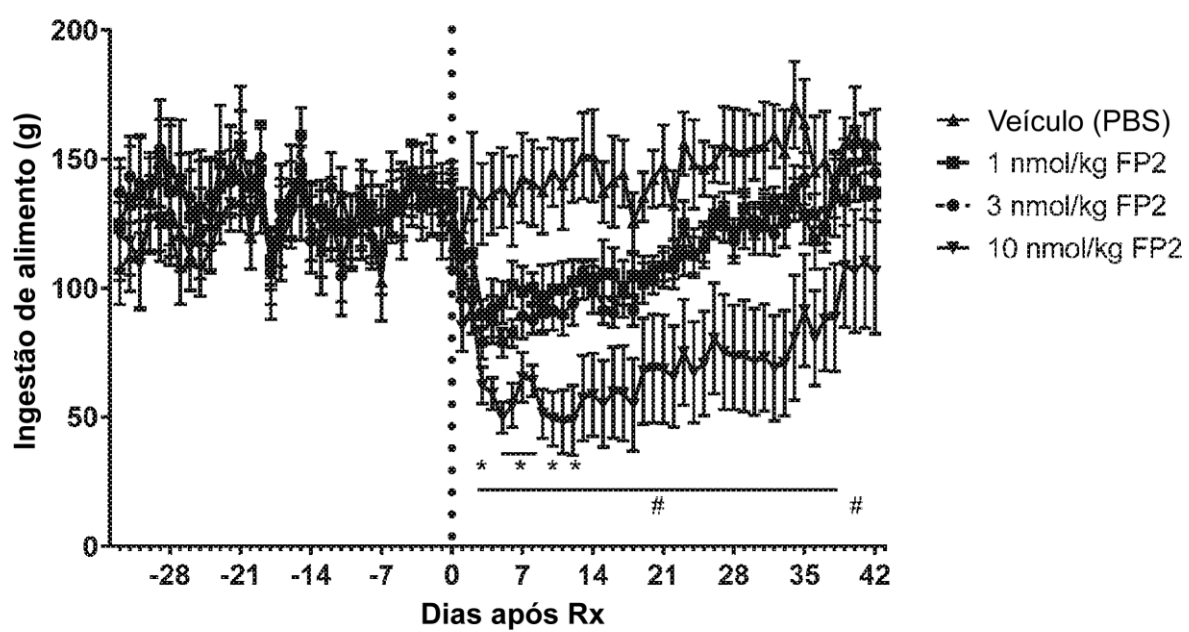


Figura 34

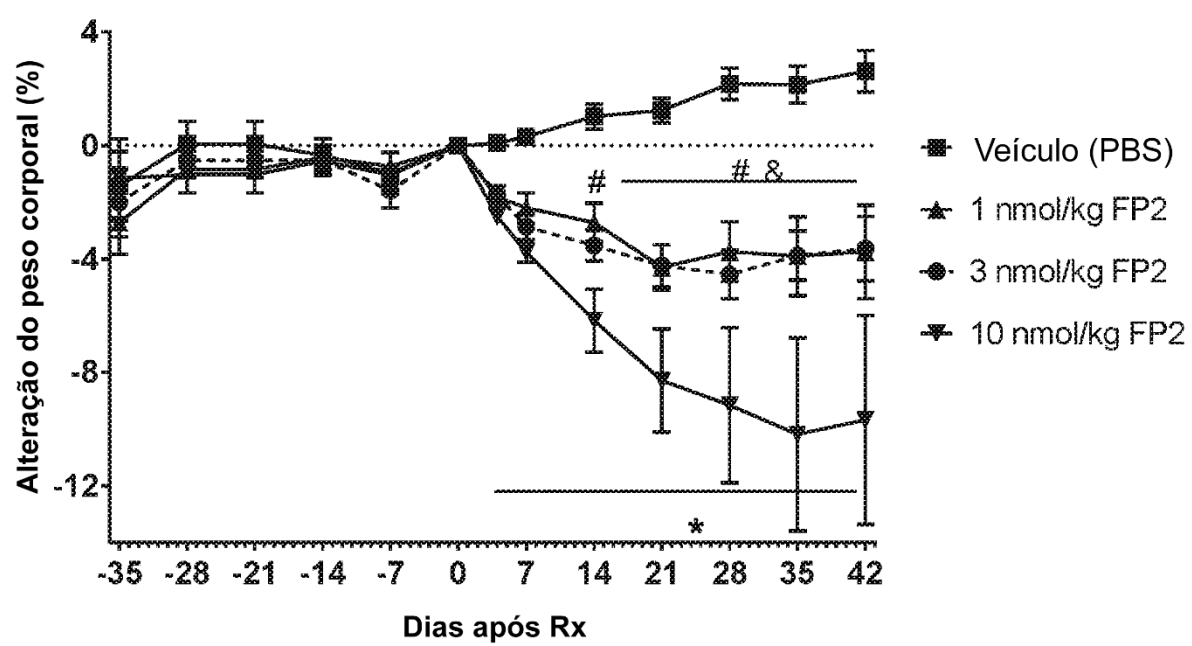


Figura 35



Figura 36

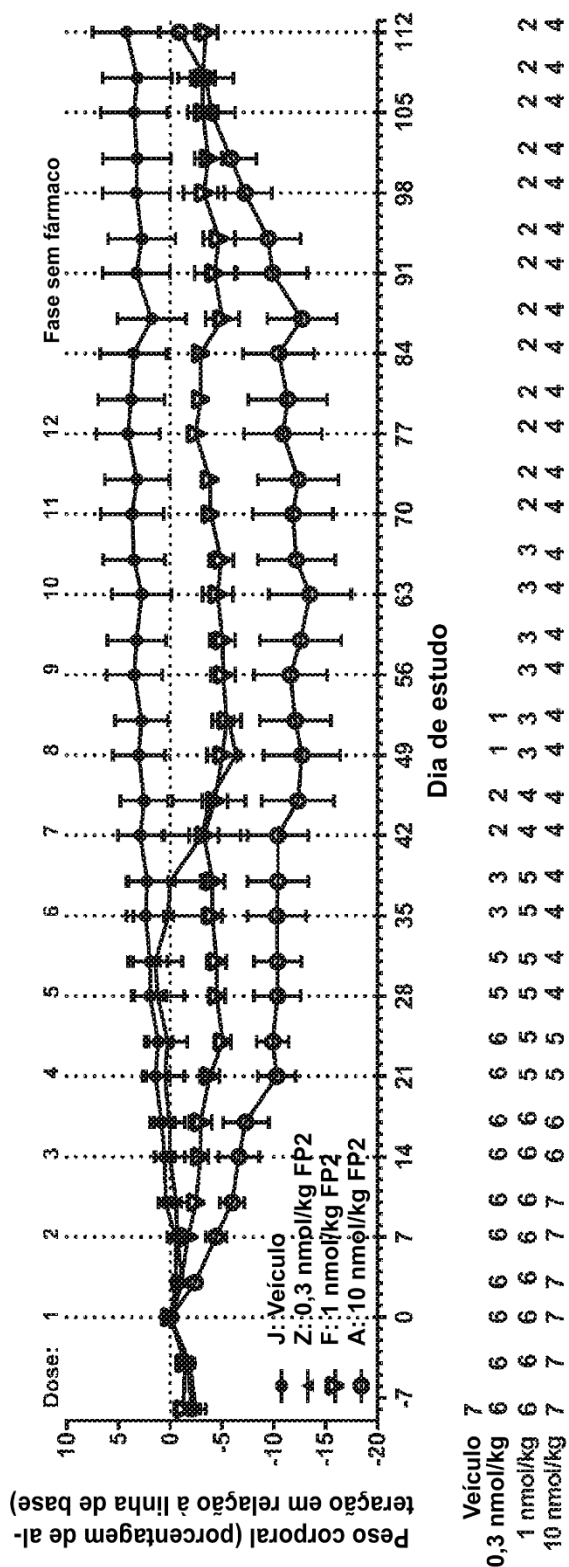


Figura 37

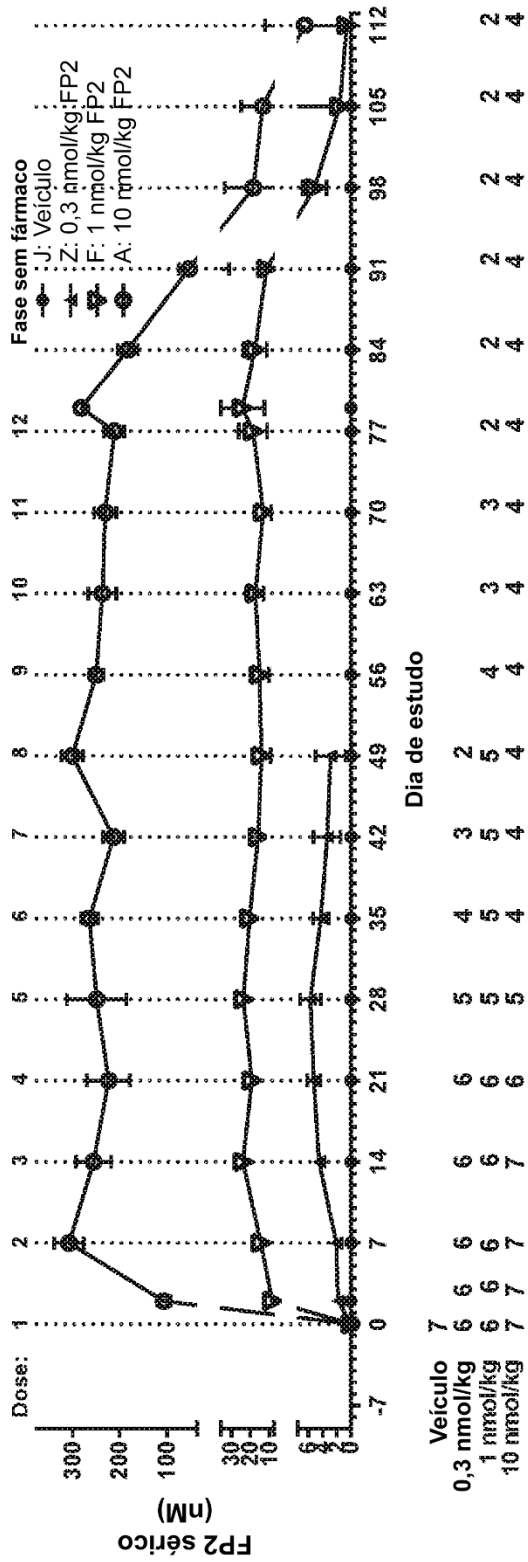
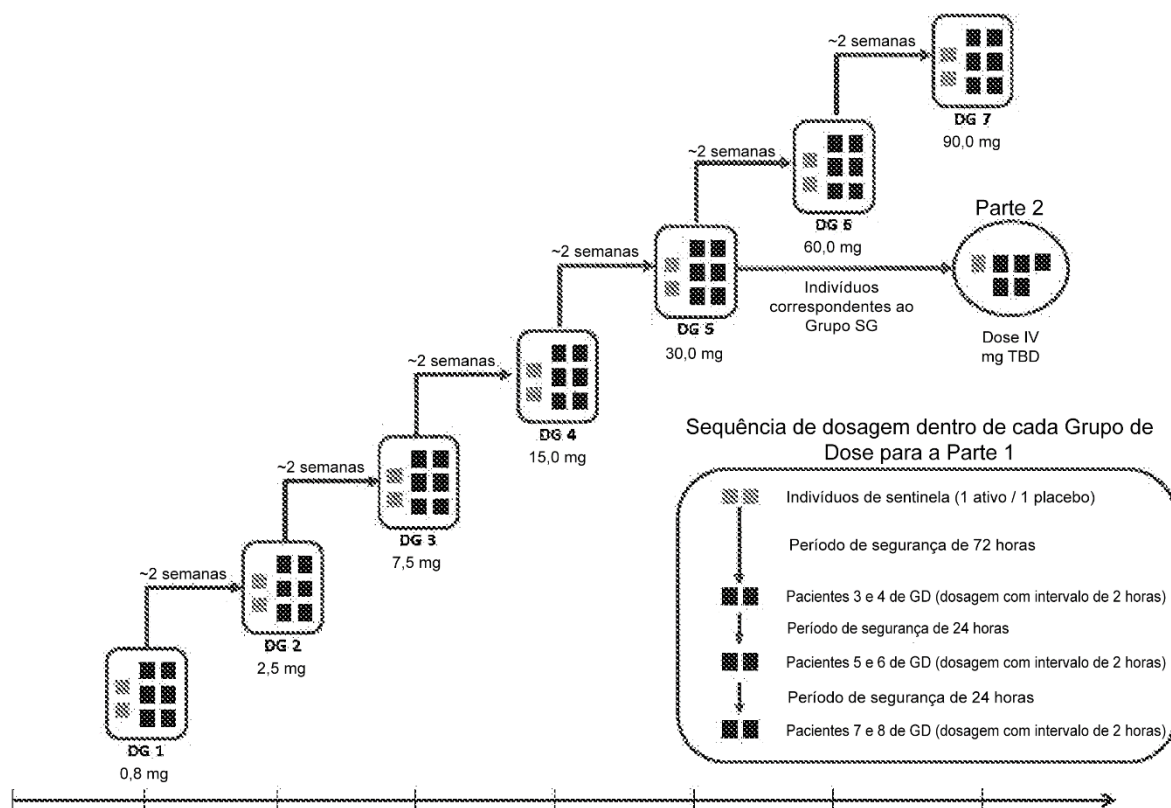


Figura 38



RESUMO

Patente de Invenção: **"ANÁLOGOS DE GDF15 E MÉTODOS PARA USO NA DIMINUIÇÃO DO PESO CORPORAL E/OU NA REDUÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTOS"**.

A presente invenção está relacionada às proteínas de fusão contendo uma proteína de extensão de meia-vida, um ligante e uma proteína GDF15 que funcionam como agonistas de GDF15. Esses agonistas de GDF15 podem ser úteis no tratamento de obesidade, redução do peso corporal, diminuição da ingestão de alimentos ou diminuição do apetite.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P253644 ListSeq (1.5 RPI 2640).txt
- Data de Geração do Código: 20/09/2021
- Hora de Geração do Código: 15:34:20
- Código de Controle:
 - Campo 1: CE46263D2D247AE0
 - Campo 2: 350D60A53D8C4896