



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93581 (13) C2  
(51) МПК (2011.01)  
A61K 38/19  
A61P 25/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ, ЩО МІСТИТЬ G-CSF, ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ І ЛІКУВАННЯ ДІАБЕТИЧНОЇ ПЕРИФЕРИЧНОЇ НЕВРОПАТІЇ

1

(21) a200904262  
(22) 29.10.2007  
(24) 25.02.2011  
(86) PCT/KR2007/005353, 29.10.2007  
(31) 10-2006-0105684  
(32) 30.10.2006  
(33) KR  
(46) 25.02.2011, Бюл.№ 4, 2011 р.  
(72) КІМ КЬОНГ-СУ, KR, ЖІН ЖІ-ЙОНГ, KR  
(73) ДОНГ-А ФАРМ. КО., ЛТД., KR  
(56) JUNG K.H. ET AL.: 'Granulocyte-to-colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation' BRAIN RESEARCH 09 January 2006, pages 190 - 201, XP025064587  
HUANG P. ET AL.: 'Autologous Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood Mononuclear Cells Improves Critical Limb Ischemia in Diabetes' DIABETES CARE vol. 28, September 2005, pages 2155 - 2160, XP008106112

2

WO 2004/091661 A1, 28.10.2004

(57) 1. Засіб для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії, що містить G-CSF (гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор) як активний інгредієнт.  
2. Засіб за п. 1, який відрізняється тим, що G-CSF одержаний і виділений з природного або рекомбінантного джерела.  
3. Засіб за п. 1, який відрізняється тим, що G-CSF являє собою рекомбінантний людський гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (rhG-CSF).  
4. Засіб для регенерації периферичного нерва, що містить G-CSF (гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор) як активний інгредієнт.  
5. Засіб за п. 4, який відрізняється тим, що G-CSF одержаний і виділений з природного або рекомбінантного джерела.  
6. Засіб за п. 4, який відрізняється тим, що G-CSF являє собою рекомбінантний людський гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (rhG-CSF).

### Галузь техніки

Даний винахід стосується засобу для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії, що містить гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (G-CSF) як активний інгредієнт.

### Рівень техніки

Діабет являє собою провідне з відомих захворювань дорослого населення у світі, і нещодавно в Кореї його розповсюдженість досягла 7-10% з швидким ростом економічних збитків. Крім того, захворювання стало провідною причиною смертності серед людей віком 60-80 років.

Діабет являє собою синдром, що виникає внаслідок нездатності до продукування інсуліну, функція якого полягає у забезпеченні входження глюкози в клітини, або інсулін нездатний функціонувати належним чином, тобто глюкоза не потрапляє до клітин. За таких обставин, глюкоза, яка не потрапила до клітин, залишається в крові. Таким чином, кров стає гіперглікемічною, і глюкоза виводиться з сечею. Тривала гіперглікемія призводить до порушення метаболізму білків і ліпідів в

організмі та спричиняє фізіологічні і біохімічні проблеми в організмах, таким чином, спричиняючи ускладнення.

Діабетична периферична невропатія є одним з трьох головних ускладнень діабету, поряд з діабетичною ретинопатією і діабетичною нефропатією. Захворювання може бути безсимптомним, але може виникати виражений біль або втрата чутливості ніг, слабкість м'язів або автономна невропатія. До того ж, лікування є дуже складним.

Розповсюдженість діабетичної периферичної невропатії становить 5-60 %, що демонструє велику різницю у даних в залежності від дослідників, і у хворих на діабет становить приблизно 12 %. Повідомлялося, що після 25 років захворювання на діабет розповсюдженість становить приблизно 60%.

Звичайні симптоми діабетичної периферичної невропатії проявляються, як парестезія, наприклад, нечутливість рук і стоп, звичайно стоп, біль у формі відчуття печіння, відчуття поколювання, відчуття ходіння по піску, або відчуття, що підлога

(13) C2

(11) 93581

(19) UA

вкрита якимсь матеріалом, втраті чутливості, холодні стопи, навіть влітку.

На ранній стадії захворювання можуть спостерігатися тільки симптоми парестезії, які виявляються стимуляцією чутливих нервів, без зміни чутливості шкіри. Однак, при подальшому ушкодженні сенсорного нерву по мірі прогресу захворювання, на шкірі в ділянці, якою управляє сенсорний нерв, можуть розвиватися відчуття температури, болю, вібрації або дотику.

Діабетична периферична невропатія спричиняється високим рівнем цукру в крові, таким чином, що відбуваються біохімічна і конформаційна зміни (атрофія аксонів, набрякання вузлів, мікросудинні зміни і т.п.) всередині нервових клітин. Однак, деталі цього процесу поки не з'ясовані.

Як спосіб лікування такої діабетичної периферичної невропатії, згадуються терапія у формі блокування нервів, контроль метаболізму, фармакотерапія і т.п. Однак, серед фармакотерапевтичних засобів, ні один лікарський засіб не є ефективним з точки зору істотного покращення симптомів, в також істотною мірою вилікування.

Таким чином, дослідження механізму діабетичної периферичної невропатії та істотна розробка лікарських засобів, що базуються на дослідженнях, є вкрай необхідними.

Тим часом, гранулоцитарний колоніє-стимулювальний фактор (G-CSF) здійснює специфічний вплив на нейтрофільні клітини-прекурсори, сприяє проліферації та диференціації нейтрофілів, і підсилює антитіло-залежну клітинну цитотоксичність нейтрофілів. Крім того, функції G-CSF також включають індукцію опосередкованого IgA фагоцитозу і збільшення здатності до продукування супероксиду.

Таким чином, G-CSF покращує відповідь на хемотаксичний пептид, який доведено відіграє роль в пригніченні інфекції і зменшенні гарячки. До того ж, G-CSF виконує функції на більш диференційованих мієлоїдних клітинах, в порівнянні з іншими CSF, такими як гранулоцитарно-макрофагальний КСФ (GM-CSF). Таким чином, очікується, що він буде здійснювати *in vivo* менший вплив на бластні клітини у пацієнтів з лейкемією.

Відповідно, G-CSF широко застосовується як лікарський засіб для індукування нейтрофілів в протираковій хімотерапії, терапії мегадозами протиракових лікарських засобів, комбінованій терапії з радіотерапією, і після пересадки кісткового мозку (Julie M. Vores et al., *Clinical Applications of Hematopoietic Growth Factors*, Journal of Clinical Oncology, 13 : 1023-1035, 1995).

G-CSF здебільшого застосовують як гемопоетичний засіб, вплив якого переважно полягає в проліферації і диференціації нейтрофілів, при нейтропенії, спричиненій пересадкою кісткового мозку і введенням протиракових лікарських засобів. Також, його застосовують для збільшення кількості нейтрофілів у пацієнтів з вираженою хронічною нейтропенією, такою як мієлодиспластичні синдроми, апластична анемія, або вроджена, циклічна, ідіопатична нейтропенія і ВІЛ-інфекція, а також для профілактики інфекцій, пов'язаних з нейтропенією.

Нейтрофіли являють собою фагоцитарні клітини, що відіграють важливу роль в механізмі захисту хазяїна. У випадку нормальної імунної функції і гемопоетичного статусу, кількість нейтрофілів зростає в ході інфекції. Стан, при якому кількість нейтрофілів зменшується до 1500 клітин/мм<sup>2</sup> або менше, позначають як нейтропенія. Якщо кількість нейтрофілів становить 500 клітин/мм<sup>2</sup> або менше, нормальний механізм захисту хазяїна істотною мірою порушений, таким чином, що значно збільшується небезпека бактеріальної інфекції.

Нещодавно, на додаток до клінічного застосування вищевказаного G-CSF при нейтропенії, з очікуванням того, що G-CSF, ефективний з точки зору запобігання і лікування різноманітних інфекційних захворювань, таких як пневмонія і сепсис, шляхом підсилення функцій, пов'язаних з індукуванням продукування нейтрофілів, досліджували в схемах з введенням тільки G-CSF або супутнім введенням з антибіотиками в ході прогресу інфекційних захворювань.

Зрілий білок G-CSF складається з 4 альфа-спіралей і містить 2 дисульфідні зв'язки з молекулярною масою приблизно 20 000, де треоніновий замісник в положенні 133 являє собою єдине положення, де приєднується О-зв'язаний вуглеводень. Рецептори G-CSF, що існують на поверхнях гранулоцитів, мають молекулярну масу приблизно 150 000, складаються з єдиного пептидного ланцюга та є N-глікозилізованими. По мірі дозрівання клітин кількість рецепторів збільшується до декількох сотень на клітину.

Як лікарський засіб, в якому застосовується G-CSF, в корейській Патентній заявці № 10-2005-7019543 (Публікація № 2005-0114275) розкритий засіб, що включає як мінімум один фактор рекрутмента стовбурових клітин, такий як G-CSF, як активний інгредієнт для лікування діабету.

В корейській Патентній заявці № 10-2004-7007275 (Публікація № 2005-0044444) розкрито лікарський засіб, що містить цитокін, вибраний з групи, що складається з цитокіну для активізації моноцита або макрофага, цитокіну, виділеного з активованого моноцита або макрофага, і цитокіну, виділеного з гемопоетичних клітин, які експресують рецептори G-CSF, як активного інгредієнта для мобілізації плюрипотентних стовбурових клітин з тканини в периферичну кров.

Однак, дослідження нового застосування G-CSF як засобу для лікування діабетичної периферичної невропатії, не проводилися.

Опис винаходу

Технічна проблема

Іншим об'єктом даного винаходу є запропонований засіб для регенерації периферичних нервів, що включає гранулоцитарний колоніє-стимулювальний фактор (G-CSF) як активний інгредієнт.

Технічне рішення

У відповідності до аспекту даного винаходу, згадані вище та інші об'єкти можуть бути забезпечені шляхом забезпечення засобу для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії, що включає гранулоцитарний колоніє-

стимулювальний фактор (G-CSF) як активний інгредієнт.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу, запропонований засіб для регенерації периферичних нервів, що включає гранулоцитарний колоніє-стимулювальний фактор (G-CSF) як активний інгредієнт.

#### Переваги

У даному винаході G-CSF регенерує кровоносні судини в периферичних нервових тканинах і реабілітує пошкоджені нервові тканини, таким чином, здійснюючи вплив у вигляді збільшенні швидкості нервової провідності і покращення больової чутливості. Таким чином, даний винахід може бути придатним засобом профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії.

#### Опис фігур

Згадані вище та інші об'єкти, ознаки та інші переваги даного винаходу стануть більш чітко зрозумілими з наступного детального опису в поєднанні з доданими фігурами, де:

Фіг.1 являє собою графік, що ілюструє швидкість нервової провідності, виміряну до і після введення G-CSF (група введення G-CSF) і сольового розчину (контрольна група);

Фіг.2 являє собою графік, що ілюструє больову чутливість, виміряну до і після введення G-CSF (група введення G-CSF) і сольового розчину (контрольна група);

Фіг.3 являє собою фотографію забарвлення блакитним барвником толуїдином на хвостових нервах щурів в контрольній групі (введення сольового розчину);

Фіг.4 являє собою фотографію забарвлення блакитним барвником толуїдином на хвостових нервах щурів в групі введення G-CSF;

Фіг.5 являє собою мікроснімок просвічувальним електронним мікроскопом (TEM) хвостових нервів щурів контрольної групи (введення сольового розчину);

Фіг.6 являє собою мікроснімок просвічувальним електронним мікроскопом (TEM) хвостових нервів щурів в групі введення G-CSF; і

Фіг.7 являє собою графік, що ілюструє результати оцінки за допомогою Системи балів клінічної невропатії Торонто ступеню діабетичної периферичної невропатії пацієнтів, 1 тиждень, 15 днів, 1 місяць, 2 місяці і 3 місяці після введення G-CSF.

Найбільш переважний спосіб практики винаходу

Даний винахід буде детальніше описаний далі.

Винахідниками здійснено дослідження різноманітних фізіологічних ефектів гранулоцитарного колоніє-стимулювального фактора (далі позначений як "G-CSF"), і в результаті ними виявлено, що G-CSF регенерує кровоносні судини в периферичних нервових тканинах і реабілітує пошкоджені нервові тканини, таким чином покращуючи швидкість нервової провідності і больову чутливість. Таким чином, G-CSF за даним винаходом може бути придатним засобом для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії. Даний винахід здійснений на базі одержаних даних.

Засіб для лікування за даним винаходом містить G-CSF як активний інгредієнт. Крім того, засіб

характеризується регенерацією периферичних нервів.

Якщо засіб за даним винаходом вводили тваринам з діабетом II типу на моделі щурів з ожирінням Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF), швидкість нервової провідності збільшувалась і больова чутливість покращувалась. Крім того, якщо засіб за даним винаходом вводили суб'єкту-пацієнту в ході клінічного випробування і здійснювали оцінку діабетичної периферичної невропатії за допомогою Системи балів клінічної невропатії Торонто, ступінь діабетичної периферичної невропатії покращувався і швидкість нервової провідності збільшувалась.

В дослідженні на тваринах із застосуванням моделі тварин з діабетом II типу - щурів OLETF можна було спостерігати регеновані нервові волокна і ремієлінізовані аксони як докази регенерації периферичних нервів з хвостового нерва групи введення G-CSF (див. Фіг.3, 4, 5, і 6).

Вважається, що G-CSF регенерує периферичні нерви і лікує діабетичну периферичну невропатію шляхом виходу функціональних стовбурових клітин з кісткового мозку в периферичну кров, та індукуванням диференціації клітин, що вийшли, для регенерації нервових клітин і кровоносних судин в тканині периферичних нервів та відновлення пошкоджених нервових тканин, та безперешкодного постачання крові до нервів.

Загалом, G-CSF, який може застосовувати в даному винаході, переважно являє собою природний G-CSF або рекомбінантний G-CSF. Крім того, G-CSF який може застосовуватися в даному винаході, являє собою G-CSF з такою ж послідовністю амінокислоти, що і природний G-CSF.

G-CSF за даним винаходом може бути одержаний шляхом виділення з організму ссавців, хімічного синтезу або генетичної експресії екзогенної послідовності ДНК, одержаної з генома або клонуванням кДНК або синтезом ДНК в прокаріотній або еукаріотній клітині-хазяїні.

На цей час, придатний прокаріотний хазяїн включає різноманітні бактерії (наприклад, *E. coli*), і придатний еукаріотний хазяїн включає дріжджі (наприклад, *S. cerevisiae*) і клітини ссавців (наприклад, клітини яєчника китайського хом'яка, клітини мавпи).

Хоча рекомбінантний G-CSF, особливо G-CSF, одержаний з *E. coli*, є максимально переважним з комерційної точки зору, даний винахід включає застосування довільного G-CSF серед згаданих вище форм G-CSF або всіх G-CSF. Таким чином, G-CSFS і його аналоги можна застосовувати, одержуючи їх від різноманітних постачальників та очищаючи. Найбільш переважно, застосовують рекомбінантний людський гранулоцитарний колоніє-стимулювальний фактор (rhG-CSF).

Терапевтичний засіб за даним винаходом, що містить G-CSF як активний інгредієнт, може містити активний інгредієнт в кількості 0,0001-50 % (мас), на базі загальної маси композиції терапевтичного засобу.

Крім того, терапевтичний засіб за даним винаходом може додатково містити як мінімум один активний інгредієнт з такою ж або подібною функ-

цією, що і вищенаведений активний інгредієнт, на додаток до активного інгредієнта.

Терапевтичний засіб за даним винаходом, що містить G-CSF як активний інгредієнт, може додатково містити як мінімум один фармацевтично прийнятний носій на додаток до вищенаведеного активного інгредієнта, переважно, для одержання фармацевтичної композиції.

При одержанні композиції в рідкому розчині, як фармацевтично прийнятний носій, що придатний для стерилізації та застосування *in vivo*, переважний рідкий розчин може бути вибраний з групи, що складається з сольового розчину, стерилізованої води, розчину Рінгера, буферизованого сольового розчину, розчину альбуміну для ін'єкцій, розчину глюкози, розчину мальтодекстрину, гліцерину, етанолу або їх суміші. Якщо необхідно, композиція може містити інші типові добавки, такі як антиоксидант, буфер або бактеріостатичний засіб.

Крім того, розбавлювач, диспергувальний засіб, поверхнево-активна речовина, зв'язувальний засіб або змачувальний засіб може бути додатково введений для одержання композиції у лікарській формі для ін'єкцій, такий як розчин, суспензія або емульсія, пігулок, капсул, гранул або таблеток. Композиція може бути використана шляхом сполучення сайт-специфічного антитіла або іншого ліганду з носієм, таким чином, що композиція виявляє сайт-специфічну функцію. До того ж, у відповідному способі в даній галузі мистецтва, композиція переважно може бути одержана у відповідності до кожного захворювання або компоненту із застосуванням способу, розкритого в Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA.

Фармацевтична форма терапевтичного засобу за даним винаходом, що містить G-CSF як активний інгредієнт може являти собою гранули, порошки, таблетки з оболонкою, капсули, супозиторії, сиропи, соки, суспензії, емульсії, краплі, ін'єкційні розчини, а також препарати з тривалим вивільненням активної сполуки.

Терапевтичний засіб за даним винаходом, що містить G-CSF як активний інгредієнт, можна вводити в типовому способі внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревинно, надчеревно, внутрішньошкірно, назально, інгаляцією, місцево, ректально, перорально, в очі або підшкірно. Спосіб введення конкретно не обмежується, але не пероральні способи введення є переважними, і підшкірне введення є більш переважним.

Може бути здійснена корекція доз терапевтичного засобу за даним винаходом в залежності від різних факторів, таких як вид захворювання, тяжкість захворювання, вид і вміст активного інгредієнта та інших компонентів, що містяться в композиції, тип лікарської форми, вік хворого, маса тіла, загальний стан здоров'я, стать і раціон, час введення, спосіб введення, швидкість потоку композиції, тривалість лікування та інші лікарські засоби, які застосовують одночасно. У випадку дорослої людини, якщо G-CSF вводять один раз на день протягом безперервного періоду від 1 дня до 1 тижня, його можна вводити в дозі від 0,01

мг/кг/добу до 100 мг/кг/добу, і переважно від 0,01 мг/кг/добу до 10 мг/кг/добу.

Терапевтичний засіб за даним винаходом може застосовуватися окремо або в комбінації з терапією у вигляді блокади нервів, контролем метаболізму і т.п.

Терапевтичний засіб за даним винаходом відновлює пошкоджені нервові тканини, регенеруючи нервові клітини і кровоносні судини в периферичних нервових тканинах і забезпечує безперешкодне постачання крові до нервових тканин, таким чином покращуючи швидкість нервової провідності і больову чутливість.

Відповідно, терапевтичний засіб за даним винаходом відновлює пошкоджені нервові тканини, регенеруючи нервові клітини і кровоносні судини в периферичних нервових тканинах, і забезпечує безперешкодне постачання крові до нервових тканин, таким чином покращуючи швидкість нервової провідності і больову чутливість. Таким чином, засіб може бути придатний для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії.

Спосіб практики винаходу

Далі будуть описані переважні Приклади даного винаходу і Порівняльні Приклади. Наступні Приклади і Порівняльні Приклади наведені тільки з метою ілюстрації і жодним чином не призначені для обмеження контексту даного винаходу.

Приклади

Далі даний винахід буде описаний детальніше з посиланням на наступні Приклади. Дані приклади наведені тільки з метою ілюстрації даного винаходу і не повинні інтерпретуватися як обмежуючі контекст і дух даного винаходу.

[Приклади]

Приклад 1: Тваринне випробування для підтвердження терапевтичного впливу G-CSF при діабетичній периферичній невропатії

Тваринна модель діабетичної периферичної невропатії була одержана з використанням способу, подібного до способу, описаного в літературі [Nakamura J et al., Diabetes Research Clinical Practice, 2001 Jan; 51(1):9-20].

Генетично змінених тварин з діабетом II типу - щурів OLETF розводили в місці з високим ступенем освітлення і провітрювання при температурі 20-24 °C і вологості 40-70 %. В ході розведення, простий твердий лабораторний корм і водопровідну воду надавали *ad libitum*. Після проходження приблизно 10 тижнів, 30 % (мас./об.) розчин цукру у воді надавали замість водопровідної води. Загальний період введення води з цукром становив 24 тижні, причому масу тіла і вміст цукру в крові вимірювали кожні 5 тижнів. Маса тіла і вміст цукру в крові тварин з групи введення G-CSF і контрольної групи в точці часу приблизно 34 тижні вимірювали, і результати наведені в табл. 1.

Щури OLETF у віці приблизно 34 тижні були розділені на групу введення G-CSF і контрольну групу. В групі введення G-CSF, G-CSF (Leucostim, виробник PHARM. Co., LTD) в дозі 100 мг/кг/добу вводили ін'єкційним способом в черевний підшкірний шар 1 раз на день протягом 5 днів поспіль. В той же час, у випадку контрольної групи сольовий розчин в дозі 0,2 мл вводили ін'єкційним способом

в черевний підшкірний шар 1 раз на день протягом 5 днів поспіль.

Перед введенням G-CSF, різниця в швидкості нервової провідності між двома групами була виміряна для хвостового нерва. Далі, через 4 тижні після введення G-CSF, були виміряні швидкість нервової провідності і больова чутливість.

Результати представлені в наступних табл. 2 і 3, і на Фіг.1 і 2. Через 4 тижні після введення лікарського засобу, хвостові нерви щурів з групи введення G-CSF і контрольної групи витягали. Нерви забарвлювали барвником толуїдиновим блакитним і досліджували за допомогою мікроскопу, як показано на Фіг.3 і 4. Хвостові нервові тканини щурів з групи введення G-CSF і контрольної групи витягали. Здійснювали імунозабарвлення тканин і спостерігали тонкі структурні зміни за допомогою електронного мікроскопу, як показано на Фіг.5 і 6.

Таблиця 1

Маса тіла і вміст цукру в крові щурів OLETF в точці 34 тижні

Класифікація	n (кількість тварин)	Маса тіла (г)	Вміст цукру в крові (мг/дл)
Досліджувана група (введення G-CSF)	8	407	589
		492	500
		461	422
		436	411
		543	504
		503	482
		475	448
		355	469
Контрольна група (введення сольового розчину)	8	460	429
		452	445
		418	463
		480	538
		449	456
		440	426
		438	560
		479	528

Таблиця 2

Швидкість нервової провідності (м/с)

Класифікація	День 0	День 28
Контрольна Група (введення сольового розчину)	32,63±1,6м/с	35,58 ±0,9м/с
Досліджувана група (введення G-CSF)	31,93±1,5м/с	40,68 ±1,9м/с

Таблиця

Больова чутливість (с)

Класифікація	День 0	День 28
Контрольна група (введення сольового розчину)	3,6 ±0,8 с	5,3 ±0,4 с
Досліджувана група (введення G-CSF)	3,8 ±0,5 с	10,5 ±2,9 с

Як можна побачити з табл. 2 і Фіг.1, було підтверджено, що група введення G-CSF продемонструвала збільшену швидкість нервової провідності після введення G-CSF, а також підтверджено, що група введення G-CSF продемонструвала збільшену швидкість нервової провідності в порівнянні з контрольною групою введення сольового розчину.

Як можна побачити з табл. 3 і Фіг.2, було підтверджено, що група введення G-CSF продемонструвала покращену больову чутливість після введення G-CSF, а також підтверджено, що група введення G-CSF продемонструвала покращену больову чутливість в порівнянні з контрольною групою введення сольового розчину.

Крім того, як можна побачити з Фіг.3 і 4, спостерігалось, що фотографія забарвлених толуїдиновим блакитним хвостових нервів щурів контрольної групи на Фіг.3 демонструє більш пошкоджені нервові волокна в порівнянні з регеноерованими нервовими волокнами, тоді як фотографія забарвлених толуїдиновим блакитним хвостових нервів щурів з групи введення G-CSF на Фіг.4 демонструє набагато більше регеноерованих нервових волокон в порівнянні з пошкодженими нервовими волокнами.

Як можна побачити з Фіг.5 і 6, спостерігалось, що TEM хвостових нервів щурів з контрольної групи на Фіг.5 показує демієлінізовані аксони і зруйнований мієлін, тоді як TEM хвостових нервів щурів з групи введення G-CSF на Фіг.6 показує ремієлінізовані аксони, що є доказом регенерації нервів.

Приклад 2: Клінічне випробування для підтвердження терапевтичного ефекту G-CSF при діабетичній периферичній невропатії

Клінічні випробування проведені за участю пацієнтів з діабетичною периферичною невропатією, щоб зрозуміти терапевтичний вплив даного винаходу на діабетичну периферичну невропатію.

1. П'ять пацієнтів були відібрані з департаменту внутрішніх хвороб (ендокринологія), і основні аналізи на діабет (НОМА-індекс, HgA1C, C-пептид, ретинопатія, мікроальбумінурія за 24 години, цистатин С та аналізи ендокринної функції) були проведені.

Відповідні дані щодо статі, віку, зросту, маси тіла (кг), вмісту цукру в крові і діагностованого захворювання для 5 пацієнтів з групи лікування наведені в табл. 4.

Таблиця 4

Класифікація	Стать	Вік	Зріст	Маса тіла	Вміст цукру в крові	Діагностоване захворювання
Випадок 1	Ч	78	165	60	132	Діабетична периферична невропатія, захворювання коронарних артерій (ЗКА)
Випадок 2	Ж	59	168	79	102	Діабетична периферична невропатія, гострий інфаркт міокарда (ГІМ)
Випадок 3	Ч	65	166	66	78	Діабетична периферична невропатія, гострий інфаркт міокарда (ГІМ)
Випадок 4	Ж	61	160	65	161	Діабетична периферична невропатія, гострий інфаркт міокарда (ГІМ)
Випадок 5	Ч	65	164	64	141	Діабетична периферична невропатія, гострий інфаркт міокарда (ГІМ)

Далі були проведені спеціальні аналізи, такі як неврологічна оцінка і вимірювання швидкості нервової провідності (NCV) у всіх групах дослідження.

Пацієнти були госпіталізовані за 3 дні перед введенням G-CSF, і макросудинні ускладнення (CAG, IMT і ECHO) та інші пов'язані із судинами випробування проведені для пацієнтів. Далі, за 1 день до введення G-CSF, пацієнти були переведені в гемато-онкологічне відділення для проведення гематологічних аналізів.

Після цього, 10мкг/кг G-CSF (Leucostim, виробник PHARM. Co., LTD) вводили ін'єкційно в підшкірний шар 1 раз на день протягом 4 днів поспіль пацієнтам з групи лікування. Після введення G-

CSF спостерігали за результатами гематологічних аналізів. Якщо побічні ефекти не виникали, пацієнти були виписані з лікарні після проведення тільки неврологічних аналізів.

Після проходження 1 тижня, 15 днів, 1 місяця, 2 місяців і 3 місяців після введення G-CSF проводили гематологічні і неврологічні аналізи в ході відвідувань лікарні, щоб виміряти швидкість нервової провідності (NCV), ступінь діабетичної периферичної невропатії суб'єктів-пацієнтів оцінювали за Системою балів клінічної невропатії Торонто, і загальні результати аналізів показані в табл. 5, 7 і на Фіг.7.

А: Швидкість нервової провідності

Таблиця 5

#### Швидкість нервової провідності (м/с)

Класифікація	День 0	День 7	День 15	День 30	День 60	День 90
Випадок 1	32,4	34,1	36,7	38,3	40,1	40,8
Випадок 2	31,6	32,5	34,1	40,1	41,3	42,6
Випадок 3	34,3	34,2	35,8	39,1	39,7	39,8
Випадок 4	30,8	32,9	33,7	39,2	41,6	41,2
Випадок 5	35,2	34,8	36,3	42,8	42,7	41,2

Як можна побачити з табл. 5, було підтверджено, що швидкість нервової провідності залишається покращеною до точки часу 90 днів після введення G-CSF.

В: Оцінка ступеня діабетичної периферичної невропатії

Дану оцінку виконували методом побудови рейтингу наведених суб'єктів за допомогою Сис-

теми балів клінічної невропатії Торонто (табл. 6). На даний момент, результати оцінки представлені підсумковими показниками кожного рейтингу суб'єкта, де 19 балів є максимальною відміткою, і 0 балів є мінімальною відміткою. В даному випадку, чим вища кількість балів, тим серйозніший ступінь діабетичної периферичної невропатії. Одержані результати представлені в табл. 7 і на Фіг.7.

Таблиця 6

Оцінка за Системою  
балів клінічної невропатії Торонто

Класифікація	Бали за шкалою Торонто
Стопа (підсумок 6 балів, 1 бал для кожного суб'єкта)	Біль
	Нечутливість
	Тест дзвону у вухах
	Слабкість
	Атаксія
	Симптоми верхньої кінцівки
Рефлекторні відмітки (підсумок 8 балів, 2 бали для кожного суб'єкта)	Праве коліно
	Ліве коліно
	Права кісточка
	Ліва кісточка
Бали аналізу чутливості (підсумок 5 балів, 1 бал для кожного суб'єкта)	Укол шпилькою
	Температура
	Легкий дотик
	Вібрація
	Положення
Підсумковий показник	19 балів

Таблиця 7

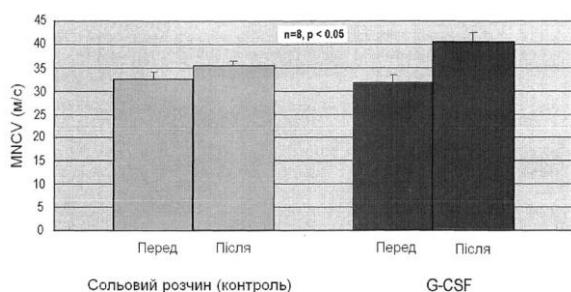
Результати оцінки за Системою балів клінічної невропатії Торонто

Класифікація	Кількість балів					
	День 0	День 7	День 15	День 30	День 60	День 90
Випадок 1	15	6	8	8	10	9
Випадок 2	14	7	9	9	9	10
Випадок 3	16	8	10	10	7	10
Випадок 4	12	6	7	8	9	8
Випадок 5	15	8	9	8	9	10

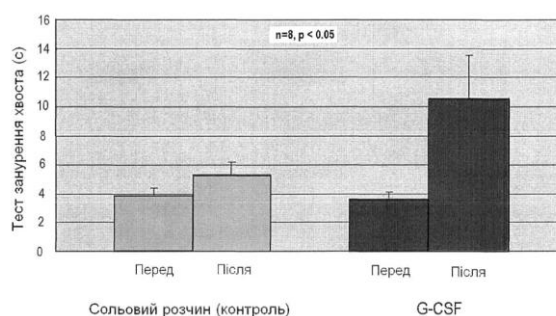
Як можна побачити з табл. 7 і Фіг.7, покращені оцінки за Системою балів клінічної невропатії Торонто спостерігалися до точки часу 90 днів після введення G-CSF. Таким чином, терапевтичний ефект терапевтичного засобу за даним винаходом при діабетичній периферичній невропатії був клінічно підтверджений.

Відповідно, відомо, що G-CSF може бути придатний для профілактики і лікування діабетичної периферичної невропатії.

Хоча переважні варіанти даного винаходу розкриті з ілюстративною метою, фахівцю в даній галузі буде зрозуміло, що можливі різні модифікації, доповнення і зміни без відходу від контексту і духу винаходу, як розкрито у доданій формулі винаходу.



ФІГ. 1

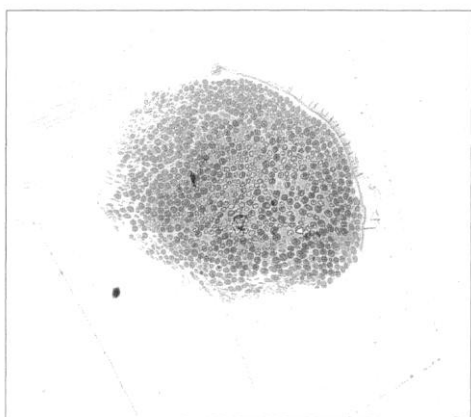


ФІГ. 2

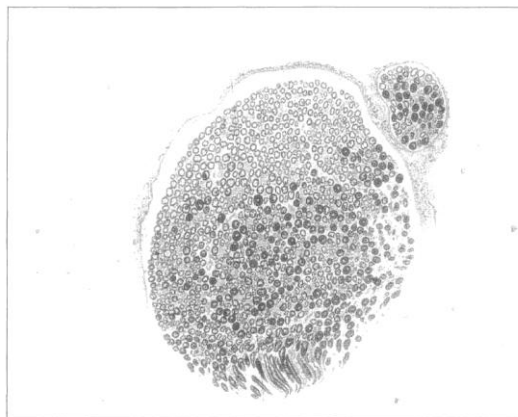
15

93581

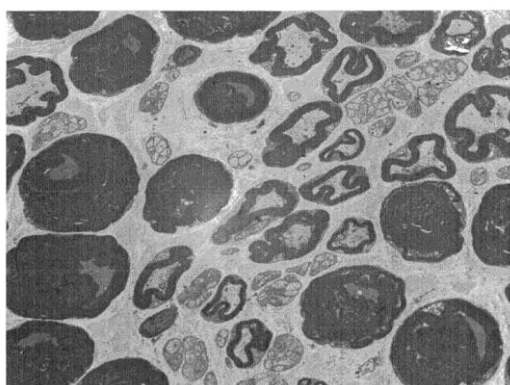
16



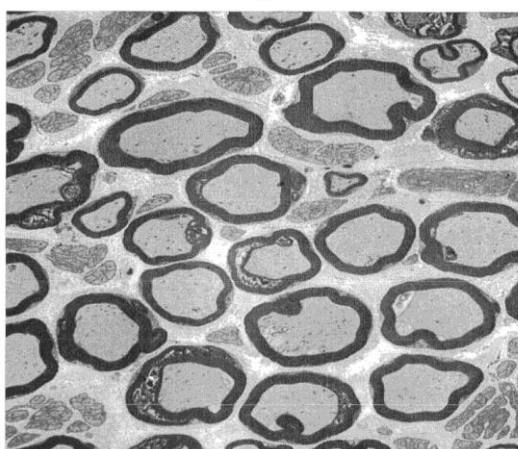
ФІГ. 3



ФІГ. 4

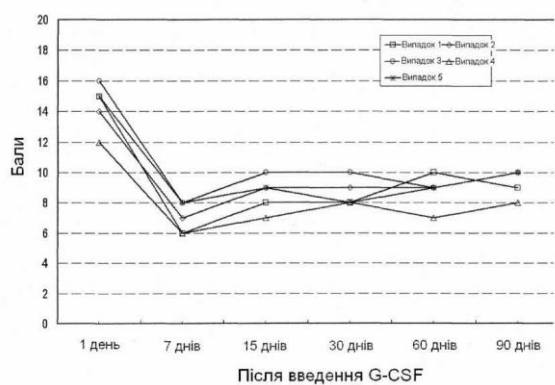


ФІГ. 5



ФІГ. 6

Система балів клінічної невропатії Торонто



ФІГ. 7