

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192241 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.11

(51) Int. Cl. A61K 38/19 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.21

(54) G-CSF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ НЕЙТРОПЕНИИ ИЛИ СНИЖЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ НЕЙТРОПЕНИИ

(31) 62/804,988

(32) 2019.02.13

(33) US

(86) PCT/IB2020/050447

(87) WO 2020/165664 2020.08.20

(71) Заявитель:
ИЛЬКОГЕН ИЛАЧ САНАЙИ ВЕ
ТИДЖАРЕТ А.Ш. (TR)

(72) Изобретатель:
Эртан-Ахмед Сенем, Шахин Адем,
Онджель Хатидже, Пынарбашлы
Онур, Саррачоглу Нагехан (TR)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Способ предупреждения нейтропении или снижения продолжительности нейтропении у пациента путем введения терапевтически эффективного количества гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), слитого с человеческим гибридным (hy) Fc, разработанного в качестве G-CSF нового поколения.

A1

202192241

202192241

A1

**G-CSF ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
НЕЙТРОПЕНИИ ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ
НЕЙТРОПЕНИИ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/804988, поданной 13 февраля 2019 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у пациента с помощью введения G-CSF, слитого с гибридным Fc, длительного действия.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Лейкопения с пониженным уровнем лейкоцитов (WBC) и нейтропения с пониженным уровнем нейтрофилов являются критическими нарушениями, которые приводят к повышенной восприимчивости к различным типам инфекций. Нейтропения может быть хронической, например, у пациентов, инфицированных HIV или имеющих острую форму, например, у больных, имеющих рак, подвергаемых химиотерапии или лучевой терапии. Нейтропению могут вызвать различные факторы, такие как противораковые химиотерапевтические лекарственные средства, противораковая лучевая терапия, инфекционные заболевания, врожденные дефекты или недостаток витамина B12/B9. Значительное снижение количества нейтрофилов, делающее пациента более восприимчивым к бактериальным инфекциям, является частым и серьезным осложнением у пациентов, которые получают противораковую терапию (химиотерапию и/или лучевую терапию).

Нейтрофилы производятся в костном мозге и представляют собой короткоживущие клетки, которые интенсивно циркулируют по всему телу; в отличие от некоторых других лейкоцитов, они могут свободно перемещаться сквозь стенки венозных сосудов в ткани организма, чтобы немедленно атаковать все антигены. Нейтропения

классифицируется в зависимости от количества нейтрофилов и относительного риска инфицирования. Он определяется как значение абсолютного количества нейтрофилов (ANC), составляющее ниже чем приблизительно $1,0 \times 10^9/\text{л}$. Он имеет следующие классификации в соответствии с количеством нейтрофилов; умеренная нейтропения ($500\text{--}1000/\text{мкл}$) или тяжелая нейтропения ($< 500/\text{мкл}$). Фебрильная нейтропения (FN) относится к возникновению лихорадки во время периода выраженной нейтропении. Умеренная и тяжелая нейтропения или фебрильная нейтропения приводят к снижению дозы лекарственных средств, используемых в химиотерапии, или для отсрочки лечения, что приводит в результате к тому, что процесс лечения становится менее эффективным. Для пациентов с тяжелой нейтропенией или фебрильной нейтропенией, характеризующихся ANC, составляющим менее чем $0,5 \times 10^9/\text{л}$, даже относительно незначительные инфекции могут быть серьезными и даже опасными для жизни.

В последнее время различные формы лейкопении и нейтропении лечат или регулируют с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) или производного G-CSF, модифицированного полиэтиленгликолем (PEG). Профилактическое применение G-CSF рекомендуется в схеме химиотерапии с высоким риском с более чем 20% вероятностью фебрильной нейтропении. У пациентов, получающих аутологичную трансплантацию стволовых клеток периферической крови, G-CSF используется для мобилизации кластера 34+ (CD34+) гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь после завершения химиотерапии рака. G-CSF также используется для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток пациентам, подвергающимся перекрестной трансплантации стволовых клеток крови. Кроме того, средство G-CSF используется для лечения нейтропении с увеличением числа нейтрофилов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, миелодиспластических синдромов, апластической анемии, врожденной и идиопатической нейтропении, инфекции вирусом иммунодефицита человека (HIV). Основным биологическим эффектом G-CSF *in vivo* является стимуляция роста и развития определенных лейкоцитов, известных как нейтрофильные гранулоциты или нейтрофилы (*Welte et al.*, PNAS-USA 82:1526-1530, 1985, *Souza et al*, *Science*, 232:61-65, 1986).

Нейтрофилы, продуцируемые в костном мозге, контролируются со стороны G-CSF. G-CSF осуществляет эффект в сочетании с рецептором гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на поверхности клеток в костном мозге; рецептор обычно образуется из клетки-предшественника гранулоцита и зрелого нейтрофила, и при этом с большей плотностью образуется во второй фазе процесса дифференцировки и созревания. В результате G-CSF поддерживает вход клеток-предшественников, таких как миелобласты, промиелоциты и миелоциты, в клеточный цикл костного мозга после объединения с рецептором; он вызывает более частое деление клеток, приводя в результате к пролиферации клеток и увеличению продолжительности жизни гранулоцитов. Кроме того, G-CSF способствует прохождению из костного мозга в кровотока за короткое время (4-24 часа) и способствует увеличению числа нейтрофилов. Кроме того, G-CSF способствует пролиферации и дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток, таких как CFU-G (колониеобразующая единица-гранулоцит).

Аминокислотная последовательность G-CSF человека (hG-CSF) была описана Nagata *et al.* Nature 319:415-418, 1986, hG-CSF представляет собой мономерный белок, который димеризует рецептор G-CSF путем образования комплекса 2:2 из 2 молекул G-CSF и 2 рецепторов (Horan *et al.* (1996), *Biochemistry* 35(15): 4886-96). Рекомбинантный метионил G-CSF человека (r-metHuG-CSF), белок из 175 остатков, был впервые продуцирован в E-coli (Hill *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5167-5171). Филграстим, выпущенный на рынок в 1991 году под названием Neupogen®, является первым из лекарственных средств, содержащих G-CSF (негликозилированный комбинированный метиониловый гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, rhuG-CSF), следует вводить ежедневно во время курса химиотерапии из-за его короткого периода полувыведения (от 3,5 до 3,8 часа). Период полувыведения филграстима из плазмы был увеличен до 18-80 часов с менее частым подкожным (SC) введением с развитием пегфилграстима, содержащего одну N-концевую группу полиэтиленгликоля (PEG) размером 20 кДа на G-CSF (Frampton, Lee *et al.* 1994, Molineux 2003, Molineux 2004). Это соединение было одобрено FDA (Управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств) в 2002 году под торговым названием Neulasta®. Поэтому рекомендуемая доза пегфилграстима составляет один раз за каждый цикл химиотерапии.

Недавно были исследованы и разработаны гибридные белки, полученные с использованием иммуноглобулина (Ig). Ig является важным компонентом крови. Компонент Ig (hIg) человека включает несколько классов, таких как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE (Roitt *et al.*, "Immunology" 1989, Gower Medical Publishing, London, U. K.; New York, N. Y.). Как описано в патенте США № 5045312, человеческий гормон роста конъюгируется с бычьим сывороточным альбумином или иммуноглобулином мыши с использованием карбодиимида или глутаральдегида в качестве сшивающего средства. По сравнению с немодифицированным гормоном роста конъюгаты обладают повышенной активностью. Известно, что модификации домена Fc, такие как изменение зон гликозилирования, улучшают терапевтический эффект (R. J. Sola and K. Griebenow, (2009), J Pharm Sci. 98(4): 1223–1245). Кроме того, длительная циркуляция или клиническая активность достигаются, когда активное вещество сливается с фрагментом кристаллизуемой (Fc) области антитела.

Однако в отличие от слияния с внеклеточными доменами рецепторов клеточной поверхности, слияние растворимых белков с IgG приводит к снижению биологических активностей по сравнению с не слитыми цитокинами или факторами роста. Это связано с тем, что химерные белки существуют в виде димеров, в которых два активных белка находятся в непосредственной близости; это приводит к стерическому ингибированию слитых IgG по отношению к их молекулам-мишеням. Следовательно, эту проблему необходимо преодолеть, чтобы получить эффективный гибридный белок (например, US 20120276097 A1), полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Другое ограничение технологии слияния с Fc состоит в возникновении нежелательных иммунных ответов. Fc-домен иммуноглобулина также имеет эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Эти эффекторные функции, как правило, осуществляются посредством взаимодействия между Fc-областью Ig и Fc-рецепторами (FcR) на эффекторных клетках или посредством связывания с компонентами системы комплемента.

Следовательно, для уменьшения нежелательных ответов, таких как гибель клеток, высвобождение цитокинов или воспаление, эффекторные функции Fc должны быть заблокированы (US 20120276097 A1).

В целом, известно, что использование продукта на основе G-CSF, такого как филграстим (Neupogen®), без какой-либо модификации является ограниченным ввиду его короткого периода полувыведения. Пегфилграстим (Neulasta®) характеризуется относительно более длительным периодом полувыведения, однако известно, что PEG может характеризоваться некоторыми побочными эффектами, а пегилирование вводит дополнительную стадию получения. Из-за короткого периода полувыведения низкомолекулярных белков Fc-слитая конструкция обычно является полезной и широко используемой технологической платформой, в частности в клинических приложениях (Czajkowski, Hu, Shao, & Pleass, 2012; Strohl, 2015). Вместе с этим одним из основных ограничений технологии Fc-слияния является наличие нежелательных иммунных ответов.

Платформа на основе гибридного Fc (hyFc), используемая в настоящем варианте осуществления, была разработана как для дальнейшего увеличения периода полувыведения в плазме конъюгированных лекарственных средств, так и для снижения цитотоксичности и иммуногенности (EP2008076022, US8586038B2). Полное содержание патента US8586038 B2 включено в данном документе посредством ссылки. Для данной цели генетически объединяли два разных иммуноглобулина, характеризующихся отсутствием ADCC- и CDC-ответов. Гибридный Fc получали из комбинаций подклассов IgG человека или из комбинаций IgD и IgG человека. Гибридный Fc, в случае если он присоединен к биологически активной молекуле, является эффективным в отношении увеличения периода полувыведения биологически активной молекулы в сыворотке крови, а также повышения уровня экспрессии полипептида, в случае если экспрессируется нуклеотид, кодирующий полипептид Fc-слитого белка. Таким образом, G-CSF, слитый с гибридным Fc (hyFc), также характеризуется более продолжительным периодом полувыведения в плазме крови, эффективным уровнем экспрессии, элиминированной цитотоксичностью и сниженной иммуногенностью (US 8586048 B2). В данном отношении слияние G-CSF, слитый с hyFc, является уникальной и оригинальной молекулой, где Fc-часть сама по себе представляет собой две слитые молекулы иммуноглобулина, и при этом эта первая слитая молекула является дополнительно слитой с активной молекулой.

Соответственно, в данном исследовании был разработан способ, в котором используется гибридный (hy) Fc-слитый гранулоцитарный колониестимулирующий

фактор (G-CSF длительного действия), G-CSF нового поколения (G-CSF 3-го поколения) для предупреждения нейтропении или уменьшения продолжительности нейтропении.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения, который позволяет вводить субъекту терапевтически эффективное количество G-CSF длительного действия, слитого с гибридным Fc.

В варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у субъекта, где G-CSF длительного действия, слитый с гибридным Fc, следует вводить в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у субъекта-человека, получающего противораковую терапию (химиотерапию или лучевую терапию), где G-CSF длительного действия, слитый с гибридным Fc, следует вводить в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у человека, получающего химиотерапию, где терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, представляющего собой G-CSF длительного действия, вводят подкожно (SC) в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у человека, получающего химиотерапию, где терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, представляющего собой G-CSF длительного действия, вводят подкожно (SC) в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, характеризующегося улучшенными фармакокинетическими свойствами, такими как увеличенный период полувыведения в

сыворотке и/или увеличенные AUC и $C_{\max}$, по сравнению с пэгилированным G-CSF Neulasta®.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ повышения уровней нейтрофилов у субъекта-человека, который характеризуется количеством циркулирующих нейтрофилов, составляющим менее чем приблизительно $1,0 \times 10^9/\text{л}$ или менее чем приблизительно $0,5 \times 10^9/\text{л}$, где G-CSF длительного действия, слитый с гибридным Fc, следует вводить в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг.

СПИСОК ОПРЕДЕЛЕНИЙ ТЕРМИНОВ

В приведенном ниже описании и формуле изобретения используются следующие определения.

Термин «белок», также означающий «полипептид», относится к аминокислотному полимеру, содержащему естественные и/или не принадлежащие к естественным D- или L-аминокислоты, которые хорошо известны из уровня техники. G-CSF может относиться либо к белку, либо к полипептиду. Белок может относиться к пептиду или его фрагментам, например, фрагменту G-CSF.

Термин «G-CSF» относится к белку G-CSF и его фрагментам, гомологам и вариантам. Одной из форм вариантов G-CSF является мутеин G-CSF, как описано в патенте США № 5214132, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Мутеин G-CSF, который имеет свойства, эквивалентные или превосходящие свойства нативного G-CSF, и имеющий такое же применение, как и G-CSF, имеет такую же аминокислотную последовательность, как и у природного G-CSF человека, за исключением положений 1, 3, 4, 5 и 17, где вместо природных аминокислот G-CSF мутеин содержит Ala, Thr, Tyr, Arg и Ser соответственно. Белок G-CSF может включать естественные модификации, такие как гликозилирование, однако в предпочтительной форме он не гликозилирован и экспрессируется из бактериальной клетки. G-CSF может происходить от любого вида, включая человека, мышь, крысу и других. Предпочтительной формой G-CSF является G-CSF человека для использования у людей. G-CSF может быть рекомбинантным или природным и может содержать естественные и/или не принадлежащие к естественным D- или L-аминокислоты, которые хорошо известны из уровня техники.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству вводимого активного средства, которое приводит к требуемому терапевтическому эффекту при введении субъекту, нуждающемуся в лечении с помощью G-CSF. «Требуемый терапевтический эффект» включает одно или несколько из следующего: 1) улучшение симптома(-ов), ассоциированного(-ых) с заболеванием или состоянием; 2) задержка проявления симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием; 3) увеличение продолжительности жизни по сравнению с отсутствием лечения; и 4) более высокое качество жизни по сравнению с отсутствием лечения.

Термин «цикл» относится к периоду времени между первыми днями введения химиотерапии в последовательных циклах химиотерапии.

Используемый в данном документе термин «субъект» включает человека или любой животный организм, отличный от человека. В предпочтительных вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек. В настоящем изобретении термины «субъект», «пациент» и «индивидуум» являются взаимозаменяемыми.

Термин «противораковая терапия» относится к лечению для прекращения или предупреждения рака у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления химиотерапия или лучевая терапия применяются в качестве противораковой терапии с тем, чтобы способствовать регрессии рака до точки устранения рака.

Термин « $C_{\max}$ » относится к максимальной наблюдаемой концентрации, взятой непосредственно из профиля зависимости концентрации в сыворотке крови от времени. Если не указано иное, то « $C_{\max}$ » относится к $C_{\max}$, полученному на основе скорректированных концентраций на исходном уровне, т. е. концентраций, полученных после вычитания индивидуального исходного уровня из каждой отдельной временной точки ($C_t - C_0$).

Термин « $t_{\max}$ » относится ко времени достижения максимальной концентрации в сыворотке крови, полученной из непосредственно наблюдаемых данных зависимости концентрации от времени.

Термин « $t_{1/2}$ » или «период полувыведения» лекарственного средства означает время, необходимое для того, чтобы концентрация в крови или сыворотке крови снизилась наполовину.

Термин «AUC» или «площадь под кривой» используется в его обычном смысле, т. е. площадь под кривой в зависимости от концентрации в сыворотке крови тестируемой молекулы, введенной субъекту. После того, как экспериментальные точки концентрации-времени были определены, AUC может быть удобно рассчитана с помощью компьютерной программы, такой как GraphPad Prism 3.01.

Термин «AUC_{last}» относится к площади под кривой от нуля до времени последней измеряемой концентрации, рассчитанной по линейной трапецевидной сумме вверх/вниз.

Термин «AUEC_{last}» относится к площади под кривой зависимости эффекта от времени от нулевой точки времени до момента последней точки количественного эффекта.

Термин «AUC_{inf}» относится к площади под кривой от момента времени ноль, экстраполированной до бесконечности, рассчитанной линейно-логарифмическим методом трапеций и экстраполированной до бесконечности путем добавления последней количественно определяемой концентрации, разделенной на константу скорости элиминации.

Термин «среднее» представляет собой среднее арифметическое значение фармакокинетического значения, если не указано иное.

Термин «АЕ» или «нежелательное явление» относится к любому нежелательному медицинскому явлению, которое происходит у пациента или субъекта, участвующего в клиническом исследовании, которому вводят фармацевтический продукт, и который не обязательно причинно связан с этим лечением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Чтобы настоящее изобретение можно было легко понять и осуществить на практике, предпочтительные варианты осуществления будут описаны в виде примеров со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

На ФИГ. 1 представлена структура белка GX-G3, который представляет собой слитый белок G-CSF человека с гомодимерной структурой в гибридизированной форме шарнирного домена IgD и Fc-домена IgG4.

На ФИГ. 2 представлен профиль половинной логарифмической концентрации в сыворотке крови в зависимости от времени после IV введения самцам крыс в дозе 100 мкг/кг Neutrogin®, 100 и 500 мкг/кг GX-G3.

На ФИГ. 3 представлен профиль половинной логарифмической концентрации в сыворотке крови в зависимости от времени после SC введения самцам крыс в дозе 100 мкг/кг Neutrogin® и 50, 100 и 500 мкг/кг GX-G3.

На ФИГ. 4 представлен профиль половинной логарифмической концентрации в сыворотке крови в зависимости от времени после SC введения самцам крыс с индуцированной нейтропенией в дозе 100 мкг/кг Neutrogin® и Neulasta®, 25 и 100 мкг/кг GX-G3.

На ФИГ. 5 представлен профиль половинной логарифмической концентрации в сыворотке крови в зависимости от времени после SC введения нормальным самцам крыс в дозе 100 мкг/кг Neutrogin® и Neulasta®, 25 и 100 мкг/кг GX-G3.

На ФИГ. 6 представлен AUC_{last} после SC введения самцам крыс с индуцированной нейтропенией и нормальным самцам крыс в дозе 100 мкг/кг Neutrogin® и Neulasta®, 25 и 100 мкг/кг GX-G3.

На ФИГ. 7 показаны эффекты IV инъекции GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® в отношении количества ANC у нормальных крыс. [Животным инъецировали внутривенно GX-G3 и Neutrogin®, Neulasta® один раз в день в течение дня 0. Каждый балл S.D. представляет среднее значение ($n=3$). Значительно отличается от среды-носителя (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)].

На ФИГ. 8 показаны эффекты SC инъекции GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® в отношении количества ANC у нормальных крыс. Животным инъецировали подкожно GX-G3 и Neutrogin®, Neulasta® один раз в день в течение дня 0. Каждый балл S.D. представляет среднее значение ($n=5$). Значительно отличается от среды-носителя (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

На ФИГ. 9 показаны эффекты GX-G3, Neutrogen® и Neulasta® в отношении ANC у крыс с нейтропенией. [Животным инъектировали подкожно GX-G3 и Neutrogen®, Neulasta® один раз в день в течение дня 0. Каждый балл S.D. представляет среднее значение (n=5). Значительно отличается от среды-носителя (*p < 0,05, **p < 0,01).]

На ФИГ. 10 показаны результаты доклинических тестов безопасности GX-G3 (примеры 5-8).

На ФИГ. 11 показаны результаты доклинических тестов токсичности GX-G3 (примеры 9-17).

На ФИГ. 12 показаны графики средней концентрации GX-G3 в сыворотке крови в зависимости от времени после однократного подкожного введения GX-G3. Планки погрешностей на рисунке 12 показывают стандартные ошибки (внизу слева: линейная шкала, сверху справа: логарифмически-линейная шкала).

На ФИГ. 13 показаны графики средней концентрации пегфилграстима в сыворотке крови в зависимости от времени после однократного подкожного введения 6 мг пегфилграстима. Планки погрешностей на рисунке 12 показывают стандартные ошибки (внизу слева: линейная шкала, сверху справа: логарифмически-линейная шкала).

На ФИГ. 14 показаны графики размаха с нормализованной дозой GX-G3 $C_{\max}$ (сверху) и AUC_{last} (внизу). На рисунке 14 символы, горизонтальные линии, высоты прямоугольников и графики размаха показывают индивидуальные значения, медианы группы доз, межквартильные диапазоны, а также минимумы и максимумы соответственно.

На ФИГ. 15 показаны кривые зависимости среднего количества WBC (лейкоцитов) от времени после однократной подкожной инъекции GX-G3, пегфилграстима и плацебо. Планки погрешностей на ФИГ. 15 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 16 показано максимальное воздействие WBC (сверху) и общего количества WBC на организм (внизу) после однократной инъекции GX-G3, пегфилграстима и плацебо. На рисунке 16 символы, горизонтальные линии, высоты прямоугольников и графики размаха показывают индивидуальные значения, медианы группы доз, межквартильные диапазоны, а также минимумы и максимумы соответственно.

На ФИГ. 17 показаны кривые зависимости среднего количества ANC (абсолютного количества нейтрофилов) от времени после однократной подкожной инъекции GX-G3, пегфилграстима и плацебо. Планки погрешностей на ФИГ. 17 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 18 показано максимальное воздействие ANC (вверху) и общее воздействие ANC на организм (внизу) после однократной инъекции GX-G3, пегфилграстима и плацебо. На рисунке 18 символы, горизонтальные линии, высоты прямоугольников и графики размаха показывают индивидуальные значения, медианы группы доз, межквартильные диапазоны, а также минимумы и максимумы соответственно.

На ФИГ. 18 показан профиль зависимости среднего количества ANC от времени для цикла 1 (FAS). Планки погрешностей на ФИГ. 19 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 20 показан профиль зависимости среднего количества ANC от времени для цикла 2 (FAS). Планки погрешностей на ФИГ. 20 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 21 показан профиль зависимости среднего количества ANC от времени для обоих циклов (FAS). Планки погрешностей на ФИГ. 21 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 22 показан профиль зависимости среднего количества ANC от времени для цикла 1 (PPS). Планки погрешностей на ФИГ. 22 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 23 показан профиль зависимости среднего количества ANC от времени для цикла 2 (PPS). Планки погрешностей на ФИГ. 23 показывают стандартные отклонения.

На ФИГ. 24 показаны кривые зависимости средней концентрации от времени для GX-G3 и пегфилграстима (PPS). Планки погрешностей на ФИГ. 24 показывают стандартные отклонения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В одном варианте осуществления представлен способ предупреждения или уменьшения продолжительности нейтропении у пациента, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, G-CSF длительного действия, слитого с гибридным Fc, в терапевтически эффективном количестве.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ повышения уровней нейтрофилов у человека, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, G-CSF длительного действия, слитого с гибридным Fc, в терапевтически эффективном количестве.

В соответствии с этими вариантами осуществления, например, увеличивается число нейтрофилов у субъекта; предупреждается уменьшение числа нейтрофилов у субъекта; восстановление абсолютного количества нейтрофилов у субъекта увеличивается, а время до восстановления абсолютного количества нейтрофилов у субъекта уменьшается.

G-CSF длительного действия, слитый с гибридным Fc, представлен следующей формулой (I),

Формула (I)

$N'-G-Y-Z2-Z3-Z4-C'$,

где

G представляет собой G-CSF;

N' представляет собой N-конец полипептида, и C' представляет собой C-конец полипептида;

Y представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 5 до 64 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 162 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 99 до 162 в SEQ ID NO: 2;

Z2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 4 до 37 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 163 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 163 до 199 в SEQ ID NO: 2;

Z3 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 71 до 106 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении

220 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 115 до 220 в SEQ ID NO: 3; и

Z4 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 80 до 107 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 221 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 221 до 327 в SEQ ID NO:3

В варианте осуществления hyFc содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

Один пример G-CSF, слитого с гибридным Fc, предусматривает аминокислотную последовательность из аминокислотных остатков 31-449 в SEQ ID NO: 1 В SEQ ID NO: 1 аминокислотные остатки 1-30 представляют собой сигнальную последовательность. Вариант осуществления G-CSF, слитого с гибридным Fc, также называют G-CSF-hyFc, GCSF-hFc, GX-G3 и HyGrastim. (С этого момента в качестве кодового названия будет использоваться GX-G3.) GX-G3, слитый белок, в котором G-CSF человека слит с hyFc человека, был разработан с целью составления средства на основе колониестимулирующего фактора длительного действия, такого как пегфилграстим. В отличие от пегфилграстима GX-G3 получают с помощью вставки гена, экспрессирующего G-CSF-hyFc, в эукариотическом векторе экспрессии pAD15 в MCS (сайт множественного клонирования), и при этом получают без какой-либо стадии конъюгации. В отличие от ранее разработанных продуктов Fc, таких как абатацепт, этанерцепт и Fc-слитые белки G-CSF, Fc человека, используемый в GX-G3, представляет собой гибридизированную форму IgD-Fc и IgG4-Fc человека, называемого гибридным Fc (hyFc) (Сох и др., 2014). GX-G3 (фигура 1) представляет собой димерный белок из 838 аминокислот с молекулярной формулой $C_{2072}H_{3258}N_{558}O_{630}S_{16}$. Среди этих аминокислот 30 аминокислот шарнирного домена IgD составляют 8 N-терминальных кислот домена CH2 IgD и 107 аминокислот C-терминальных кислот CH2 и CH3 IgG4. Идентифицировали 9 позиций дисульфидной связи в GX-G3, который имеет два участка O-гликозилирования и два участка N-гликозилирования. Он представляет собой гомодимер из двух молекулярных цепей, каждая из которых содержит 1 Fc-фрагмент антитела и 1 молекулу G-CSF человека. Размер молекулы GX-G3 составляет 98 кДа.

Как правило, Fc антитела связывается с FcRn (неонатальный Fc-рецептор) эндотелиальных клеток в организме человека, обеспечивая тем самым рецикл huFc-слитых белков, что приводит в результате к продукту со значительно более длительным периодом полувыведения (Strohl et al., 2015). Домен шарнир-CH2 IgD в конструкции huFc обладает значительной шарнирной гибкостью, но не имеет аффинности связывания с FcγR-индуцированной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), тогда как домен CH2-CH3 IgG в huFc не проявляет какой-либо реакции комплементзависимой клеточной цитотоксичности (CDC). Ожидается, что подобно другим Fc-слитым средствам, GX-G3 могло бы свойство длительного действия в сыворотке крови из-за его аффинности связывания FcRn и снижения почечного клиренса. Наследственная аминокислотная последовательность G-CSF человека используется в платформе huFc без включения каких-либо мутаций, а участок слитого соединения IgD/IgG4 huFc встраивается в неэкспонированную область, минимизируя таким образом иммуногенность. В результате, как и следовало ожидать, GX-G3 проявляет более низкую иммуногенность, а также пролонгированное действие без реакций антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой клеточной цитотоксичности (CDC) (Kim, An, Lim, Yang, & Jeong, 2016).

GX-G3 получали с помощью вставки гена, экспрессирующего G-CSF-huFc, в эукариотическом векторе экспрессии pAD15 в MCS (сайт множественного клонирования). В отличие от других средств на основе G-CSF, клетка-хозяин, используемая для получения GX-G3, представляет собой яичник китайского хомячка (CHO) DG44. В результате специальных способов получения, которые позволяют продуцировать слитый G-CSF-huFc в одной стадии вместо отдельного получения G-CSF и антитела, GX-G3 имеет лучшую структурную стабильность и более низкую стоимость получения по сравнению с другими средствами на основе G-CSF.

В случае Fc-слитого белка, такого как GX-G3, он демонстрирует длительный период полувыведения *in vivo*, вызванный рециркуляцией через комбинацию рецептора FcRn (неонатальный рецептор Fc) эндотелиальных клеток в организме и Fc-области.

Кроме того, в отличие от других существующих средств на основе G-CSF, huFc-область GX-G3 является гибридной формой; шарнирная область CH2 IgD без аффинности связывания FcγR с высокой шарнирной гибкостью, вызывающая

опосредованную антителами токсичность в отношении клеток, и область CH2-CH3 IgG4 с длительным периодом полувыведения в сыворотке из-за аффинности связывания FcRn (неонатального рецептора Fc) без комплемента активности реакции разработаны в гидрофобной форме. Эти характеристики повышают активацию за счет снижения ADCC и CDC, а также снижают иммуногенность. Для снижения иммуногенности, вызванной GX-G3, в huFc использовалась только последовательность природного гена G-CSF человека, и при этом молекула не содержала каких-либо мутаций, которые могли бы вызвать побочные эффекты.

Кроме того, стабильность конструкции повышалась с помощью применения способа совместной экспрессии из клетки-хозяина CHO DG44 с использованием pAD15 в качестве вектора экспрессии вместо объединения отдельно изготовленных G-CSF и Fc-области.

В фармацевтической композиции по настоящему изобретению платформа huFc и G-CSF имеют аминокислотную последовательность гуманизированных организмов. Дополнительная реакция слияния не использовалась, так как слияние между IgD и IgG и между G-CSF и иммуноглобулиновой частью обеспечивалось посредством единого генетического кода и единой реакции транскрипции-трансляции. Пептидная связь между G-CSF и huFc-платформой образована между пролином и аргинином. Аминокислотная последовательность мономера hu-Fc-слитого G-CSF представлена ниже. Сигнальные, G-CSF, N-концевые последовательности и последовательности hu-Fc указаны в соответствующем формате. Схематическая структура белка гибридного huFc-слитого G-CSF показана ниже.

MAGPATQSPMKLWALQILLWHSALWTVQEA TPLGPASSLPQSFLLKCLEQYRKIQG
DGAALQEKLCATYKLCHEELYLLQHS LGIPWAPLSSCP SQALQLAGCLSQLHSGL
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTWQQNEELGMAPALQPTQGAMP
AFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQPN TGRGGEEKVKEKEKEEQ
EERETKTPECPSHTGPIGVLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVYDVSGEOPFVQFMVY
YDGYEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYVKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKQQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLG
K

(SEQ ID NO: 1).

Пациенты, подвергаемые курсу химиотерапии рака, после лечения обычно демонстрируют нейтропению от умеренной до тяжелой степени. Вариант G-CSF-hyFc эффективен в предупреждении нейтропении или уменьшении времени до восстановления абсолютного количества нейтрофилов и продолжительности нейтропении так, что резко снижается продолжительность подверженности риску инфицирования. Соответственно, степень и продолжительность нейтропении значительно предупреждаются или уменьшаются с помощью введения терапевтически эффективного количества G-CSF-hyFc в соответствии со способами осуществления настоящего изобретения.

В варианте осуществления пациент страдает нейтропенией от умеренной до тяжелой степени, например, характеризуется абсолютным количеством нейтрофилов, составляющим менее чем приблизительно $1,0 \times 10^9/\text{л}$ или менее чем приблизительно $0,5 \times 10^9/\text{л}$. В варианте осуществления у пациента недостаточно циркулирующих нейтрофилов.

В варианте осуществления дозировка определяется весом пациента таким образом, чтобы терапевтически эффективное количество гибридного Fc-слитого G-CSF составляло от приблизительно 200 мкг/кг до 400 мкг/кг или от приблизительно 250 мкг/кг до 350 мкг/г.

В соответствии с вариантом осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят в дозе, составляющей приблизительно 200 мкг/кг или больше, приблизительно 210 мкг/кг или больше, приблизительно 220 мкг/кг или больше, приблизительно 230 мкг/кг или больше, приблизительно 240 мкг/кг или больше, приблизительно 250 мкг/кг или больше, приблизительно 260 мкг/кг или больше, приблизительно 270 мкг/кг или больше, приблизительно 280 мкг/кг или больше, приблизительно 290 мкг/кг или больше, приблизительно 300 мкг/кг или больше, приблизительно 310 мкг/кг или больше, приблизительно 320 мкг/кг или больше, приблизительно 330 мкг/кг или больше, приблизительно 340 мкг/кг или больше, приблизительно 350 мкг/кг или больше, приблизительно 360 мкг/кг или больше, приблизительно 370 мкг/кг или больше, приблизительно 380 мкг/кг или больше, или приблизительно 390 мкг/кг или больше, или приблизительно 400 мкг/кг.

В другом варианте осуществления, G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят в дозе, составляющей приблизительно 250 мкг/кг или больше, приблизительно 260 мкг/кг или больше, приблизительно 270 мкг/кг или больше, приблизительно 280 мкг/кг или больше, приблизительно 290 мкг/кг или больше, приблизительно 300 мкг/кг или больше, приблизительно 310 мкг / кг или больше, приблизительно 320 мкг/кг или больше, приблизительно 330 мкг/кг или больше, приблизительно 340 мкг/кг или больше или приблизительно 350 мкг/кг.

В соответствии с вариантом осуществления субъект, нуждающийся в терапии с помощью G-CSF, может являться раковым пациентом, который получал или получает противораковое лечение. Например, субъект мог получать или получает по меньшей мере одну из лучевой терапии, химиотерапии или операции.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить в дозе, составляющей 200 мкг/кг или больше, один раз в цикле химиотерапии. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 210 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 220 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 230 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления гибридный Fc-слитый G-CSF можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 240 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 250 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 260 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 270 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 280 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 290 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 300 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 310 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 320 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 330 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 340 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 350 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 360 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 370 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 380 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 390 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в цикле химиотерапии в дозе, составляющей приблизительно 400 мкг/кг или больше. G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

В другом варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить в дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до 400 мкг/кг один раз в цикле химиотерапии, через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии. В альтернативном варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить один раз в течение каждого двух, трех, четырех или больше циклов химиотерапии.

В другом варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить в диапазоне доз, составляющем от приблизительно 250 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 260 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 270 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 280 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 290 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 300 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 310 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 320 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 330 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 340 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 350 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 360 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 370 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, от приблизительно 380 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг или от приблизительно 390 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг, один раз в цикле химиотерапии через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии.

В другом варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, можно вводить в диапазоне доз, составляющем от приблизительно 250 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 260 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 270 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 280 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 290 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 300 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 310 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 320 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, от приблизительно 330 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг или от приблизительно 340 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг, один раз в цикле химиотерапии через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии.

В варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, или фармацевтическую композицию, содержащую GX-G3, можно вводить парентерально, внутримышечно, подкожно, офтальмологически, внутривенно, внутрибрюшинно, внутрикожно, внутриглазнично, внутричерепально, интракраниально, интраспинально, внутрижелудочно, интратекально, интрацистемально, внутрикапсулярно или внутриопухолево. В варианте осуществления G-CSF, слитый с гибридным Fc, или фармацевтическая композиция, содержащая GX-G3, могут вводиться парентерально или подкожно.

G-CSF, слитый с гибридным Fc (т.е. G-CSF-hyFc или hyFc-G-CSF), может быть составлен с одним или несколькими вспомогательными веществами. Активный слитый белок может быть объединен с фармацевтически приемлемым буфером, и при этом pH может быть отрегулирован для обеспечения приемлемой стабильности и приемлемого pH для введения, такого как парентеральное введение.

В соответствии с вариантом осуществления состав для G-CSF, слитого с гибридным Fc, содержит буферное средство, и/или поверхностно-активное вещество, и/или стабилизатор, и/или органический растворитель. Жидкий состав в соответствии с вариантом осуществления содержит стабильную форму G-CSF, слитого с гибридным Fc, содержит (i) терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, (ii) буферную систему, (iii) по меньшей мере один стабилизатор, и (iv) по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, и (v) необязательно пропиленгликоль в качестве органического растворителя, где pH препарата составляет от 3,8 до 6,5, предпочтительно от 4,0 до 4,6, как описано в документе PCT/TR2018/050208 (W02019/212429), полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки. Настоящее изобретение более подробно описывается следующими неограничивающими примерами.

ПРИМЕРЫ

Сначала описывается тестируемый продукт и сравниваемые продукты, используемые в доклинических и клинических исследованиях.

Тестовый продукт

Название активного вещества	: Рекомбинантный человеческий G-CSF hyFc (рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор hyFc)
Имя Кода	: GX-G3
Молекулярный вес	: 98 kDa
Размер	: Всего 838 аминокислот
Молекулярная формула	: $C_{2072}H_{3258}N_{558}O_{630}S_{16}$
Свойство	: Бесцветный и прозрачный флакон с бесцветной и прозрачной жидкостью.

GX-G3 получали путем вставки гена, экспрессирующего G-CSF-hyFc, в эукариотический вектор экспрессии pAD15 в MCS (сайт многоклонирования). Клеткой-хозяином, используемой для получения GX-G3, является яичник китайского хомячка (CHO) DG44. Это белок G-CSF человека с гомодимерной структурой в гибридизированной форме шарнирного домена IgD и домена Fc IgG4. GX-G3 поставляется со стабилизированным составом в одноразовом флаконе для инъекций в виде стерильного, бесцветного, прозрачного раствора без консервантов.

Продукты сравнения

В качестве продукта сравнения использовали эталонный продукт Neutrogin® (Filgrastim). Neutrogin® (JW Pharmaceutical, Co., Ltd) представляет собой гликозилированный рекомбинантный фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов человека. Этот продукт состоит из бесцветного порошка в флаконе (33,6 x 106 ME (263 мкг) Neutrogin) и растворителя в ампуле (1 мл). Выбран только для доклинических исследований на основании дозировки этого продукта, вводимого ежедневно во время химиотерапии.

В качестве продукта сравнения использовали эталонный продукт Neulasta® (Pegfilgrastim). Этот продукт представляет собой бесцветную прозрачную жидкость. Neulasta® (Amgen) был выбран для доклинических и клинических исследований в соответствии с дозировкой этого продукта, который вводится в разовой дозе 6 мг/0,6 мл (один предварительно заполненный шприц), и рекомендован для каждого цикла химиотерапии, по крайней мере 24 часа после цитотоксической химиотерапии. Эта дозировка точно соответствует предполагаемой дозировке тестируемого продукта.

А. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доклинические исследования эффективности, фармакологии безопасности и токсикологии GX-G3 приведены ниже;

ПРИМЕР 1**Доклиническое исследование - Тест эффективности: оценка биодоступности у нормальных крыс**

Целью этого исследования было оценить абсорбцию и биодоступность GX-G3 при однократном внутривенном и подкожном введении нормальным крысам.

В этом исследовании испытуемое вещество GX-G3 и Neutrogen® вводили внутривенно и подкожно крысам (240-260 г, возраст около 8 недель, самцы) и каждый раз брали пробы крови. Интервал времени сбора крови для внутривенного введения (0), 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 336 часов для внутривенного введения и подкожного введения на 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 и 336 часов. Состав исследуемой группы представлен в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Состав исследуемой группы, объем дозы и уровень дозы			
Группа	Лекарство	Метод применения	Доза (мкг/кг)
G1	Neutrogin®	IV	100
G2	GX-G3	IV (в/в)	100
G3	GX-G3	IV (в/в)	500
G4	Neutrogin®	SC	100
G5	GX-G3	SC	100
G6	GX-G3	SC	500

Биоанализ был проведен с собранной сывороткой, и фармакокинетические параметры были рассчитаны с использованием Phoenix™ WinNonlin® (версия 6.0, Pharsight). Фармакокинетические результаты каждой тестовой группы описаны в таблице 2, а графики показаны на рисунках 2 и 3. В результате исследования было определено, что биодоступность GX-G3 100 мкг/кг составляет 4%, а биодоступность GX-G3 500 мкг/кг - 16%.

ТАБЛИЦА 2

Фармакокинетические параметры*				
Группа	AUC _{last} (нг*ч/мл)	C _{max} (нг/мл)	t _{max} (час)	t _{1/2} (час)
G1	245.6±11.9	169.2±27.5	0.08±0.0	2.4±0.3
G2	2941.4±19.9	259.7±159.5	0.08±0.0	4.2±0.2
G3	27155.4±842.9	1478.3±24.1	0.08±0.0	11.8±0.3
G4	110.4±8.1	19.4±3.2	2.0±0	6.3±2.5
G5	111.5±25.8	4.9±1.5	14.4±5.4	12.5±1.2
G6	4287.4±1441.5	115.8±28.8	24±0.0	8.5±0.4

*Все испытываемые показаны в среднем ± SD.

ПРИМЕР 2

Доклинические исследования - Тест эффективности: Подкожное фармакокинетическое исследование однократной дозы на крысах

Целью этого исследования было оценить фармакокинетику GX-G3 при подкожном введении на модели нейтропении на крысах и на модели нормальной крысы.

В этом исследовании тестируемые продукты GX-G3, препараты сравнения Neutrogin® и Neulasta® вводили подкожно моделям крыс с нейтропенией (240-260 г, возраст примерно 8 недель, самцы) и нормальным моделям крыс (240-260 г, примерно 8 недель старый, самец), вводили один раз, а затем отбирали кровь в каждой точке. Для группы исследования модели заболевания внутрибрюшинное введение циклофосфида (ЦПА) 50 мг/кг/5 мл было выполнено за день до инъекции лекарственного средства. Применяемая доза тестируемого продукта была определена как 100 мкг/кг, такая же, как клиническая доза Neulasta®, и продукт сравнения был определен как 100 мкг/кг. Для наблюдения за дополнительной дозовой зависимостью, 25 мкг/кг, одновременно корректировали ¼ дозу. Интервал времени забора крови для крыс с моделью заболевания до введения дозы (0), 1, 4, 8, 12, 24 и 36 часов, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 и 14 дней (перекрестное соответствие образцов крови из 5 животных) определяется как; и

перед дозой (0), 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 и 36 часов, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11 и 14 дней для нормальных модельных крыс. Состав исследуемой группы представлен в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3

Состав исследуемой группы, объем дозы и уровень дозы					
Модель болезни			Нормальная модель		
Группа	Лекарство	Доза (мкг/кг)	Группа	Лекарство	Доза (мкг/кг)
G1	Neutrogen®	100	G1	Neutrogen®	100
G2	Neulasta®	100	G2	Neulasta®	100
G3	GX-G3	25	G3	GX-G3	25
G4	GX-G3	100	G4	GX-G3	100

Биоанализ был проведен с собранной сывороткой, и фармакокинетические параметры были рассчитаны с использованием Phoenix™ WinNonlin® (версия 6.0, Pharsight). Фармакокинетические результаты каждой тестовой группы описаны в таблице 4, а графики показаны на рисунках 4 и 5.

В результате исследования значение AUC_{last} тестируемого продукта показало значительное увеличение в модели заболевания по сравнению с нормальной моделью, как показано на рисунке 6. В качестве причины был сделан вывод, что действие клиренса, опосредованное рецептором G-CSF, было активным у нормальных крыс по сравнению с моделями заболевания. Значения C_{max} , t_{max} и $t_{1/2}$ аналогичны между моделями болезни и нормальными моделями.

ТАБЛИЦА 4

Фармакокинетические параметры*				
Группа	AUC _{last} (нг*ч/мл)	C _{max} (нг/мл)	t _{max} (час)	t _{1/2} (час)
Модель болезни (нейтропеническая модель)				
G1	142±20	29.6±37.8	4.0±0.0	2.6±0.2
G2	690±72	22.5±2.6	24.0±0.0	9.4±2.6
G3	31±9	1.0±0.3	14.0±7.0	-
G4	1093±372	21.8±8.0	48.0±17.0	8.8±3.7
Нормальная модель				
G1	386±413	37.2±6.1	4.0±2.4	3.6±1.9
G2	818±163	29.2±6.0	24.0±0.0	4.0±1.3
G3	17±6	0.9±0.5	12.0±0.0	13.1±3.8
G4	436±185	18.6±9.8	21.6±5.4	9.1±3.1

*Все субъекты были представлены в среднем ± SD

ПРИМЕР 3

Доклинические исследования - Тест эффективности: Однократное подкожное и внутривенное фармакодинамическое исследование на нормальных крысах

Целью этого исследования было оценить фармакодинамику GX-G3 при подкожном и внутривенном введении на моделях нормальных крыс.

В этом исследовании тестируемые продукты GX-G3, препараты сравнения Neutrogen® и Neulasta® вводили подкожно моделям крыс с нейтропенией (240-260 г, возраст примерно 8 недель, самец) и нормальным моделям крыс (240-260 г, примерно 8 недель старый, самец), вводили один раз, а затем отбирали кровь в каждой точке. В исследовании внутривенных инъекций доза тестируемого продукта GX-G3 была скорректирована так, чтобы она была такой же, как клиническая доза Neulasta®, 100 мкг/кг. Для исследования подкожной инъекции, чтобы исследовать дозовую зависимость GX-G3, было определено двукратное увеличение как 12,5, 25, 50 и 100

мкг/кг, а максимальная доза компаратора составила 100 мкг/кг. Интервал времени забора крови для крыс с моделью заболевания до введения дозы (0), 3, 6, 12, 18, 24 и 36 часов, 24, 36, 48, 72, 120, 144, 11 и 168 дней (перекрестное соответствие образцов крови из 3 животных) определяется как; и перед дозой (0), 1, 2, 2, 4, 8, 12, 24 и 36 часов, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 и 14 дней для нормальных модельных крыс. Состав исследуемой группы представлен в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Состав исследуемой группы, объем дозы и уровень дозы			
Группа	Лекарство	Метод применения	Доза (мкг/кг)
G1	GX-G3 буфер	IV (в/в)	0
G2	Neutrogen®	IV (в/в)	100
G3	Neulasta®	IV (в/в)	100
G4	GX-G3	IV (в/в)	100
G1	GX-G3 буфер	SC	0
G2	Neutrogen®	SC	100
G3	Neulasta®	SC	100
G4	GX-G3	SC	12.5
G5	GX-G3	SC	25
G6	GX-G3	SC	50
G7	GX-G3	SC	100

Биоанализ был проведен с собранной сывороткой, и фармакокинетические параметры были рассчитаны с использованием Phoenix™ WinNonlin® (версия 6.0, Pharsight). Эффекты введения GX-G3, Neutrogen® и Neulasta® у крыс описаны в таблице 6, а графики показаны на рисунках 7 и 8.

ТАБЛИЦА 6

Анализ кривой ANC*			
Группа	AUEC _{last} (10 ⁹ *день/л)	E _{max} ** (10 ⁹ /л)	T _{max} (день)
IV Инъекция			
G1	13.1±2.7	3.2±1.6	1.1±0.9
G2	19.2±1.7	9.8±0.5	0.8±0.3
G3	48.6±2.9	14.7±2.6	1.7±0.3
G4	44.4±1.9***	13.9±1.7	1.3±0.3
SC Инъекция			
G1	17.1±1.9	1.8±0.4	7.0±4.1
G2	27.2±3.7	10.5±1.0	1.0±0.0
G3	52.4±5.6	11.7±1.2	1.0±0.0
G4	39.4±4.3	7.4±0.6	1.0±0.0
G5	46.7±6.2	8.9±1.5	1.0±0.0
G6	65.8±4.3	12.0±0.7	1.0±0.0
G7	94.6±7.3****	13.2±1.3	2.0±0.0

*Все субъекты представлены как среднее ± стандартное отклонение.

**E_{макс}: Максимальный эффект

значительно отличается от G2 (***p < 0,01). Значительно отличается от G3 (****p < 0,01)

Увеличение ANC наблюдалось в результате однократного внутривенного введения GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® крысам. Значение ANC начало увеличиваться через 3 часа после инъекции в тестовой группе, показало максимальное значение через 1-2 дня после начала инъекции, а затем показало тенденцию к снижению. Кроме того, значение ANC для всей тестовой группы значительно увеличилось по сравнению с группой сравнения. AUEC_{son} ANC GX-G3 показал значительное увеличение по сравнению с Neutrogin®, без существенной разницы между GX-G3 и Neulasta®.

Увеличение ANC наблюдалось в результате однократного внутривенного введения GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® крысам. Значение ANC начало увеличиваться с 1-го дня

после инъекции в тестовой группе, показало максимальное значение через 1-2 дня после начала инъекции, а затем показало тенденцию к снижению. Кроме того, значение ANC для всей тестовой группы значительно увеличилось по сравнению с группой сравнения (G1). Значение ANC для GX-G3, вводимого в дозах 12,5, 25, 50 и 100 мкг/кг, показало дозозависимое увеличение по сравнению с группой сравнения. При 100 мкг/кг GX-G3, Neutrogin® и Neulasta®, вводимых с тем же количеством, AUEC_{last} GX-G3 показал значительное увеличение по сравнению с Neutrogin® и Neulasta®.

Когда результаты были рассмотрены вместе, гематологические уровни GX-G3 при внутривенных и подкожных инъекциях показали значительное увеличение у нормальных модельных крыс по сравнению с группой носителя и Neutrogin®, и только группа подкожных инъекций показала значительное увеличение по сравнению с Neulasta®.

В результате исследования внутривенная инъекция GX-G3 показала примерно в 2,3 раза большую эффективность, чем Neutrogin®, и в 0,9 раза большую эффективность, чем у Neulasta®. В результате подкожной инъекции была выявлена дозозависимая реакция GX-G3, и было обнаружено, что такое же количество GX-G3 имело эффект примерно в 3,5 раза больше, чем Neutrogin®, и в 1,8 раза больше, чем Neulasta®.

ПРИМЕР 4

Доклинические исследования - Тест эффективности: Исследование подкожной фармакодинамики однократной дозы на крысах, перенесших нейтропению, вызванную химиотерапией

Целью этого исследования было оценить фармакодинамику GX-G3 при подкожном введении на моделях нейтропенических крыс.

В этом исследовании эффективности тестируемый продукт GX-G3, препараты сравнения Neutrogin® и Neulasta® вводили однократно подкожно нейтропеническим крысам (240-260 г, возраст приблизительно 8 недель, самцы), а затем гематологические уровни использовали для оценки индекса. Чтобы исследовать дозозависимость GX-G3 на модели заболевания, её дважды доводили до 25, 50 и 100 мкг/кг, а максимальную дозу доводили до ожидаемой клинической дозы препарата сравнения Neulasta®. В

группе моделирования нейтропении за день до инъекции препарата вводили внутривенный циклофосфамид (CPA) 80 мг/кг/5 мл. Временной интервал забора крови был определен как предварительная доза (0), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 и 14 дней после введения CPA. Состав исследовательской группы представлен в таблице 7.

ТАБЛИЦА 7

Состав исследуемой группы, объем дозы и уровень дозы		
Группа	Лекарство	Доза (мкг/кг)
G1	Контрольная группа (Без лечения)	-
G2	GX-G3 буфер	0
G3	Neutrogen®	100
G4	Neulasta®	100
G5	GX-G3	25
G6	GX-G3	50
G7	GX-G3	100

Анализ гематологических уровней проводили с использованием Phoenix™ WinNonlin® (версия 6.0, Pharsight). Эффекты введения GX-G3, Neutrogen® и Neulasta® у нейтропенических крыс объяснены в таблице 8, а график показан на рисунке 9.

ТАБЛИЦА 8

Анализ кривой ANC (абсолютное количество нейтрофилов)*				
Группа	AUEC _{last} (10 ⁹ *день/л)	E _{max} ** (10 ⁹ /л)	T _{max} (день)	Время нейтропении (DN) (день)
G1	13.6±3.2	2.2±0.8	4.2±5.8	-
G2	20.9±3.3	4.2±1.0	10.8±2.0	8.7±0.4
G3	23.6±3.5	3.6±0.8	8.2±4.1	5.9±0.5
G4	36.8±9.8	6.0±2.7	7.0±3.5	3.9±0.8
G5	36.5±9.8	6.2±2.0	7.0±3.5	4.1±1.0
G6	47.0±7.1	6.9±1.1	7.8±1.8	3.0±0.3
G7	78.9±19.7	12.0±3.0	8.6±2.2	2.6±0.4

*Все субъекты представлены как среднее ± SD.

Однократная внутривенная инъекция циклофосфида (CPA) 80 мг/кг привела к появлению крыс ANC, как показано в группе сравнения (G2) на рисунке 9. На 1-й день после инъекции CPA однократно вводили GX-G3, Neutrogin® и Neulasta®, и увеличение ANC начинало появляться на 5-й день (5-й день после инъекции CPA) после начала инъекции. GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® показали максимальное значение на 7-9-й день после инъекции, а затем показали тенденцию к снижению.

ANC при всех дозах GX-G3, Neutrogin® и Neulasta® значительно увеличивался через 2 дня после инъекции CPA по сравнению с группой сравнения, а повышенный ANC вернулся к норме к 11-14 дню.

Эффект AUEC_{last} на кривую ANC в группе GX-G3 100 мкг/кг был примерно в 3,3 раза больше, чем в группе Neutrogin® с таким же количеством, и примерно в 2,1 раза больше, чем в группе Neulasta®. AUEC_{last} GX-G3 ANC при GX-G3 25, 50 и 100 мкг/кг увеличивался в зависимости от дозы. AUEC_{last} и E_{max} ANC для Neulasta® 100 мкг/кг были эквивалентны при GX-G3 25 мкг/кг (приблизительно один раз), а время восстановления нейтропении было аналогичным при GX-G3 25 мкг/кг.

Наблюдение в течение 2 недель после однократной подкожной инъекции GX-G3, Neutrogen® и Neulasta®, гематологические уровни GX-G3 (ANC) показали значительное повышение у крыс с нейтропенией, получавших CPA, по сравнению с группой сравнения и тем же Neutrogen® и Neulasta® Neulasta® продемонстрировал примерно в 3,3 раза и 2,1 раза большую эффективность (кривые AUC_{last} и ANC) по сравнению с их массой, а также примерно 1-кратный эквивалентный эффект по сравнению с дозой (25 мкг/кг). Такое же количество GX-G3 показало эффект уменьшения нейтропении примерно на 3,3 дня по сравнению с Neutrogen® и эффект уменьшения на 1,3 дня по сравнению с Neulasta®.

ПРИМЕР 5

Доклинические исследования - Фармакология безопасности: Влияние на напряжение клонированного канала hERG, выраженный в клетках CHO

Целью этого исследования было оценить потенциальное влияние GX-G3 на реполяризацию сердца с использованием анализа напряжения hERG на клонированный канал hERG, экспрессируемый в клетках CHO, с использованием метода зажима целых клеток. Исследование проводилось с целью оценки потенциала тестируемых продуктов при синдроме удлинённого интервала QT.

После стабилизации напряжения hERG скорость восстановления регистрировали во время 0,3% буфера для рецептуры GX-G3 (v/v) В нормальном растворе тирода (контроль сравнения), и GX-G3 перфузировали в течение 5 минут. Когда контрольный образец был перфузирован, напряжение hERG подавлялся примерно до 2,7%, а при перфузируемых концентрациях GX-G3 при 6 мкг/мл, 30 мкг/мл и 60 мкг/мл ток hERG подавлялся примерно на 1,5, 4,6 и 2,4% соответственно.

Следовательно, GX-G3 не показал статистически значимой разницы в ингибировании напряжения канала hERG до 60 мкг/мл. Эффекты сравнительного контроля, GX-G3 и E-4031 (положительный контроль) на клонированные каналы hERG, экспрессируемые в клетках яичника китайского хомячка (CHO), показаны в таблице 9.

ТАБЛИЦА 9

Оценка сравнительного контроля, GX-G3 и E-4031 (положительный контроль) на клонированные каналы hERG, экспрессируемые в клетках яичника китайского хомячка (CHO)			
Концентрация	Степень подавления (%) Среднее	SEM***	N
Контрольная группа*	2.7	1.2	3
6 мкг/мл GX-G3	1.5	1.3	3
30 мкг/мл GX-G3	4.6	3.3	3
60 мкг/мл GX-G3	2.4	1.1	3
Положительный контроль**	79.4****	2.6	4

*Контрольная группа: 0,3% буфер для состава GX-G3 в нормальном растворе Тироде.

** Положительный контроль: E-4031 100 нМ. ***SEM: Стандартная ошибка (погрешность) среднего. ****: значимость при $p < 0,01$, E-4031 по сравнению с контрольной группой, t-критерий обучающего.

ПРИМЕР 6

Доклинические исследования - Фармакология безопасности: Исследование нейроповедения (модифицированный тест Ирвина) и температуры тела на крысах

Целью этого исследования было оценить влияние GX-G3 на нейроповедение (модифицированный тест Ирвина) и температуру тела у крыс после приема дозы GX-G3.

В этом исследовании нейроповеденческая функция (движение, подъем хвоста, тремор, судороги, тонус живота, каталепсия, тракция, выпрямление, рефлекс, ушной рефлекс, пилоэрекция, цвет кожи, частота дыхания, веко, экзофтальмия, слезотечение, слюноотделение, диарея, смертность и рефлекс испуга) и его способность вызывать изменения температуры тела. Крысы (240-260 г, возраст примерно 8 недель) получали GX-G3 подкожно в дозах 0 (контрольная), 1, 3 и 10 мг/кг соответственно. Нейроповеденческие наблюдения и измерения температуры тела регистрировались до и через 2, 4, 8, 24 и 48 часов после введения дозы.

Никаких значительных изменений нейроповеденческой функции как у самцов, так и у самок не наблюдалось до однократной подкожной дозы 10 мг/кг GX-G3.

Температура тела увеличивалась на 1 мг/кг в обработанной группе по сравнению с контрольной группой у самцов крыс через 2 и 4 часа (2 часа: от $38,1 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ до $38,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, 4 часа: от $37,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ до $38,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$). Однако, поскольку это повышение находилось в диапазоне индивидуальных вариаций температуры тела в контрольной группе ($37,5\text{--}38,8^{\circ}\text{C}$) и не зависело от дозы, тест не считался связанным с продуктом. Не было изменений температуры тела в других обработанных группах по сравнению с контрольной группой во все моменты времени.

Таким образом, подкожное введение GX-G3 не влияло на нейроповеденческую функцию и температуру тела у крыс до 10 мг/кг.

ПРИМЕР 7

Доклинические исследования - Фармакология безопасности: Исследование респираторной функции у крыс после однократного подкожного введения

Целью этого исследования было оценить влияние GX-G3 на частоту дыхания, дыхательный объем и минутный объем после однократной подкожной дозы GX-G3.

Крысам (240-260 г, возраст примерно 8 недель, самцы) вводили GX-G3 подкожно в дозах 0 (контроль), 1, 3 и 10 мг/кг соответственно. Параметры легочной функции регистрировали перед дозированием и через 2, 4, 8, 24 и 48 часов после дозирования.

Однократная подкожная доза GX-G3 не вызвала значительных изменений частоты дыхания, дыхательного объема и минутного объема в любое время в группе, получавшей дозу до 10 мг/кг. Таким образом, однократное подкожное введение GX-G3 не повлияло на респираторную функцию у крыс при дозах до 10 мг/кг.

ПРИМЕР 8

Доклиническое исследование - Фармакология безопасности: влияние однократного подкожного введения на сердечно-сосудистую систему у самцов яванских макаков с использованием телеметрии

Целью этого исследования было наблюдение и изучение влияния подкожной дозы GX-G3 на сердечно-сосудистую систему (артериальное давление, частоту сердечных

сокращений и электрокардиограмму, ЭКГ) у самцов яванских макак с использованием телеметрии.

GX-G3 вводили подкожно в виде однократной дозы самцам синонолгусов при уровнях доз 0 (контроль), 1 и 3 мг/кг, чтобы исследовать его фармакологический эффект безопасности на сердечно-сосудистую систему. Через 3 дня после введения контрольной группы (V.C) тому же животному вводили 1 мг/кг (T1). После подтверждения нормализации нейтрофилов гематологическим анализом с интервалом вымывания 21 день животному вводили 3 мг/кг (T2). Затем с помощью телеметрии измеряли артериальное давление, частоту сердечных сокращений и ЭКГ до и через 2, 6, 24, 72 часа (3 дня), 168 часов (7 дней) и 312 часов (13 дней) после введения.

Изменение нейтрофилов после введения GX-G3 показано в таблицах 10 и 11. Согласно результатам, значительных изменений систолического, диастолического, среднего кровяного давления не наблюдалось, а также частоты сердечных сокращений на каждый момент измерения во всех группах дозирования по сравнению с контрольной группой. Не было значительных изменений в интервале PR, QRS, RR, QT и QTcF на каждый момент измерения в других группах дозирования по сравнению с контрольной группой. При анализе формы волны ЭКГ ни в одной группе не было аномальных форм волны ЭКГ, таких как аритмия. При наблюдении за клиническими симптомами никаких клинических проявлений не обнаружено, влияющих на оценку сердечно-сосудистой системы в группе введения, включая контрольную группу.

В результате гематологического анализа нейтрофилы увеличились и вернулись к начальному уровню, что и до введения, через 20 дней после приёма. Учитывая эти результаты, не было фармакологического воздействия на сердечно-сосудистые функции, включая артериальное давление, частоту сердечных сокращений и форму волны ЭКГ, из-за однократного подкожного введения GX-G3 в объеме менее 3 мг/кг у самцов яванских макак.

ТАБЛИЦА 10

Изменение нейтрофилов после введения 1 мг/кг GX-G3					
№	V.C.	T1 (1 мг/кг, на 4-й день применения)			
	День 2 (Через 1 день после введения V.C.)	День 7 (Через 3 день после введения T1)	День 11 (Через 7 день после введения T1)	День 17 (Через 13 день после введения T1)	День 24 (Через 20 день после введения T1)
1	7.97 (исходный)	60.70 (x 7.62)*	41.29 (x 5.18)	21.24 (x 2.66)	3.62 (x 0.45)
2	6.61 (исходный)	41.46 (x 6.27)	59.87 (x 9.06)	19.09 (x 2.89)	6.17 (x 0.93)
3	4.31 (исходный)	31.33 (x 7.27)	16.32 (x 3.79)	11.30 (x 2.62)	4.02 (x 0.93)
4	4.82 (исходный)	68.84 (x 14.28)	48.49 (x 10.06)	20.88 (x 4.33)	7.87 (x 1.63)

*Базовые кратные значения

ТАБЛИЦА 11

Изменение нейтрофилов после введения 3 мг/кг GX-G3					
№	V.C.	T2 (3 мг/кг, на 25-й день применения)			
	День 2 (Через 2 день после введения V.C.)	День 28 (Через 3 день после введения T2)	День 32 (Через 7 день после введения T2)	День 38 (Через 13 день после введения T2)	День 45 (Через 20 день после введения T2)
1	7.97 (исходный)	42.67 (x 5.35)*	6.42 (x 0.81)	2.20 (x 0.28)	3.37 (x 0.42)
2	6.61 (исходный)	110.70 (x 16.75)	61.29 (x 9.27)	21.18 (x 3.20)	4.92 (x 0.74)
3	4.31 (исходный)	69.72 (x 16.18)	23.14 (x 5.37)	15.92 (x 3.69)	5.77 (x 1.34)
4	4.82 (исходный)	132.20 (x 27.43)	70.88 (x 14.71)	33.51 (x 6.95)	9.60 (x 1.99)

*Базовые кратные значения

Все исследования фармакологического тестирования безопасности показывают, что введение GX-G3 не оказывает значительного влияния на параметры, связанные с безопасностью. Исследования фармакологии безопасности (примеры 5-9) кратко представлены на рисунке 10.

ПРИМЕР 9

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: Исследование подкожной токсичности при введении одной дозы на крысах

Целью этого исследования было оценить острую токсичность после однократного подкожного введения GX-G3 крысам. Для исследования острой токсичности GX-G3 после однократного подкожного введения крысам Sprague-Dawley (240-260 г, возраст примерно 8 недель) вводили однократную дозу 0 (контрольная), 1, 3 и 10 мг/кг, вскрытие было выполнено после 15-дневного периода наблюдения. Смертность, клинические наблюдения, измерение массы тела (MT) и макроскопические наблюдения проводились во время исследования.

Результаты однократного подкожного введения GX-G3 показали, что никаких отклонений, связанных с исследуемым веществом, не наблюдалось в отношении смертности, клинических наблюдений и изменений массы тела. При вскрытии увеличение селезенки из-за тестируемого вещества наблюдалось при дозах 1 и 3 мг/кг у 1 самца и 10 мг/кг у всех самцов; однако эти изменения были расценены как фармакокинетические эффекты. Таким образом, в этом исследовании предполагалось, что приблизительная летальная доза (ALD) будет выше 10 мг/кг для обоих полов.

ПРИМЕР 10

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 2-х недельное исследование подкожного повторного определения диапазона доз (DRF) на крысах

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 после 2-х недель подкожного введения у крыс и предложить соответствующие диапазоны доз в 4-х недельном токсикологическом исследовании.

Чтобы установить диапазоны доз для 4-х недельного исследования токсичности повторных доз путем изучения 2-х недельного повторного подкожного введения GX-G3, крысы (240-260 г, возраст примерно 8 недель) в 0 (контрольная), 1, 3 и 5 мг/кг вводили подкожно один раз в два дня (всего 7 раз) в течение 2-х недель. Смертность, клинические наблюдения, измерение массы тела, измерение потребления пищи, офтальмологическое обследование, анализ мочи/ химический анализ мочи, гематология, клиническая химия, макроскопические наблюдения, измерение веса органов и микроскопические наблюдения.

Результаты повторного подкожного введения GX-G3 крысам через день в дозах 0, 1, 3 и 5 мг/кг (7 раз) в течение 2-х недель, смертность, связанная с исследуемым веществом, масса тела, потребление пищи, обследование глаз и анализ мочи/ химический состав мочи не наблюдались. Повышенный кроветворный эффект в селезенке и задних конечностях был принят как фармакологический эффект тестируемого вещества. Резорбция/остеогенез кости, наблюдаемая у 2-х самок при дозе 5 мг/кг, подкожный отек задней конечности и связанный с этим повышенный уровень ЩФ и отек задней конечности (при вскрытии) являются побочными эффектами, связанными с исследуемым препаратом.

Поэтому наивысшая доза для исследования токсичности повторных доз в течение 4-х недель считалась ниже 3 мг/кг при введении через день и ниже 10 мг/кг при введении один раз в неделю.

ПРИМЕР 11

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 2-х недельное исследование подкожного повторного введения доз (DRF) на обезьянах *Cynomolgus*

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 после 2-х недель подкожного введения у яванских макак и предложить соответствующие диапазоны доз в 4-недельном токсикологическом исследовании. Для определения диапазонов доз для 4-х недельного исследования токсичности с повторной дозой, посвященного 2-х недельному повторному подкожному введению GX-G3, макакам *Cynomolgus* (3010-4237 г, у самцов и 2571-3373 г, у самок в возрасте приблизительно 4 лет) вводили 0 через день в течение 2 недель (контрольная) вводили подкожной

инъекцией в дозах 1, 5 и 10 мг/кг (7 раз в сумме). Были выполнены исследования смертности, клинические наблюдения, измерение веса тела, измерение потребления пищи, офтальмологическое обследование, анализ мочи / химический анализ мочи, гематология, клиническая химия, макроскопическое наблюдение и измерение веса органов.

Результаты многократного подкожного введения GX-G3 макакам-яванкам показали, что изменений, связанных с исследуемым веществом не наблюдалось, в отношении смертности, изменений массы тела, офтальмологического обследования и анализа мочи / химического состава мочи. Наблюдались отёк, изменение цвета кожи или выделения на коже, связанные с испытуемым веществом, и при дозе 10 мг/кг самки показали снижение потребления пищи. Количество лейкоцитов, особенно количество нейтрофилов, заметно увеличилось, а количество эритроцитов, гемоглобина, гематокрита и тромбоцитов заметно снизилось при дозе 5 мг/кг. Кроме того, щелочная фосфатаза (ALP) и гамма-глутамилтранспептидаза (GGT) были увеличены, а глюкоза (GLU) снизилась (за исключением женщин в дозе 10 мг/кг) у обоих полов во всех группах лечения. При измерении веса органов вес селезёнки при 5 мг/кг был заметно увеличен, что соответствовало увеличению селезёнки при макроскопическом исследовании. Эти изменения считались фармакологическими эффектами, связанными с исследуемым препаратом. Поэтому наивысшая доза для 4-х недельного исследования токсичности повторных доз была сочтена менее 5 мг/кг при введении через день и ниже 10 мг/кг при введении один раз в неделю.

ПРИМЕР 12

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 4-х недельное подкожное исследование токсичности повторных доз и токсикокинетики GX-G3 на крысах с 4-х недельным периодом восстановления

Целью этого исследования было изучить токсичность и токсикокинетические профили GX-G3 после 4-х недель повторной подкожной инъекции у крыс. Обратимость лечения GX-G3 оценивали на крысах в течение 4-х недель выздоровления.

Для исследования токсичности и токсикокинетических профилей, наблюдаемых после многократного подкожного введения GX-G3 в течение 4-х недель, и оценки обратимости в течение 4-х недельного периода восстановления крыс Sprague-Dawley

кормили GX-G3 (184,5-226,1 г, для самцов и 99,0 г). 120,1 г, у самок, примерно 5 раз в неделю)) 0, 1, 3 и 10 мг / кг (10 или 15 самцов и самок в каждой группе) вводили один раз в неделю (всего 4 дозы) в течение 4-х недель, а 4-х недельный период восстановления наблюдался после завершения лечения у крыс. Во время исследования проводились смертность, клинические признаки и подробные клинические признаки, измерение массы тела, потребление пищи, офтальмология, анализ мочи / химический анализ мочи, гематология, коагуляция, клиническая химия, измерение веса органов, макро- и микроскопические исследования, токсикокинетический анализ и анализ иммуногенности.

По результатам многократного подкожного введения GX-G3, подкожной инъекции (всего 4 дозы) и после 4 недель лечения GX-G3 с периодом восстановления 4 недели не наблюдалось никаких аномальных изменений в смертности, офтальмологии и анализе мочи/химии мочи, связанных с исследуемым веществом. Во время лечения аномальная походка и отёк задних ног наблюдались у обоих полов при дозе ≥ 3 мг/кг, а также снижение прибавки в весе у самок в группе высоких доз, которое сохранялось до выздоровления. Фармакологические эффекты, связанные с кроветворением, наблюдались при гематологическом и микроскопическом исследовании. В клинической химии повышение уровня щелочной фосфатазы (ALP) было связано с результатами микроскопических исследований, включая синовиальную пролиферацию, подкожный/ синовиальный отёк, инфильтрацию синовиальной оболочки/ мышечных клеток и умеренный остеогенез/ резорбцию кости, и это считалось неблагоприятным явлением, связанным к тестовой статье. Поскольку эти изменения наблюдались у обоих полов при ≥ 3 мг/кг, и некоторые изменения не возвращались после завершения периода восстановления, уровень отсутствия побочных эффектов (NOAEL) был принят равным 1 мг/кг для обоих полов.

ПРИМЕР 13

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 4-недельное исследование токсичности и токсикокинетики подкожных многократных доз на яванских макаках с 4-недельным периодом восстановления

Целью этого исследования было изучить токсичность и токсикокинетические профили GX-G3 после 4 недель повторной подкожной инъекции у обезьян. Обратимость

лечения GX-G3 оценивали на обезьянах в течение 4-недельного периода восстановления.

Для исследования токсичности и токсикокинетических профилей, наблюдаемых после повторного подкожного дозирования GX-G3 в течение 4-х недель, и оценки обратимости в течение 4-х недельного периода восстановления, GX-G3 вводили обезьянам *sinomolgus* (2310-3009 г, у самцов и 2199 г-2704 г, у самок, около 3 лет) при 0 (контрольной), 1, 3 и 10 мг/кг (всего 4 дозы) один раз в неделю в течение 4-х недель. Обратимость любого эффекта лечения GX-G3 оценивалась на подгруппе обезьян, которым был назначен 4-х недельный период восстановления после завершения лечения. Во время исследования проводились смертность, клинические признаки, измерение массы тела, потребление пищи, офтальмология, электрокардиография, общий анализ мочи/ химический анализ мочи, гематология, коагуляция, клиническая химия, масса органов, макро- и микроскопические исследования, токсикокинетический анализ и анализ иммуногенности.

Уровень смертности для обоих полов при дозе 10 мг/кг (живые животные принесены в жертву и найденные мёртвые животные) и на основе микроскопических данных в головном мозге (нейрональный некроз, нейроглиоз и пигментные гистиоциты), бедренной кости/ костном мозге (гиперостоз) и костном мозге (фиброз) - Побочных эффектов нет (NOAEL), наблюдаемое у обоих полов в группах восстановления, было принято равным 3 мг/кг для обоих полов.

ПРИМЕР 14

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: Исследование токсичности подкожного (SC) эмбриофетального развития у крыс

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 для материнской части и их развития при подкожном введении (SC) предполагаемым беременным крысам Sprague Dawley в течение органогенетического периода вида, а именно в день беременности (GD) с 6 до 17. Беременных крыс (220-291 г, около 10 недель) лечили с применением подкожно (SC) при 0 (контрольная), 1, 3 и 5 мг/кг GX-G3 (объем введения 1 мл/кг) четыре раза во время органогенеза, каждые 3 дня, GD 6, 9, 12 и 15 для каждой группы доз. За всеми самками ежедневно наблюдали за общим состоянием, течением беременности, клиническими признаками и

смертностью. Кесарево сечение было выполнено у крыс GD 20, и были записаны вес интактной матки, желтое тело и количество имплантаций, количество живых плодов и эмбриофетальная гибель, пол плода, параметры веса плода и плаценты.

Согласно GX-G3, вводимому беременным крысам подкожно каждые 3 дня в течение органогенетического периода при 0 (контрольная) в GD 6, 9, 12 и 15, тестировали все дозы 1, 3 и 5 мг/кг было выполнено для беременных животных. Набухшие задние конечности и увеличенная селезенка являются ожидаемыми результатами, поскольку они уже наблюдались в предыдущих токсикологических исследованиях с GX-G3.

Вмешательства в течение беременности не наблюдалось. Никаких побочных эффектов на эмбриофетальное развитие и никаких доказательств тератогенности при всех дозах не отмечено. При текущем графике и продолжительности лечения 5 мг/кг для самки матери считалось NOAEL, поскольку наблюдались только фармакологически связанные увеличение селезенки и опухшие задние лапы, которые не влияли на нормальное поведение животных.

Доза 5 мг/кг (AUC_{0-72} часа после однократного и повторного введения 1990 г, и 1530 мкг.ч/мл соответственно) считалась NOAEL для эмбриофетального развития из-за наличия фармакологически связанного увеличения селезенки.

ПРИМЕР 15

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: Исследование токсичности подкожного (SC) эмбриофетального развития кроликов

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 для матери и развития при подкожном введении (SC) предполагаемым беременным новозеландским белым кроликам в течение органогенетического периода вида, то есть в день беременности (GD) с 6 по 19. Для каждой группы доз беременные кролики (2,75-4,09 кг, возраст примерно 4-5 месяцев), 0 (контрольная, 1 мл/кг), 0,035 мг/кг (0,35 мл/кг), 0,1, 0,3 и 1 мг/кг, GX-G3 (1 мл/кг) вводили подкожно (SC) во время органогенеза пять раз, каждые 3 дня, в дни беременности (GDs) 6, 9, 12, 15 и 18. За всеми самками ежедневно наблюдали за общим состоянием, течением беременности, клиническими признаками и смертностью. Разрез кесарева сечения было выполнено у кроликов в GD 29 и регистрировали следующие параметры: неповрежденный вес

матки, количество желтого тела и имплантации, количество жизнеспособных плодов и эмбриофетальных смертей, пол плода, вес плода и плаценты.

Потребление пищи, согласно GX-G3, вводимой подкожно беременным кроликам каждые 3 дня во время органогенеза при 0 (контрольная), 0,035, 0,1, 0,3 и 1 мг/кг в GD 6, 9, 12, 15 и 18 и минимально низком весе тела, прибавка в весе до 0,1 мг/кг по сравнению с контрольной группой, в то время как эти эффекты были умеренными при 0,3 и 1 мг/кг. В дозах 0,3 и 1 мг/кг GX-G3 мешал поддержанию беременности, что приводило к выкидышам и увеличению абсорбции.

При текущем графике и продолжительности лечения доза 0,035 мг/кг (AUC_{last} , C_{max} 0,0612 мкг/мл после однократного введения 2,13 мкг.ч/мл; на 9-й и 12-й дни беременности значения C24 в сыворотке были 28 и GD 6 соответственно. Также 24% значений C24 (ниже предела количественного определения C24 в сыворотке в GD 15 и 18) считались NOAEL для матери на основе минимального воздействия на массу тела и потребление пищи. Принимая во внимание единственное минимальное снижение массы тела плода, 0,035 мг/кг также было принято в качестве NOAEL (Уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) для эмбриофетального развития.

ПРИМЕР 16

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 26-недельное исследование подкожной (SC) токсичности у крыс Sprague Dawley после 8-недельного периода восстановления

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 для лечения нейтропении, вызванной химиотерапией, при подкожном введении (SC) еженедельно в течение двадцати шести недель подряд крысам Sprague Dawley и изучить обратимость изменений после восьминедельного периода восстановления.

Чтобы исследовать профили токсичности, наблюдаемые после повторного подкожного введения GX-G3, и оценить обратимость времени восстановления, крысы Sprague Dawley (205-261 г, у самцов, 173-220 г, у самок, возраст примерно 6-7 недель) 0 (контрольная), 1 GX-G3 вводили еженедельно в дозах 3 и 5 мг/кг в виде 26-ти недельного повторного подкожного введения (двадцать шесть общих курсов лечения). Дополнительные животные обоих полов были добавлены в контрольную

группу и группы с высокими дозами, получавших лечение по той же схеме, с периодом восстановления в восемь недель. За животными ежедневно наблюдали на предмет смертности и клинических признаков.

Лечение привело к отеку задних конечностей и затруднению движений при всех дозах, с более тяжелыми последствиями для самцов. Животные, пораженные изменениями конечностей, также испытали потерю массы тела, снижение потребления пищи и иногда пушистый мех, снижение активности, редко одышку и хромодакрилат в качестве вторичного эффекта. В результате самец-жертва был омертвлен в низкой дозе из-за тяжелой клинической картины.

Гистологическое исследование показало несколько результатов, связанных с морфологическими показателями и увеличением нейтрофилов и лимфоцитов, отмеченными при гематологических определениях, что согласуется с результатами преувеличенного увеличения миелопоза и связанной с ним эмболии. На основании некротических поражений, отмеченных в группах со средней и высокой дозой в применяемых экспериментальных условиях, NOAEL (уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов) для тестируемого вещества был определен как 1 мг/кг.

ПРИМЕР 17

Доклинические исследования - Токсикологическое исследование: 26-недельное исследование подкожной (SC) токсичности на яванских макаках после 8-недельного периода восстановления

Целью этого исследования было изучить потенциальную токсичность GX-G3 для лечения нейтропении, вызванной химиотерапией, при введении подкожно (SC) еженедельно в течение двадцати шести недель обезьянам яванской макаки и изучить обратимость изменений, если таковые имеются, после восьминедельного периода восстановления. Из-за результатов, наблюдаемых при средней и высокой дозе и смертности при наивысшей дозе после введения второй дозы, график дозирования был изменен на каждые две недели (новые дни дозирования: 1, 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176).

Группам яванских макак (вес 2-4 кг, приблизительно 2,5-3 года) давали контрольную (0), 1, 3 или 5 мг/кг GX-G3, дополнительные животные в контрольной группе и группе

с высокой дозой продемонстрировали обратимость изменения, если таковые имеются, после восьминедельного периода восстановления, включенные в исследование для изучения. Клинические признаки проверяли ежедневно.

Смертность наступила при наивысшей дозе на 17-й день (после дозирования на 1 и 8 день) из-за чрезмерно высокого увеличения миелопоэза (myelopoiesis) со значительным увеличением циркулирующих клеток крови с эмболией гранулоцитов в различных органах. При более низких дозах были обнаружены только эффекты, связанные с фармакологической активностью тестируемого вещества, и доза 3 мг/кг каждые две недели в течение 26 недель считалась NOAEL.

Основываясь на результатах токсикологических и токсикокинетических исследований (примеры 9-17), NOAEL GX-G3 был оценен на уровне 1 мг/кг для грызунов (крысы) и 3 мг/кг для не грызунов (макаки *symplopus*). Эта установленная доза NOAEL ниже, чем у G-CSF второго поколения, пегфилграстима NOAEL. Доза пегфилграстима NOAEL для обезьян составляет 750 мкг/кг (FDA-Non-Clinical Review (s) 2018). Токсикологические и токсикокинетические исследования (примеры 9-17) обобщены на рисунке 11.

Данные экспериментов *in vitro* или исследований на животных можно использовать для определения диапазона доз для применения на людях. Терапевтически эффективные дозы, полученные на животной модели, могут быть преобразованы для использования на другом животном, включая людей, с использованием известных в данной области коэффициентов преобразования (Freireich et al., Cancer Chemother. Reports, 1966, 50 (4): 219-244 и таблица 12) .

ТАБЛИЦА 12

Факторы дозировки эквивалентной площади поверхности					
	Мышь (20 кг)	Крыса (150 г)	Обезьяна (3.5 кг)	Собака (8 кг)	Человек (60 кг)
Мышь	1	1/2	1/4	1/6	1/12
Крыса	2	1	1/2	1/4	1/7
Обезьяна	4	2	1	3/5	1/3
Собака	6	4	3/5	1	1/2
Человек	12	7	3	2	1

После неклинических исследований первое клиническое испытание GX-G3 фазы I на людях, полностью учитывая безопасность и переносимость, определило GX-G3 12,5 мкг/кг, 25 мкг/кг, 50 мкг/кг, 100 мкг/кг, Диапазон доз 200 мкг/кг и 400 мкг/кг для здоровых добровольцев.

В. КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические испытания исследований GX-G3 на людях по настоящему изобретению приведены ниже;

ПРИМЕР 18

Клиническое исследование: Фаза I

Исследование фазы I было проведено для изучения безопасности, переносимости и фармакокинетики / фармакодинамики GX-G3 после однократного подкожного введения здоровым мужчинам.

i. Цель :

Основная цель фазы I - оценить переносимость после однократного подкожного введения GX-G3 здоровым мужчинам.

Вторичными целями являются безопасность (нежелательные явления, показатели жизненно важных функций, физическое обследование, электрокардиограмма, клинические лабораторные тесты и радиологические исследования), фармакокинетика

(PK), фармакодинамика (PD) и соотношение PK-PD после однократного подкожного введения GX-G3 в здоровые взрослые субъекты мужского пола для оценки и сравнения их с однократным подкожным введением Neulasta®. Также другой целью является оценка иммуногенности после однократного подкожного введения GX-G3 здоровым взрослым мужчинам.

ii. Дизайн и план исследования

Это рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, активно-контролируемое клиническое испытание фазы I с блокировкой дозы для изучения безопасности, переносимости и фармакокинетики / фармакодинамики GX-G3 после однократного подкожного введения у здоровых мужчин. Несмотря на то, что существует исследовательское клиническое испытание фазы I, в котором наблюдают ограничивающую дозу токсичность (DLT), двойной слепой и рандомизированный дизайн применяется к группе лечения GX-G3 и группе лечения плацебо, чтобы уменьшить систематическую ошибку со стороны исследователей или субъектов во время исследования, несмотря на отчет о побочных эффектах.

Продолжительность лечения и наблюдения за субъектом составляет приблизительно 6-10 недель (включая тестирование на иммуногенность). Субъекта проверяют на анамнез, физический осмотр и клинические лабораторные исследования в течение 28 дней (день 1-й) до даты введения исследуемого препарата. В результате скрининга человек, который признан подходящим для этого клинического испытания, поступает в центр клинических исследований и голодает в течении дня (день -1) до введения исследуемого препарата. Каждый субъект выписывается после завершения всех тестов на 5-й день (день 4-й) и 7 раз приезжает в центр для последующего наблюдения.

Переносимость и безопасность будут соблюдаться в течение 3-х недель после завершения однократного введения в каждой группе доз. После завершения оценки переносимости и безопасности в каждой дозовой группе из группы, получавшей GX-G3, доза будет увеличена до следующей дозы. Neulasta®, тот же препарат непрерывного действия G-CSF, будет выбран в качестве активной контрольной группы и введён параллельно с группой максимальной дозы GX-G3.

Продолжительность приема и наблюдения, определенная в этом клиническом исследовании, считается подходящей для оценки переносимости, безопасности, а также фармакокинетических и фармакодинамических переменных.

Таким образом, это будет первое клиническое испытание на людях, в котором полностью рассмотрены безопасность и переносимость, основанное на предположении, что GX-G3, фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов, вводится в дозе в пределах диапазона, определенного в этом клиническом испытании.

iii. Исследуемая популяция

Всего было проанализировано 6 групп приема GX-G3 (6 тестовых групп + 2 плацебо) в каждой дозовой группе и 6 испытуемых субъектов (6 Neulasta® 6 мг) в активной контрольной группе и 8 испытуемых субъектов - всего 54 здоровых субъекта мужского пола.

Для фазы I испытуемые были проверены по следующим характеристикам или параметрам:

Критерии включения:

1. Волонтер, который решает участвовать добровольно и подписывает письменное согласие после понимания подробного описания этого клинического исследования.
2. Здоровый мужчина старше 20 лет и моложе 45 лет на момент скрининга.
3. Субъект с массой тела от 60 кг до 94,0 кг и индексом массы тела (ВМТ) от 19 кг/м² до 27 кг/м².
4. В результате скрининга субъект подходит для данного клинического исследования.

Критерии исключения:

1. Человек с клинически значимым заболеванием гепатобилиарной системы, почек, нервной системы (центральной или периферической), дыхательной системы,

эндокринной системы (диабет, гиперлипидемия и т. Д.), Сердечно-сосудистой системы (застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и т. д.), гематоонкология, мочевыделительная система, психическая, опорно-двигательная система, иммунная система (ревматоидный артрит, системная красная волчанка и т. д.) или оториноларингологическая система, или у кого в анамнезе есть вышеперечисленные заболевания.

2. Человек с процентным содержанием лейкоцитов (WBC) или нейтрофилов, который превысил контрольный диапазон во время периода скрининга.
3. Человек, у которого уровень тромбоцитов ниже $100000/\text{мм}^3$ во время периода скрининга.
4. Человек с максимальной длиной селезенки более 16 см, показанный на УЗИ верхней части живота во время сканирования.
5. Человек с систолическим артериальным давлением ≥ 140 мм рт.ст., или ≤ 90 мм рт.ст., или диастолическим артериальным давлением ≥ 95 мм рт.ст.
6. Человек с клинически значимой аритмией на электрокардиограмме.
7. Человек с активной инфекцией или лихорадкой 38°C или выше за неделю до введения исследуемого вещества.
8. Человек с признаками хронического гепатита В, С или ВИЧ-инфекции.
9. Человек, в анамнезе принимавший наркотики и другие реакции гиперчувствительности.
10. Человек, у которого кровотечение превышает 400 мл или сдавал кровь в течение 8 недель до введения исследуемого продукта.
11. Человек, который выкуривал в среднем более 10 сигарет в день в течение последних 3 месяцев.
12. Субъект, употребляющий алкоголь (более 21 единицы в неделю, 1 единица = 10г чистого спирта) или которое не может прекратить употребление алкоголя за 24 часа до госпитализации и до выписки.
13. Субъект, употреблявший алкоголь и наркотики в течение 6 месяцев до обследования.
14. Субъект, употреблявший психотропные препараты или наркотические анальгетики в течение 6 месяцев до обследования.

15. Субъект с психозом или другими расстройствами центральной нервной системы, которое, по мнению исследователя, не соответствует критериям клинического исследования.
16. Субъект считающийся непригодным для общения.
17. Субъект, который не понимает контекста клинического исследования и отказывается от сотрудничества (лицо, которое не желает посещать исследователя в соответствии с графиком или откладывать ранее запланированную плановую операцию) и считается непригодным для завершения теста его исследования.
18. Человек, который в настоящее время участвует в клиническом исследовании или завершил его, но еще не прошел 8-недельный период.
19. Исследователь определил и четко указал, что лицо не имеет права участвовать в клиническом исследовании из-за состояния здоровья, состояние здоровья которого может быть нарушено введением исследуемого препарата и т.п.
20. По результатам других клинических лабораторных испытаний участие человека в клинических испытаниях исследователем считается недостаточным.
21. Человек с историей применения G-CSF.
22. Человек, который принимал отпускаемые по рецепту лекарства или препараты восточной медицины за 2 недели до введения исследовательского вещества или принимал не рецептные лекарства или витаминные добавки за неделю до введения препарата.

Исключение добровольца из клинического испытания, прекращение приема исследуемого лекарственного препарата для клинического испытания, досрочное прекращение клинического испытания или закрытие исследовательского центра может произойти по личным и/или медицинским или административным причинам, волонтерские и подобные причины, и причины заключаются в следующем.

Доброволец может в любой момент прекратить участие в клиническом исследовании, причину прекращения объяснять не нужно.

Субъекта следует исключить из клинического исследования, если:

1. Если доброволец или его законный представитель отзывает согласие.

2. Если исследователь определяет, что продолжение участия в клиническом исследовании наносит вред субъекту.
3. Если побочный эффект слишком серьезен, чтобы продолжать клинические испытания.
4. Если спонсор или исследователь определяет, что это серьезное нарушение протокола.
5. Когда субъект хочет прекратить участие по другим причинам.
6. Ниже перечислены серьезные нарушения протокола, требующие исключения субъекта из этого клинического исследования.
7. Когда исследователь или спонсор решают, что отказ от участия в клиническом исследовании необходим из-за нарушения критериев отбора / исключения, которое может серьезно повлиять на оценку эффективности или безопасности исследуемого препарата или повлиять на безопасность субъекта.
8. Если доброволец использует другие препараты или хирургическое лечение целевого заболевания в клиническом испытании, но исследователь определяет, что доброволец не желает прекращать эти методы лечения.
9. Во время клинического исследования нельзя назначать никаких других препаратов, кроме исследуемого. Однако при необходимости его можно применить по решению исследователя. Если субъект принимает лекарство без решения исследователя и считается эффективным при оценке безопасности препарата в этом клиническом исследовании, субъект исключается из клинического исследования.

Iv. Применяемое лечение

Результаты исследования токсичности многократных доз были использованы для расчета начального использования и дозировки GX-G3 в первом испытании на людях. В результате доклинического исследования на яванских макаках с повторным подкожным введением GX-G3 в течение 4 недель, NOAEL, наблюдаемый как у самцов, так и у самок обезьян, составил 3 мг/кг. Кроме того, NOAEL, наблюдаемый во время тестирования токсичности с повторным подкожным введением в течение 4 недель у крыс, составлял 1 мг/кг. В этом исследовании вводили дозы в 2,5-80 раз меньше, чем эквивалентная доза для человека (HED), при которых наблюдаемый уровень побочных эффектов (NOAEL) не переводился в степень тяжести. Эта доза в 4 раза меньше, чем

при замене сопоставимого препарата Neulasta® на максимальную дозу NOAEL для клинических испытаний на людях. Следовательно, необратимые побочные эффекты (потеря жизни, потеря веса), наблюдаемые в течение 4 недель исследования токсичности повторной дозы, с меньшей вероятностью будут наблюдаться у здорового взрослого субъекта мужского пола в течение одного периода введения.

Доза GX-G3 для каждого добровольца рассчитывается по весу. Разовые дозы на кг (веса), которые необходимо ввести, составляют 12,5 мкг, 25 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 200 мкг и 400 мкг. Например, одна доза для однократного введения субъекту массой 60 кг, отнесенному к группе с дозой 25 мкг, составляет 1,5 мг (1500 мкг; 25 мкг/кг/доза x 60 кг = 1500 мкг/доза). Поскольку концентрация GX-G3, исследуемого лекарственного средства данного клинического исследования, составляет 1 мг/мл или 10 мг/мл на флакон, а флакон содержит 1 мл лекарственного средства, флакон содержит 1 мг или 10 мг GX-G3. Следовательно, если необходимо ввести состав исследуемого лекарственного средства с концентрацией 10 мг/мл, субъекту вводят 0,15 мл исследуемого лекарственного средства.

Дозы для каждой группы доз в контрольной группе плацебо рассчитываются тем же методом, что и в GX-G3 перед введением. Обычная доза Neulasta® 6 мг вводится в группу активного контроля. Каждой дозовой группе подкожно вводят 1-3 дозы исследуемого или контрольного лекарственного средства.

v. Методология

Фаза I исследования проводится в соотношении от низкой дозы к высокой дозы в пределах 6 дозовых групп, и 8 субъектов будут распределены в первые 5 дозовых групп, при этом 6-и испытуемым будут назначены испытуемое лекарство, а 2-м испытуемым назначены плацебо. Группе конечной дозы GX-G3 назначается активное контрольное лекарство, и 14 субъектов назначают в соотношении 6 субъектов для тестируемого препарата, 2-х субъектов для плацебо и 6 субъектов для Neulasta®. Реализация фазы I клинического исследования кратко изложена в таблице 13.

ТАБЛИЦА 13

Исследование фазы I - Количество субъектов (введенная доза)						
	Гр.1	Гр.2	Гр.3	Гр.4	Гр.5	Гр.6
Плацебо	2	2	2	2	2	2
GX-G3	6 (12,5мкг/кг)	6 (25мкг/кг)	6 (50мкг/кг)	6 (100мкг/кг)	6 (200мкг/кг)	6 (400мкг/кг)
Neulasta	-	-	-	-	-	6 (6мг)

*Гр.: Группа

vi. Параметры эффективности и безопасности

Основная цель этого клинического исследования заключалась в оценке переносимости после однократного подкожного введения исследуемого лекарственного препарата GX-G3 у здоровых добровольцев мужского пола.

Максимальная переносимая доза (MTD) будет определяться возникновением и частотой ограничивающей дозу токсичности (DLT), степенью и характеристиками нежелательных явлений, жизненно важными показателями, оценкой переносимости физическим обследованием, электрокардиограммой, клиническими лабораторными исследованиями и тестирование будет выполнено с одновременным радиологическим исследованием и для оценки безопасности.

Безопасность, фармакокинетика и фармакодинамика GX-G3 будут оцениваться для вторичной оценки, а иммуногенность будет оценена для определения наличия антител. Кроме того, будет сравниваться разница в безопасности и иммуногенности фармакокинетических и фармакодинамических свойств между GX-G3 и Neulasta®.

vii. Статистические методы

Все рандомизированные добровольцы, которые получили по крайней мере одну дозу исследуемого вещества и были посещены после введения дозы, были использованы для статистического анализа. Для оценки эффективности в первую очередь рассматривалась группа анализа целевого лечения (ITT), а также были представлены результаты, полученные в группе анализа пе-протокола (PP). Группа анализа безопасности использовалась для оценки безопасности.

Включение серьезных отклонений от протокола, которые, как считалось, могут повлиять на интерпретацию результатов исследования, в статистический анализ было принято во внимание после индивидуальной классификации. Для этих отклонений протокола степень и причина отклонения должны быть точно зарегистрированы, а влияние должно быть изучено до того, как исследователь, спонсор, монитор и статистик включают его в статистический анализ при написании отчета о клиническом исследовании.

Первичная ошибка для каждого множественного теста в оценке первичного результата эффективности была скорректирована с учетом изменений HbA1c на 24-й неделе с уровнем значимости 2,5%. Для других переменных все гипотезы оценивались с уровнем значимости 5% с обеих сторон. SAS (версия 9.2) использовался для статистического анализа.

Последнее перенесенное наблюдение (LOCF) применялось к отсутствующим данным, включенным в анализ эффективности ITT. Существующие наборы данных использовались для оценки эффективности и анализа безопасности при каждом посещении.

Каждая группа предоставила статистику с описанием для демографического и медицинского анамнеза субъектов в ITT-популяции, а также была проведена оценка средней или относительной разницы. Были предоставлены средние значения, стандартное отклонение, медиана, минимум и максимум, а для оценки значимости различий между группами применялся ANOVA или тест Краскела-Уоллиса. Частота и соотношение были предоставлены для непоследовательных данных, а для оценки использовался критерий хи-квадрат или точный критерий Фишера.

Ковариативный анализ с калибровкой по основным WBC, ANC и CD34 +, применяли к изменениям этих параметров, а различия между группами оценивали путем множественных сравнений. Парный t-критерий использовался для оценки разницы между дозой до и после введения.

Были предоставлены описательные статистические данные для вторичных / третичных результатов эффективности, а среднее значение или соотношение оценивались на предмет различий для каждой группы доз. Для последовательных данных для оценки статистической значимости между группами использовался ковариативный анализ, откалиброванный с использованием исходного уровня или критерия Краскела-Уоллиса, а внутригрупповые различия между дозированием до и после введения оценивались с помощью парного t-критерия или критерия рангов со знаком Вилкоксона. Для анализа непоследовательных данных применялся критерий Ки-квадрат.

viii. Результаты клинических испытаний фазы I

Фармакокинетические результаты

Данные по параметрам безопасности, фармакокинетики (РК), фармакодинамики (PD) и иммуногенности были проанализированы с использованием методов с описанием статистики. Согласие было дополнительно подтверждено биоаналитической оценкой GX-G3 в образцах сыворотки. Нижний предел определения исследуемого препарата в данном исследовании составляет 1,25 нг/мл. Были получены следующие параметры РК: C_{max} , максимальная концентрация; AUC_{last} , площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до последней точки отбора проб; AUC_{inf} - площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до бесконечности; t_{max} - время достижения максимальной концентрации в плазме; $t_{1/2}$ - конечный период полураспада. Фармакокинетические параметры GX-G3 и Neulasta® представлены в таблице 14.

ТАБЛИЦА 14

Фармакокинетические параметры GX-G3 и Neulasta® Среднее арифметическое (CV%)							
	Доза GX-G3 (мкг/кг)						Neulasta 6 мг
	12.5	25	50	100	200	400	
C_{max} (нг/мл)	4.2 (60.6%)	13.6 (97.5%)	42.5 (87.9%)	77.5 (78.4%)	374.8 (48.5%)	1044.3 (64.6%)	155.7 (42%)
AUC_{last} (нг.ч/мл)	100.0 (64.8%)	333.1 (82.9%)	1198.8 (68.4%)	2548.8 (91.2%)	13073.4 (56.1%)	50108.5 (59.3%)	5546.7 (5%)
AUC_{inf} (нг.ч/мл)	NC	565.8 (74.5%)	2544.1 (-)	2903.2 (-)	13474.1 (53.8%)	50493.3 (58.9%)	5615.4 (52.7%)
t_{max} (Медиана) (ч)	5.0	10.0	10.0	10.0	12.0	16.2	16.2
$t_{1/2}$ (ч)	NC	78.1 (91.1%)	169.0 (-)	151.6 (152.7%)	128.8 (94.9%)	99.1 (40.7%)	23.7 (49.5%)

NC: Не рассчитано

Основываясь на результатах, дозировка Neulasta® с 6 мг показала фармакокинетические профили при AUC и C_{max} в диапазоне от 100 мкг/кг до 200 мкг/кг GX-G3. Кроме того, индивидуальная вариабельность параметров воздействия лекарственного средства (AUC и C_{max}), представленная CV, по-видимому, не отличалась между уровнями доз и от группы сравнения.

Фармакокинетические параметры показали пропорциональный порядок доз, при этом Neulasta® 6 мг/мл показал диапазон от 100 мкг/кг до 200 мкг/кг GX-G3. Период полураспада является важным параметром для оценки GX-G3 длительного действия технологии НуФС. Все дозы GX-G3 чрезвычайно продолжительны: 78,1 часа для 25 мкг/кг, 169,0 часов для 50 мкг/кг, 151,6 часа для 100 мкг/кг, 128,8 часа для 200 мкг/кг и 99,1 часа для 400 мкг/кг. и, таким образом, показал значительно более длительный период полувыведения по сравнению с Neulasta® 6 мг/мл (23,7 часа). Среднее время достижения максимальной концентрации в плазме составляло 5,0 часов, 10,0 часов, 10,0 часов, 10,0 часов, 12,0 часов и 16,2 часа для групп с дозами GX-G3 12,5, 25, 50, 100, 200 и 400 мкг/кг соответственно.

Профили концентрации в плазме в зависимости от времени после однократного подкожного введения GX-G3 и Neulasta® (Pegfilgrastim) представлены на рисунках 12 и 13 соответственно.

Фармакокинетические профили показали непропорциональное увеличение AUC и $C_{\max}$ с увеличением дозы, как показано на рисунке 14. Скорректированные на дозу значения AUC_{last} составляли $5,7 \pm 5,2$, $10,9 \pm 11,1$, $19,0 \pm 16,4$, $19,2 \pm 23,3$, $58,0 \pm 36,7$ и $89,3 \pm 74,3$ для GX-G3 12,5, 25, 50, 100, 200 и 400 мкг, группы доз/кг соответственно (ч.нг/мл) / (мкг/кг). Скорректированная по дозе $C_{\max}$ составляла $0,29 \pm 0,20$, $0,40 \pm 0,53$, $0,50 \pm 0,75$, $0,59 \pm 0,61$, $1,69 \pm 0,91$ и $1,78 \pm 1,69$ (нг/мл)/ (мкг/кг) для каждой группы доз соответственно. Эти результаты продемонстрировали нелинейную фармакокинетику GX-G3.

Результаты эффективности

Оценка AUEC (площадь под кривой действия) количества WBC (лейкоцитов) после введения GX-G3 показала, что AUEC повысилась с увеличением дозы GX-G3 нелинейным образом, как показано в таблице 15 и на рисунке 15.

ТАБЛИЦА 15

Описываемые параметры изменения WBC после однократной подкожной инъекции								
Среднее (CV%)								
	Доза GX-G3 (мкг/кг)							Neulasta 6 мг
	Плацебо	12,5	25	50	100	200	400	
Максимальное изменение (клеток/мм ³)	1082 (82.6%)	5035 (52.0%)	8687 (27.4%)	13112 (54.6%)	12970 (12.9%)	27930 (21.3%)	49367 (47.8%)	36783 (23.8%)
AUEC с поправкой на исходный уровень (день клеток/мм ³)	2352 (497.1%)	39231 (31.8%)	55365 (16.2%)	68239 (54.9%)	71908 (39.7%)	206256 (30.7%)	330622 (39.0%)	248892 (21.7%)
t _{max} (Медиана) (дни)	7.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	3.0	3.0

* CV%: коэффициент вариации

Сравнение скорректированных на исходном уровне AUEC лейкоцитов-WBC между GX-G3 и Neulasta®, скорректированных средних AUEC от исходного уровня у субъектов, получавших GX-G3 200 мкг/кг ($206,256 \pm 63,366$ дней. клеток/мм³), фиксированная доза Neulasta® 6 мг ($248\ 892$ Аналогично субъектам, получавших ± 54096 день. клеток/мм³).

Что касается максимального изменения количества WBC (рисунок 16), среднее максимальное изменение у субъектов, получавших фиксированную дозу Neulasta® 6 мг ($36,783 \pm 65,993$ клеток/мм³), было больше, чем у субъектов, получавших GX-G3 200 мкг/кг ($27,930 \pm 5,939$ клеток/мм³), но GX-G3 меньше, чем у субъектов, получавших 400 мкг/кг ($49,367 \pm 23,582$ клеток/мм³).

Время достижения максимального количества WBC ($t_{\max}$) повысилось с увеличением дозы. Средние значения $t_{\max}$ составляли 1 день для уровней дозы от 12,5 до 100 мкг/кг, 2 дня для уровня дозы 200 мкг/кг и 3 дня для уровня дозы 400 мкг/кг.

Профиль счета-времени ANC в плазме представлен на рисунке 17, а данные параметров ANC обобщены в таблице 16.

ТАБЛИЦА 16

Описываемые параметры изменения ANC после однократной подкожной инъекции - среднее значение (CV%)								
	Доза GX-G3 (мкг/кг)							Neulasta 6 мг
	Плацебо	12,5	25	50	100	200	400	
Максимальное изменение (клеток/мм ³)	1399 (42.7%)	7307 (38.8%)	9442 (25.6%)	13920 (50.9%)	13950 (11.7%)	27090 (21.6%)	45488 (47.0%)	36517 (21.4%)
AUEC с поправкой на исходный уровень (день. клеток/мм ³)	3397 (330.5%)	34867 (30.0%)	51943 (14.8%)	81878 (69.1%)	66556 (41.9%)	161856 (28.0%)	240886 (36.0%)	175818 (25.2%)
$t_{\max}$ (Медиана) (дни)	0.5	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	2.5

Оценка AUEC подсчетов ANC после введения GX-G3 показала, что AUEC увеличивалась нелинейно с увеличением дозы GX-G3 (рис. 18). Сравнение скорректированного на исходном уровне AUEC количества клеток ANC между GX-G3 и Neulasta® на исходном уровне, скорректированного среднего AUEC от исходного уровня у субъектов, получавших GX-G3 200 мкг/кг ($161,856 \pm 45,304$ день. клеток/мм³), Neulasta® 6 мг с фиксированной дозой был аналогичен таким же субъектам, получавших ($175,818 \pm 44,374$ день.клеток/мм³).

Время достижения максимального количества АНК ($t_{\max}$), по-видимому, увеличивается с увеличением дозы. Средние значения $t_{\max}$ составляли 1 день для уровней доз 12,5 и 25 мкг/кг, 2 дня для уровней доз от 50 до 200 мкг/кг и 3 дня для уровней доз 400 мкг/кг.

Индивидуальная вариабельность фармакодинамических параметров, таких как AUEC количества ANC и максимальное изменение количества ANC, коррелировала с уровнем дозы GX-G3 (CV% максимального изменения ANC: 11,7 ~ 50,9; AUEC CV% значение ANC: 14,5 ~ 47,4), по всей видимости, связаны, и вариабельность уровня дозы 200 мкг/кг (CV% максимального изменения ANC: 21,6; AUEC в ANC: 26,1), Неуласта® 6 мг до значения фиксированной дозы (CV% максимального изменения ANC при изменение ANC: 21,4; AUEC в ANC: 24,2) похожий.

В заключение, абсолютное количество нейтрофилов (ANC), количество WBC и количество клеток CD34 + были измерены у субъектов после введения GX-G3 12,5, 25, 50, 100, 200 и 400 мкг/кг, Neulasta® 6 мг или дозы плацебо.

WBC и ANC были увеличены во всех диапазонах доз GX-G3 по сравнению с плацебо. Максимальные изменения в ANC и AUEC были больше у субъектов, получавших более высокие дозы. Особенно, диапазон доз GX-G3 от 200 до 400 мкг/кг показал потенциальное превосходство над активным контролем по его фармакодинамическому ответу.

Результаты безопасности

В этом исследовании не сообщалось о серьезных нежелательных явлениях и других значительных нежелательных явлениях. Всего в популяции, отвечающей за безопасность, было 54 субъекта, и было 133 регистрируемых нежелательных явления (AE), в том числе 115 класса 1 (86,47%) и 18 класса 2 (13,53%). Эти события были

равномерно распределены для каждой группы лечения, включая группу плацебо и Neulasta® в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

Зарегистрированные нежелательные лекарственные реакции составили 16 для плацебо (12,03%, только лёгкие), 23 для Neulasta® (17,29%, 19 лёгкие и 4 умеренные), 4 (3,01%, 4 лёгкие) для группы 12,5 мкг/кг, 25 мкг/кг группа 11 (8,27%, 11 лёгких) для группы 50 мкг/кг, 11 (8,27,8 лёгких и 3 умеренных), 19 (14,29%, 18 лёгких и 1 умеренных) для группы 100 мкг/кг, 29 (21,80%, 24 лёгких и 5 умеренных) для группы 200 мкг/кг и 20 (15,04%, 15 лёгких и 5 умеренных) для группы 400 мкг/кг. Никакой сильной корреляции между дозой и АЕ не наблюдалось.

Результаты иммуногенности

Никаких иммуногенных проблем не возникало.

Общие результаты исследования фазы I

Это первое исследование GX-G3 на людях, проведенное с целью изучения безопасности и переносимости однократной дозы GX-G3 у здоровых мужчин. Кроме того, это было проведено для характеристики профиля PK и PD однократной дозы GX-G3 у здоровых субъектов мужского пола. Общие результаты этого исследования следующие:

- Разовые подкожные дозы GX-G3 в диапазоне доз 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 мкг/кг безопасны и хорошо переносятся группой из 54 здоровых мужчин.
- Среди 133 записываемых АЕ было 115 (86,47%) НЯ класса 1 (легкие) и 18 (13,53%) АЕ класса 2 (умеренные), при этом значимых и подлежащих регистрации АЕ для всех групп лечения до и после введения не наблюдалось.
- Значительной разницы в АЕ между группой, получавшей высокие дозы GX-G3, и группой Neulasta® не наблюдалось .
- Нет никаких указаний на то, что у кого-либо из субъектов развились антитела к GX-G3 после однократной дозы лечения.
- C_{max} и AUC GX-G3 нелинейно увеличивались с дозой в диапазоне доз от 12,5 до 400 мкг/кг.

- В целом, GX-G3 показал период полувыведения от 78,1 часов до 151,6 часов и был в 3,3-7,13 раз дольше, чем Neulasta® с периодом полураспада в 23,7 часа.
- После однократной подкожной инъекции GX-G3 количество лейкоцитов и ANC увеличивалось дозо-зависимым образом во всех диапазонах доз GX-G3 по сравнению с группой плацебо.
- Максимальные изменения в ANC и AUEC были больше у субъектов, получавших более высокие дозы GX-G3.
- Фармакодинамические реакции при дозе 200 мкг/кг GX-G3 были сравнимы с Neulasta®, а 400 мкг/кг GX-G3 продемонстрировали потенциальное превосходство над Neulasta®.
- Существует четкая взаимосвязь между концентрациями GX-G3 и повышением ANC.
- Подходящая доза GX-G3 может составлять от 200 мкг/кг до 400 мкг/кг без учета значительной токсичности.
- Благодаря длительному действию свойства продукта и сопоставимой эффективности GX-G3 по сравнению с Neulasta®, он может обеспечить лучшее соблюдение пациентом режима лечения у людей, страдающих нейтропенией, вызванной химиотерапией.

ПРИМЕР 19

Клиническое исследование: Фаза II

Исследование фазы II было проведено для сравнения эффективности, безопасности и переносимости трех различных доз GX-G3 с Neulasta® (пегфилграстим) для выбора идеального диапазона доз и оптимального момента времени дозирования для фазы III.

i. Цель :

Основная цель фазы II заключалась в оценке эффективности, безопасности и переносимости трех доз GX-G3 с целью выбора оптимального диапазона доз путем сравнения каждой дозы с препаратом сравнения (Neulasta®). Другой целью включения группы отсроченного введения (250 мкг/кг GX-G3 на 3-й день после введения дозы химиотерапии) является оценка оптимального момента времени для дозирования исследуемого продукта.

Вторичной целью является исследование фармакокинетики GX-G3 и безопасности иммуногенности GX-G3.

ii. Дизайн и план исследования

Это рандомизированное, параллельное групповое, многоцентровое исследование фазы II GX-G3 по сравнению с пациентами с неходжкинской лимфомой, получающих терапию R-CHOP. Показания для введения G-CSF, как определено в сводке информации о продукте (SmPC) компаратора в настоящем исследовании (Neulasta®), следующие: «Уменьшение продолжительности нейтропении и частоты фебрильной нейтропении у взрослых пациентов, получавших цитотоксическую химиотерапию по поводу злокачественных новообразований (за исключением хронического миелоидного лейкоза и миелодиспластических синдромов)». (Обзор характеристик продукта Neulasta®; <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/11783>. Дата доступа: 13-Июля-2015).

Многочисленные схемы цитотоксической химиотерапии используются для различных типов рака. Чтобы уменьшить неоднородность, вызванную как различными типами рака, так и различными типами цитотоксической химиотерапии, было решено включить в текущее исследование только пациентов с неходжкинской лимфомой, получавших химиотерапию R-CHOP. Уменьшая неоднородность, можно лучше различать разные дозы исследуемого продукта. Стандартный цикл R-CHOP содержит:

- Ритуксимаб 375 мг/м² в/в. в 1-й день
- Циклофамид 750 мг/м² в/в. в 1-й день
- Доксорубин 50 мг/м² в/в. в 1-й день
- Винкристин 1.4 мг/м² (не более 2 мг) в/в. в 1-й день
- Преднизон 100 мг перорально q.d. в 1-5-й дни

Исследование проводилось как открытое многоцентровое рандомизированное исследование в пяти параллельных группах пациентов. Каждому пациенту без упорядоченно было назначено одно из 5 возможных вариантов лечения:

- Тест (через 24 часа после 150 мкг/кг BW / R-CHOP)
- Тест (через 24 часа после 250 мкг/кг BW / R-CHOP)
- Тест (через 24 часа после 350 мкг/кг BW / R-CHOP)

- Тест (72 часа после 250 мкг/кг BW / R-CHOP)
- Ссылка (Neulasta® 6 мг/0,6 мл/24 часа после R-CHOP).

Пациенты проходили скрининговую/исходную фазу максимум за 4 недели до первого дня, и первого дня первого цикла лечения, и получали лечение только после проверки и подтверждения критериев включения и исключения.

Определялись параметры эффективности: абсолютное количество нейтрофилов (ANC), количество лейкоцитов (WBC) и дифференциальный анализ крови. Определялись параметры безопасности нежелательных явлений, возникающих при лечении, клинического обследования, результатов лабораторных исследований безопасности и антител к GX-G3.

Продолжительность лечения в этом исследовании состояла из двух последовательных циклов лечения R-CHOP. Больше данных для каждого пациента было получено путем оценки эффекта тестируемого вещества в течение двух циклов химиотерапии, а не одного цикла.

В конце фазы лечения пациенты прошли заключительное обследование. Максимальная продолжительность исследования составляет примерно 11 недель для отдельного пациента.

iii. Исследуемая популяция

65 пациентов, которые соответствовали критериям включения и не предъявляли никаких критериев исключения, были рандомизированы для достижения цели настоящего исследования.

Для фазы II субъекты были проверены по следующим характеристикам или параметрам:

Критерии включения:

1. Пациенты мужского или женского пола ≥ 18 лет.
2. Пациенты с неходжкинской лимфомой, подтвержденной с помощью иммуногистохимии или проточной цитометрии: фолликулярная лимфома III-IV

стадии (стадия Анн-Арбора) или CD20-положительная диффузная В крупноклеточная неходжкинская лимфома.

3. Пациенты, соответствующие критериям для получения терапии R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон) не менее 2 циклов по 21 день каждый.
4. Пациенты, которые собираются получить свои первые два цикла лечения R-CHOP в серии из нескольких циклов (предыдущее воздействие R-CHOP разрешено, но в другой серии циклов более чем за 3 месяца до рандомизации в текущем исследовании).
5. Состояние производительности ECOG 0, 1 или 2.
6. Продолжительность жизни не менее 6 месяцев с лечением.
7. Желание и возможность участвовать во всех аспектах исследования (например, психическое и физическое состояние), участие в запланированных посещениях и соблюдение требований протокола, что подтверждается предоставлением подписанного письменного информированного согласия.

Критерии исключения/отказа:

Субъекты, соответствующие любому из следующих критериев, были исключены из исследования:

1. Наличие в анамнезе гиперчувствительности или непереносимости активного вещества или любого из вспомогательных веществ исследуемого препарата (например, сорбита, фруктозы или латекса) или любого из компонентов терапии R-CHOP.
2. Известная гиперчувствительность к продуктам, полученным из E.coli (например, Филграстим, Инсулин Humulin®, L-аспарагиназа, Гормон роста Humatrope®, Интрон А®)
3. Беркитта или В-лимфобластная лимфома.
4. Неходжкинская лимфома с поражением ЦНС.
5. Активная инфекция, требующая начального лечения системными (внутривенными или пероральными) противоинфекционными средствами (антибиотиками, противогрибковыми, противовирусными).
6. Воздействие терапии R-CHOP или пегфилграстима в течение последних 3 месяцев до рандомизации.

7. Известное отсутствие нейтропении у пациентов, ранее получавших терапию R-CHOP.
8. Положительные серологические результаты на антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ), поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) и / или антитела к вирусу гепатита С (HCV).
9. Любое предраковое миелоидное заболевание или любое злокачественное новообразование с миелоидными особенностями (например, миелодиспластические синдромы, острый или хронический миелоидный лейкоз).
10. Злокачественные новообразования, перенесенные в течение последних 5 лет, за исключением базальноклеточного рака, плоскоклеточного рака кожи или рака шейки матки *in situ*, который лечили хирургическим путем.
11. Предварительная трансплантация костного мозга или стволовых клеток.
12. Тяжелая печеночная недостаточность: Билирубин сыворотки выше 51,3 мкмоль/л (3 мг/дл) или сывороточный альбумин ниже 28 г/л (2,8 г/дл).
13. Исходное количество нейтрофилов $<1,5 \times 10^9/\text{л}$ или количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$.
14. Демиелинизирующая форма синдрома Шарко-Мари-Тута.
15. Любое из следующих событий за последний месяц перед рандомизацией: пневмония, отек легких, интерстициальное заболевание легких, инфильтраты легких.
16. Серповидно-клеточная анемия или серповидно-клеточная анемия.
17. Крупное хирургическое вмешательство в течение 2 недель до рандомизации.
18. В настоящее время пациент участвует в другом клиническом исследовании изучаемого препарата или завершил текущее исследование менее чем за 30 дней до скринингового обзора.
19. Предыдущая запись этого исследования.
20. Женщины детородного возраста не могут или не хотят проходить тест на беременность и использовать адекватные средства контрацепции. Безопасными методами для женщин являются гормональные контрацептивы, хирургическое вмешательство (например, перевязка маточных труб), внутриматочная спираль (R₁A) и половое воздержание.
21. Юридическая некомпетентность и/или другие обстоятельства, из-за которых пациент не может понять характер, объем и возможные последствия исследования.

22. Алкогольная/наркотическая зависимость или злоупотребление (за исключением употребления табака).
23. Недоверие или отсутствие сотрудничества.
24. Обструкция оттока мочи.
25. Нарушение функции сердца: сердечная недостаточность, недавно перенесенный (последние 6 месяцев) инфаркт миокарда, тяжелые аритмии.
26. По мнению исследователя, любое другое состояние, которое может поставить под угрозу оценку лечения пациента или поставить под угрозу безопасность пациента (например, тяжелое или нестабильное медицинское или психологическое состояние, острый психоз, тяжелая и долгосрочная лихорадочная нейтропения), соответствие или соблюдение требований протокола
27. Беременные или кормящие женщины.
28. Любое изменение дозы лечения R-CHOP после первого цикла исследования.

Если какой-либо из критериев исключения 22–28 зарегистрирован после рандомизации, это будет считаться критерием исключения.

iv. Применяемое лечение

Это исследование представляет собой исследование диапазона доз. Выбранные дозы основаны на результатах доклинических исследований и клинических исследований на здоровых добровольцах. Как показывают данные фазы I, однократная подкожная доза GX-G3 в диапазоне доз 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 мкг/кг безопасна и хорошо переносится; Клиническое исследование фазы II проведено при дозах 150 мкг/кг, 250 мкг/кг и 350 мкг/кг для определения оптимального диапазона доз GX-G3. Один введенный флакон (1 мл) лекарственного препарата содержит 20 мг действующего вещества.

Тестируемое вещество представляет собой раствор для инъекций GX-G3 20 мг/мл (подкожная инъекция) с лечением, описанным ниже:

Лечение А, В, С:

Тестируемый продукт GX-G3 20 мг/мл Раствор для инъекций (подкожная инъекция) вводят с помощью процедур, описанных ниже:

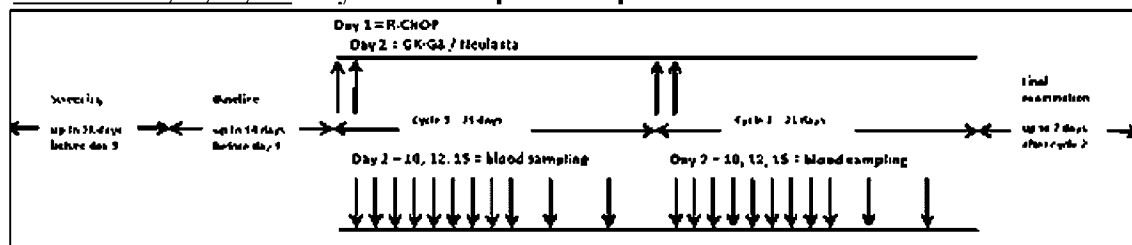
1 подкожная инъекция (всего две однократные дозы) в виде подкожной инъекции 20 мг/мл через ≥ 24 часа после введения R-CHOP в течение первых 2 последовательных циклов R-CHOP продолжительностью 21 день каждый.

Лечение D:

Эталонный продукт Neulasta® (Пегфилграстим) 6 мг/0,6 мл предварительно заполненный шприц (подкожная инъекция) вводят при лечении, описанный ниже:

1 подкожная инъекция в виде 6 мг/0,6 мл подкожная инъекция ≥ 24 часа после введения R-CHOP в течение первых 2 последовательных циклов R-CHOP продолжительностью 21 день каждый (всего две однократные дозы).

Лечение A, B, C, D: Изучите лекарство через 24 часа после R-CHOP

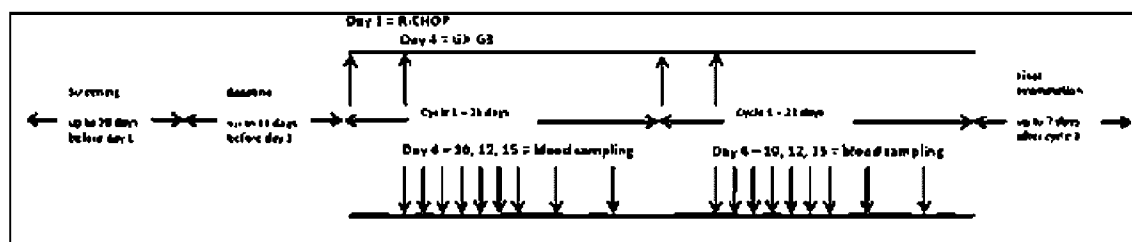


Лечение E:

Тестируемый продукт GX-G3 20 мг/мл Раствор для инъекций (подкожная инъекция) вводят при лечении, описанный ниже:

1 подкожная инъекция (всего две однократные дозы) в виде подкожной инъекции 20 мг/мл ≥ 72 часа после введения R-CHOP в течение первых 2 последовательных циклов R-CHOP продолжительностью 21 день каждый

Лечение E: Изучите лекарство через 72 часа после R-CHOP



v. Методология

Показанием для исследования является профилактика нейтропении или уменьшение продолжительности нейтропении и частоты фебрильной нейтропении у взрослых пациентов с неходжкинской лимфомой, получавших R-CHOP.

В текущем исследовании все пациенты получали два цикла лечения R-CHOP продолжительностью 21 день каждый.

vi. Параметры эффективности и безопасности

Абсолютное количество нейтрофилов (ANC), количество лейкоцитов (WBC) и параметры дифференциального анализа крови были определены и зарегистрированы в форме отчета о болезни для оценки эффективности тестируемого и эталонного вещества.

Параметры для оценки связанных с лечением нежелательных явлений, оценки результатов клинического обследования, оценки лабораторных результатов безопасности и оценки антител к GX-G3 были определены для безопасности тестируемых и референтных веществ.

Первичной конечной точкой в текущем исследовании было время выздоровления от тяжелой нейтропении (определяемой как $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$) до целевой $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ после каждого введения химиотерапии R-CHOP в циклах 1 и 2.

Вторичными конечными точками в текущем исследовании были общая продолжительность тяжелой нейтропении в индукционных циклах химиотерапии 1 и 2, каждое введение химиотерапии R-CHOP в циклах 1 и 2, частота фебрильной нейтропении, частота очень тяжелой нейтропении (определяется как $< 0,1 \times 10^9/\text{л}$), и это время восстановления до целевого уровня $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$ и $\geq 2 \times 10^9/\text{л}$ после тяжелой нейтропении (определяемой как $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$) после заражения.

vii. Статистические методы

Статистический анализ проводился в трех разных популяциях пациентов: набор для безопасного анализа, полный набор для анализа (FAS) и набор для протокола (PPS).

В набор безопасности входят все рандомизированные пациенты, получившие хотя бы одну дозу исследуемого препарата. Полный набор для анализа состоит из всех рандомизированных пациентов, которые получили, по крайней мере одну дозу исследуемого препарата и прошли по крайней мере одну пост-исходную оценку первичной конечной точки. Набор для каждого протокола состоит из всех пациентов из полного набора для анализа, которые завершили весь период лечения без серьезных нарушений протокола, которые могли бы повлиять на оценку эффективности.

Статистический анализ первичной конечной точки выполняется с использованием программного обеспечения SAS® (версия 9.4 или выше). Популяции для этого анализа - это полный набор анализов и набор для каждого протокола. Если не указано иное, все статистические тесты и сравнения оцениваются на уровне значимости 5% ($\alpha = 5\%$).

Первичная конечная точка (время до восстановления от тяжелой нейтропении (определяемой как $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$) до целевого значения $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ после каждого введения химиотерапии R-CHOP в циклах 1 и 2) между каждым из исследуемых продуктов и сравнивались дозы эталонных препаратов.

Появляются следующие сравнения первичной конечной точки:

- GX-G3 150 мкг/кг BW - Ссылка
- GX-G3 250 мкг/кг BW - Ссылка
- Эталонное сравнение с отложенным введением GX-G3 250 мкг/кг BW
- GX-G3 350 мкг/кг BW - Ссылка

Сравнительная статистическая оценка первичной мишени, то есть времени до выздоровления от тяжелой нейтропении (t_{rec}), выполняется с помощью ковариантного анализа (ANCOVA) с использованием лечения, цикла и центра в качестве факторов и базового уровня ANC в качестве коварианта. Описанные выше сравнения были выполнены как в PPS, так и в FAS.

Вторичные конечные точки подвергаются описательной статистической оценке. Популяции для этого анализа устанавливаются в соответствии с полным анализом и протоколом. Фармакокинетический анализ проводится для всех пациентов, для которых доступны и поддаются оценке данные о времени концентрации. Статистический анализ населения выполняется в соответствии с

протоколом. Эта популяция определяется как все пациенты, подлежащие оценке с помощью FAS, которые завершили весь курс лечения без серьезных нарушений протокола, которые могли бы повлиять на оценку эффективности. Сравнительный анализ не проводится, поскольку в соответствующих тестируемых и контрольных веществах (GX-G3 и пегфилграстим) присутствуют разные аналиты.

Набор безопасности использовался для анализа данных безопасности. Все данные по безопасности, полученные в этом исследовании, были сведены в таблицу с описательной групповой статистикой (среднее значение, стандартное отклонение, минимум, максимум, количество достоверных случаев), когда это было необходимо. Перечислены все нежелательные явления.

viii. Клиническое исследование - результаты фазы II

Общие особенности

Лечение было начато в общем количестве 65 пациентам (35 женщин и 30 мужчин) (группа безопасности; полный набор анализов): 53 пациента (29 женщин, 24 мужчины) были назначены для исследуемого препарата (GX-G3 20 мг/мл), 12 пациентов (6 женщин, 6 мужчин) были назначены для лечения препаратом сравнения (Neulasta®). Число пациентов, допущенных к набору протоколов, составило 51 (41 пациент лечился с помощью теста, 10 пациентов лечился по рекомендации).

Результаты эффективности

Первичные конечные точки

Основная цель настоящего исследования заключалась в оценке эффективности, безопасности и переносимости трех доз GX-G3 с целью выбора оптимального диапазона доз путем сравнения каждой дозы с препаратом сравнения (Neulasta®). Кроме того, оценка оптимального момента времени для дозирования тестируемого вещества с отсроченным введением 250 мкг/кг массы тела (BW) GX-G3 через 72 часа после введения R-CHOP.

Первичной конечной точкой было время восстановления от тяжелой нейтропении (определяемой как ANC $<0,5 \times 10^9/\text{л}$) до целевой $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ после каждого введения химиотерапии R-CHOP в циклах 1 и 2. Профили нейтропении, являющиеся основной

конечной точкой исследования, представлены на рисунках 19-23 для PPS и FAS для каждого цикла лечения и для обоих циклов вместе. Среднее время восстановления после тяжелой нейтропении представлено в Таблице 17 и Таблице 18 для PPS и FAS, соответственно.

ТАБЛИЦА 18

Среднее и стандартное отклонение времени восстановления (в днях) от тяжелой нейтропении для PPS (включая пациентов без нейтропении)

Группа лечения	Средний*	SD	р-Значение**
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=24)	1.292	1.853	0.2066
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=22)	0.182	0.664	0.8011
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=16)	0.500	0.966	0.3210
D (Neulasta®, 6 мг) (n=20)	0.250	0.550	-
E (GX-G3, +3days 250 мкг/кг) (n=20)	0.650	1.089	0.9826

* Время до выздоровления от тяжелой нейтропении считалось нулевым, если ANC не снижалась до $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$. **р-значения относятся к сравнению с Neulasta®.

ТАБЛИЦА 18

Среднее и стандартное отклонение времени восстановления (в днях) от тяжелой нейтропении для ФАС (включая пациентов без нейтропении)

Группа лечения	Средний*	SD	p-Значение**
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=27)	1.704	2.233	0.4504
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=24)	0.417	1.018	0.5202
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=23)	1.174	2.167	0.4800
D (Neulasta®, 6 мг) (n=24)	1.042	2.236	-
E (GX-G3, +3 дня 250 мкг/кг) (n=26)	1.115	1.774	0.6033

* Время до выздоровления от тяжелой нейтропении считалось нулевым, если ANC не снижалась до $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$. **p-значения относятся к сравнению с Neulasta®.

Как видно из Таблицы 17 и Таблицы 18, время до выздоровления от тяжелой нейтропении было наибольшим в группе, получавшей 150 мкг/кг GX-G3. Значения в остальных 4 группах были сопоставимы с тенденцией к более коротким значениям в группе, получавшей 250 мкг/кг GX-G3.

Вторичные конечные точки

Вторичные конечные точки, общая продолжительность тяжелой нейтропении в индукционных циклах химиотерапии 1 и 2; Время до целевого выздоровления от тяжелой нейтропении (определяемой как $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$) $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$ и $\geq 2 \times 10^9/\text{л}$ после каждого введения химиотерапии R-CHOP в циклах 1 и 2; частота фебрильной нейтропении; очень тяжелая частота нейтропении (определяется как $< 0,1 \times 10^9/\text{л}$); и частота заражения. Другими параметрами эффективности в этом испытании были абсолютное количество нейтрофилов (ANC); количество лейкоцитов (WBC) и дифференциальный анализ крови.

Общую продолжительность тяжелой нейтропении рассчитывали как сумму всех индивидуальных длительностей тяжелой нейтропении, зарегистрированной для каждой группы лечения. Результаты представлены в Таблице 19 и Таблице 20 для PPS и FAS соответственно. В обеих анализируемых популяциях наибольшая общая

продолжительность тяжелой нейтропении была зарегистрирована в группе пациентов, получавших GX-G3 150 мкг/кг, а самая короткая общая продолжительность тяжелой нейтропении была зарегистрирована в группе пациентов, получавших GX-G3 250 мкг/кг.

ТАБЛИЦА 19

Общая продолжительность тяжелой нейтропении (дни) - Сумма индивидуальных времен восстановления после тяжелой нейтропении для каждой группы лечения, PPS			
Группа лечения	Сус1	Сус2	Сус1+Сус2
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=12)	17	14	31
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=11)	4	0	4
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=8)	6	2	8
D (Neulasta®, 6 мг) (n=10)	4	1	5
E (GX-G3, +3 дня 250 мкг/кг) (n=10)	8	5	13

ТАБЛИЦА 20

Общая продолжительность тяжелой нейтропении (дни) - Сумма индивидуальных времен восстановления от тяжелой нейтропении для каждой группы лечения, FAS			
Группа лечения	Сус1	Сус2	Сус1+Сус2
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=14)	26	20	46
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=12)	7	3	10
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=13)	21	6	27
D (Neulasta®, 6 мг) (n=14)	17	8	25
E (GX-G3, +3 дня 250 мкг/кг) (n=12)	21	8	29

Таблица 21 и Таблица 22 показывают время восстановления от тяжелой нейтропении до целевого $AN \geq 1 \times 10^9/\text{л}$ и целевого $AN \geq 2 \times 10^9/\text{л}$ в обоих наборах данных для набора протоколов и полного набора анализов.

ТАБЛИЦА 21

Цели 1 и 2 Г/Л для тяжелой нейтропении, среднее и стандартное отклонение времени восстановления (в днях) для PPS (включая пациентов без нейтропении)

Группа лечения	Цель 1 Г/Л		Цель 2 Г/Л	
	Среднее*	SD	Среднее*	SD
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=24)	1.625	2.300	1.625	2.300
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=22)	0.182	0.664	0.182	0.664
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=16)	0.625	1.147	0.625	1.147
D (Neulasta®, 6 мг) (n=20)	0.350	0.745	0.500	1.100
E (GX-G3, +3 дня 250 мкг/кг) (n=20)	0.900	1.683	1.150	2.084

* Время до выздоровления от тяжелой нейтропении считалось нулевым, если ANC не снижалась до $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$.

ТАБЛИЦА 22

Цели 1 и 2 Г/Л для тяжелой нейтропении, среднее и стандартное отклонение времени восстановления (в днях) для FAS (включая пациентов без нейтропении)

Группа лечения	Цель 1 Г/Л		Цель 2 Г/Л	
	Среднее*	SD	Среднее*	SD
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=27)	2.074	2.556	2.074	2.556
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=24)	0.542	1.444	0.667	1.761
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=23)	1.304	2.204	1.435	2.446
D (Neulasta®, 6 мг) (n=24)	1.250	2.592	1.375	2.651
E (GX-G3, +3 дня 250 мкг/кг) (n=26)	1.462	2.177	1.846	2.618

*Время до выздоровления от тяжелой нейтропении считалось нулевым, если ANC не снижалась до $ANC < 0,5 \times 10^9/\text{л}$.

Как видно из Таблицы 21 и Таблицы 22, время до выздоровления от тяжелой нейтропении было наибольшим в группе, получавшей 150 мкг/кг GX-G3. Значения в оставшихся 4 группах сопоставимы с самыми короткими значениями в группе, получавшей 250 мкг/кг GX-G3.

Информация о частоте тяжелой нейтропении, очень тяжелой нейтропении и фебрильной нейтропении при PPS и FAS представлена в Таблице 23 и Таблице 24, соответственно. Тяжелая нейтропения была зарегистрирована в 25 случаях при PPS. Процент случаев, в которых развилась тяжелая нейтропения, был самым высоким в группе пациентов, получавших GX-G3 150 мкг/кг, и самым низким в группе пациентов, получавших GX-G3 250 мкг/кг. Всего очень тяжелая нейтропения была зарегистрирована в PPS у 6 пациентов и очень тяжелая нейтропения в FAS в общей сложности у 18 пациентов. Наибольшее количество пациентов с очень тяжелой нейтропенией было зарегистрировано в группе пациентов, получавших GX-G3 150 мкг/кг (n = 6) и GX-G3 250 мкг/кг с отсрочкой (n = 5). При PPS фебрильной нейтропении не отмечалось. У одного пациента была фебрильная нейтропения по FAS. Этого пациента лечили с GX-G3 350 мкг/кг.

ТАБЛИЦА 23

**Процент случаев тяжелой нейтропении в цикле 1 и цикле 2
согласно лечебной группе, PPS**

Группа лечения	Тяжелая нейтропения	Очень тяжелая нейтропения*	Фебрильная нейтропения
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=24)	37.5	12.5	N.O.
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=22)	9.1	N.O.	N.O.
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=16)	25.0	6.3	N.O.
D (Neulasta®, 6 мг) (n=20)	20.0	N.O.	N.O.
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг) (n=20)	30.0	10.0	N.O.

N.O.: Не наблюдается. *Очень тяжелая нейтропения (определяется как $<0,1 \times 10^9/\text{л}$)

ТАБЛИЦА 24

Процент случаев тяжелой нейтропении в цикле 1 и цикле 2 согласно лечебной группе, FAS			
Группа лечения	Тяжелая нейтропения	Очень тяжелая нейтропения*	Фебрильная нейтропения
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=27)	44.4	22.2	N.O.
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=24)	16.7	4.2	N.O.
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=23)	34.8	17.4	4.3
D (Neulasta®, 6 мг) (n=24)	29.2	8.3	N.O.
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг) (n=26)	42.3	19.2	N.O.

N.O.: Не наблюдается. *Очень тяжелая нейтропения (определяется как $<0,1 \times 10^9/\text{л}$)

Заболеваемость инфекциями представлена в Таблице 25 и представлена как заболеваемость по классам системных органов (SOC), производным от MedDRA, и по предпочтительному термину (PT). Никаких инфекций не было отмечено в группах пациентов, получавших GX-G3 250 мкг/кг и GX-G3 350 мкг/кг. Наибольшее количество инфицированных пациентов, GX-G3 250 мкг/кг, было зарегистрировано в группе пациентов, получавших отсроченное лечение (Группа E). При изучении частоты инфицирования с другими конечными точками этот показатель составлял 25% у пациентов, принимавших эталонный препарат Neulasta®, в то время как у пациентов, принимавших GX-G3 в дозах 250 мкг/кг (Группа B) и 350 мкг/кг, инфекции не наблюдалось (Группа C).

ТАБЛИЦА 25

Частота нежелательных явлений по PT и группе лечения в SOC «Инфекции и инвазии», набор безопасности	
Заболеваемость инфекцией	% испытуемых
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=14)	7.1%
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=12)	N.O.
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=13)	N.O.
D (Neulasta®, 6 мг) (n=12)	25%
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг) (n=14)	35.7%

N.O.: Не наблюдался

Были измерены концентрации GX-G3 и пегфилграстима, и кривые зависимости средних концентраций от времени показанные на рисунке 24.

Краткое изложение вычисленных фармакокинетических параметров показано в таблице 26. Фармакокинетический анализ, проведенный в исследовании фазы II, показал, что параметры AUC и $C_{\max}$ GX-G3 увеличиваются нелинейным образом, не пропорциональным увеличению дозы. При увеличении дозы в 1,4 раза (со 150 до 350 мкг/кг) AUC_{last} увеличивалась в 7,2 раза, а $C_{\max}$ увеличивалась примерно в 4,9 раза.

ТАБЛИЦА 26

Фармакокинетические параметры, определенные в исследовании фазы II.				
Группа лечения	AUC_{last} (нг*ч/мл)	C_{max} (нг/мл)	t_{max} (ч)	t_{1/2} (ч)
A (GX-G3, 150 мкг/кг)	5507.0±7119.7	108.7±120.85	47.91±47.76	72.85±68.89
B (GX-G3, 250 мкг/кг)	14190±21095	236.52±224.23	40.62±33.27	54.22±43.01
C (GX-G3, 350 мкг/кг)	34130±33991	494.73±400.86	55.80±48.34	57.98±78.50
D (Neulasta®, 6 мг)	3254.2±2179.3	75.22±66.20	35.75±24.79	63.15±65.78
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг)	36026±36890	408.09±368.37	54.87±40.05	37.19±35.09

Оценка результатов эффективности

Введение всех доз GX-G3 и Neulasta® привело к значительному увеличению значений ANC и эффективно предотвратило нейтропенический эффект лечения R-CHOP. Отложенное выполнение GX-G3 было связано с соответствующим отложенным ответом ANC.

Общие результаты исследования можно резюмировать следующим образом:

- Дозы 250 мкг/кг и 350 мкг/кг были сопоставимы с Neulasta® с точки зрения эффективности и безопасности.

- Самая низкая доза 150 мкг/кг и отсроченное введение 250 мкг/кг в течение 3 дней менее эффективны по сравнению с Neulasta®, но не отличаются от Neulasta® по своей безопасности.
- Фармакокинетические параметры AUC и $C_{\max}$ GX-G3 увеличивались нелинейным, пропорциональным образом в диапазоне доз от 150 мкг/кг до 350 мкг/кг.

Результаты для вторичных конечных точек подтвердили результаты для первичных конечных точек. Никаких существенных различий между FAS и PPS не наблюдалось.

Результаты безопасности

Следующие конечные точки безопасности были определены и проанализированы для этого клинического исследования фазы II для популяции безопасности (n = 65):

- Оценка нежелательных явлений, возникающих при лечении
- Оценка результатов клинического обследования
- Оценка результатов лабораторных исследований безопасности
- Оценка антител к GX-G3

Нежелательные явления можно разделить на две группы; первая группа - это нежелательные явления, не связанные с лечением (все нежелательные явления произошли до введения исследуемого лекарственного средства), а вторая группа - нежелательные явления, возникшие в результате лечения.

Всего было зарегистрировано 252 нежелательных явления, возникших в результате лечения, у 48 пациентов (по 10 пациентов в каждой из групп A-C и по 9 пациентов в каждой из групп D и E). Общее количество серьезных нежелательных явлений (SAE) составило 9 из 5 пациентов (по одному пациенту на группу лечения). Сводная информация, показывающая распределение по группам лечения, представлена в Таблице 27 и Таблице 28.

ТАБЛИЦА 27

Частота нежелательных явлений (AE)		
Группа лечения	Частота AE	% испытуемых
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=14)	64	71.4
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=12)	34	83.3
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=13)	39	76.9
D (Neulasta®, 6 мг) (n=12)	52	75.0
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг) (n=14)	63	64.3

ТАБЛИЦА 28

Частота серьезных нежелательных явлений (SAE)		
Группа лечения	Частота AE	% испытуемых
A (GX-G3, 150 мкг/кг) (n=14)	2	7.1
B (GX-G3, 250 мкг/кг) (n=12)	1	8.3
C (GX-G3, 350 мкг/кг) (n=13)	2	7.7
D (Neulasta®, 6 мг) (n=12)	3	8.3
E (GX-G3, +3дня 250 мкг/кг) (n=14)	1	7.1

Согласно результатам, четыре разных дозы GX-G3 и Neulasta® в целом хорошо переносились. При изучении нежелательных явлений, серьезных нежелательных явлений и лабораторных результатов, никаких опасений по поводу безопасности исследуемого препарата не наблюдалось.

Для оценки иммуногенности GX-G3 образцы, для определения антител против GX-G3 были взяты в разные моменты времени (перед введением GX-G3 в каждом цикле лечения и при заключительном обследовании). Всего у 5 пациентов удалось

обнаружить антитела против GX-G3. Все эти пациенты были положительными на антитела против GX-G3 на исходном уровне. Три пациента были отрицательными при последнем посещении, один пациент был положительным до последнего посещения, и никакой дополнительной информации об одном пациенте нет. Случаев появления новых антител против GX-G3 в период лечения зарегистрировано не было.

Оценка результатов безопасности

Четыре различных режима дозирования и/или режима дозирования GX-G3 и эталонного вещества обычно хорошо переносились без значительных различий в безопасности и переносимости между GX-G3 и эталонным веществом.

Анализ других связанных с безопасностью параметров, таких как АЕ, SAE, показатели жизнедеятельности и результаты лабораторных исследований не выявили особых проблем с безопасностью тестируемого вещества. Случаев появления новых антител против GX-G3 не наблюдалось.

Общие результаты исследования фазы II

Основная цель настоящего исследования заключалась в оценке эффективности, безопасности и переносимости трех доз GX-G3 с целью выбора оптимального диапазона доз путем сравнения каждой дозы с препаратом сравнения (Neulasta®). Целью включения группы с отсроченным введением (250 мкг/кг GX-G3 на 3-й день после введения дозы химиотерапии) является оценка оптимального момента времени для дозирования исследуемого препарата.

Введение всех доз GX-G3 и Neulasta® привело к значительному увеличению значений ANC и эффективно предотвратило нейтропенический эффект лечения R-CHOP. Отложенное выполнение GX-G3 было связано с соответствующим отложенным ответом ANC.

Общие результаты исследования можно резюмировать следующим образом:

- Дозы 250 мкг/кг и 350 мкг/кг сопоставимы с Neulasta® с точки зрения эффективности и безопасности.
- Частота инфицирования в группе D (Neulasta®) составляла 25%, а в группах В и С (при дозах 250 и 350 мкг/кг) инфекции не наблюдалось.

- Фармакокинетические параметры AUC и $C_{\max}$ GX-G3 увеличивались нелинейным, пропорциональным образом в диапазоне доз от 150 мкг/кг до 350 мкг/кг. Результаты для вторичных конечных точек подтверждают выводы для основных конечных точек.
- Никаких существенных различий в результатах эффективности между FAS и PPS не наблюдалось.
- Анализ нежелательных явлений не выявил различий в безопасности и переносимости между исследуемым и контрольным препаратами.
- Анализ других связанных с безопасностью параметров, таких как AE, SAE, показатели жизнедеятельности, и результаты лабораторных исследований не выявили особых проблем с безопасностью тестируемого продукта.
- Случаев появления новых антител против GX-G3 не наблюдалось.

Таким образом, среди всех проведенных исследований (доклинических и клинических) от 200 мкг/кг до 400 мкг/кг вводили через 24 часа после химиотерапии, предпочтительно от 250 мкг/кг до 350 мкг/кг GX-G3 был сделан вывод, что это наиболее подходящий режим для дальнейших клинических исследований и для получения целевого профиля продукта.

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в данном исследовании. Специалистам в данной области, технически будет очевидно, что в эти способы и композиции настоящего изобретения могут быть внесены различные модификации и вариации, не выходящие за рамки сущности или объема изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение охватывает модификации и вариации этого изобретения при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и её эквивалентов.

Формула изобретения

1. Способ предупреждения нейтропении или снижения продолжительности нейтропении у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение G-CSF, слитого с гибридным Fc, следующей формулы (I) субъекту при дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг:

Формула (I):

N'-G-Y-Z2-Z3-Z4-C',

где

G представляет собой G-CSF;

N' представляет собой N-конец полипептида, и C' представляет собой C-конец полипептида;

Y представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 5 до 64 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 162 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 99 до 162 в SEQ ID NO: 2;

Z2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 4 до 37 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 163 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 163 до 199 в SEQ ID NO: 2;

Z3 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 71 до 106 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 220 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 115 до 220 в SEQ ID NO: 3; и

Z4 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 80 до 107 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 221 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 221 до 327 в SEQ ID NO: 3.

2. Способ по п. 1, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят при дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 250 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг.
3. Способ по п. 1, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных остатков 31-449 в SEQ ID NO: 1.
4. Способ по п. 1, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят парентерально.
5. Способ по п. 4, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят подкожно.
6. Способ по п. 1, где указанным субъектом является человек, проходящий противораковую терапию.
7. Способ по п. 6, где указанный субъект-человек проходит химиотерапию.
8. Способ по п. 6, где указанный субъект-человек проходит лучевую терапию.
9. Способ по п. 7, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят субъекту-человеку один раз за цикл химиотерапии.
10. Способ по п. 7, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят через по меньшей мере 24 часа после химиотерапии.
11. Способ по п. 7, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят один раз каждые два, три, четыре или более циклов химиотерапии.
12. Способ по п. 1, где нейтропения может быть умеренной или тяжелой.
13. Способ по п. 1, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят в составе фармацевтической композиции, содержащей G-CSF, слитый с гибридным Fc, и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Способ по п. 1, где фармацевтическая композиция демонстрирует нелинейную фармакокинетику в соответствии со сверхпропорциональным увеличением AUC при увеличении дозы.
15. Способ увеличения уровней нейтрофилов у субъекта, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества G-CSF, слитого с гибридным Fc,

следующей формулы (I) субъекту при дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 200 мкг/кг до приблизительно 400 мкг/кг:

Формула (I):

N'-G-Y-Z2-Z3-Z4-C',

где

G представляет собой G-CSF;

N' представляет собой N-конец полипептида, и C' представляет собой C-конец полипептида;

Y представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 5 до 64 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 162 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 99 до 162 в SEQ ID NO: 2;

Z2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 4 до 37 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 163 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 163 до 199 в SEQ ID NO: 2;

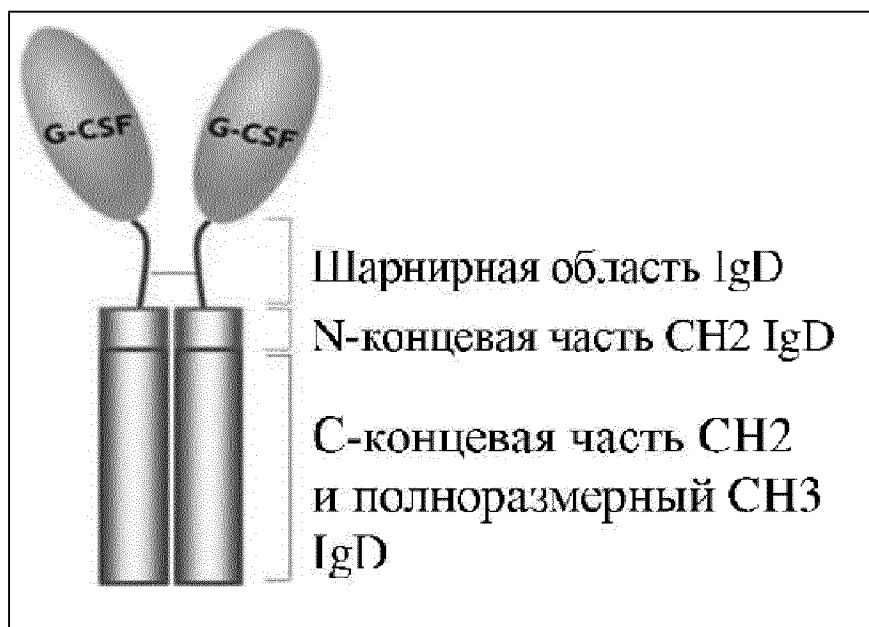
Z3 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 71 до 106 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 220 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 115 до 220 в SEQ ID NO: 3; и

Z4 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 80 до 107 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 221 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 221 до 327 в SEQ ID NO: 3.

16. Способ по п. 15, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят при дозе, находящейся в диапазоне от приблизительно 250 мкг/кг до приблизительно 350 мкг/кг.

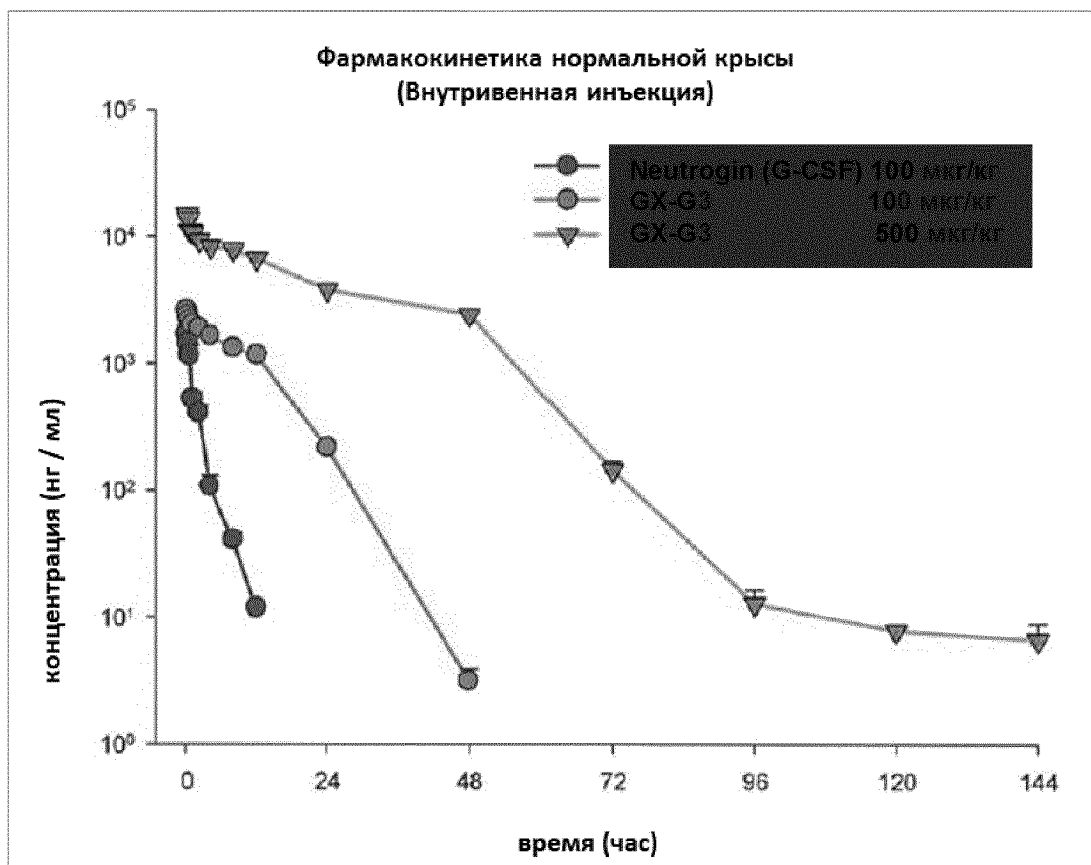
17. Способ по п. 15, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, содержит аминокислотную последовательность из аминокислотных остатков 31-449 в SEQ ID NO: 1.
18. Способ по п. 15, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят парентерально.
19. Способ по п. 15, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, вводят подкожно.
20. Способ по п. 15, где указанным субъектом является человек, у которого уровень циркулирующих нейтрофилов является ниже, чем приблизительно $1,0 \times 10^9/\text{л}$ крови.
21. Способ по п. 15, где указанным субъектом является человек, у которого уровень циркулирующих нейтрофилов является ниже, чем приблизительно $0,5 \times 10^9/\text{л}$ крови.

1/24



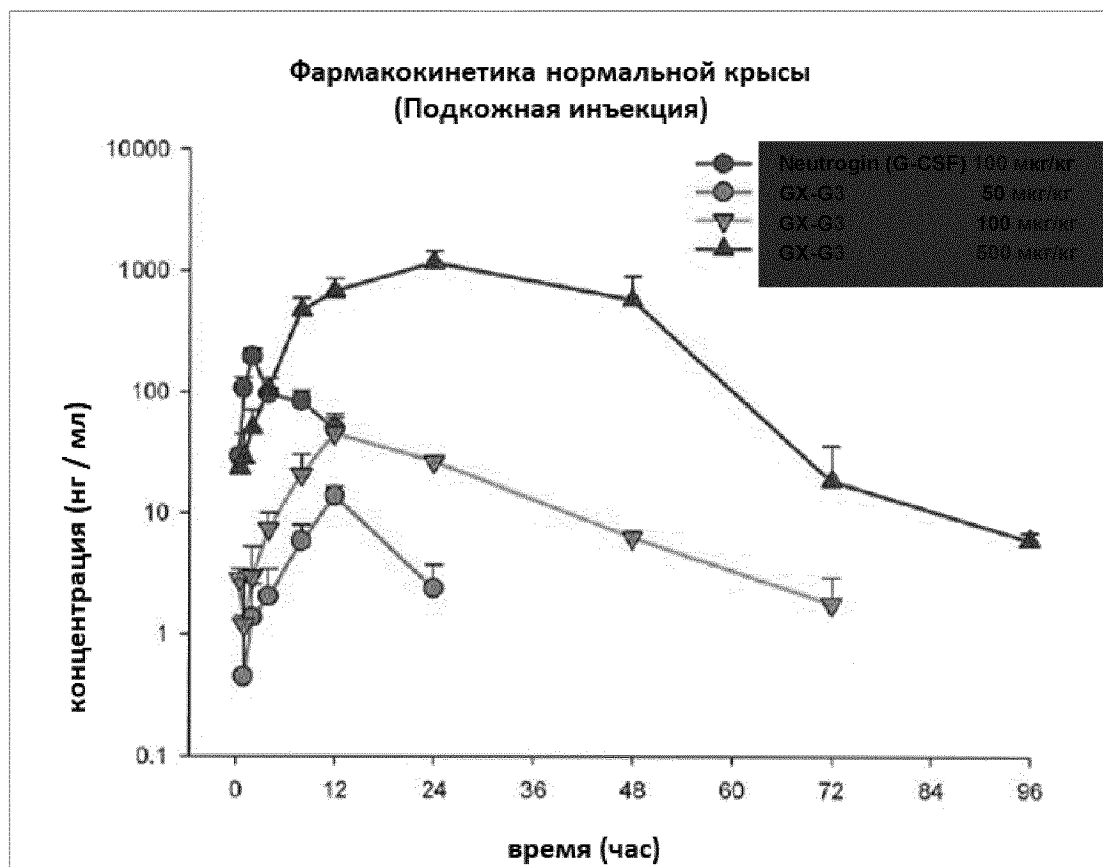
Фигура 1

2/24



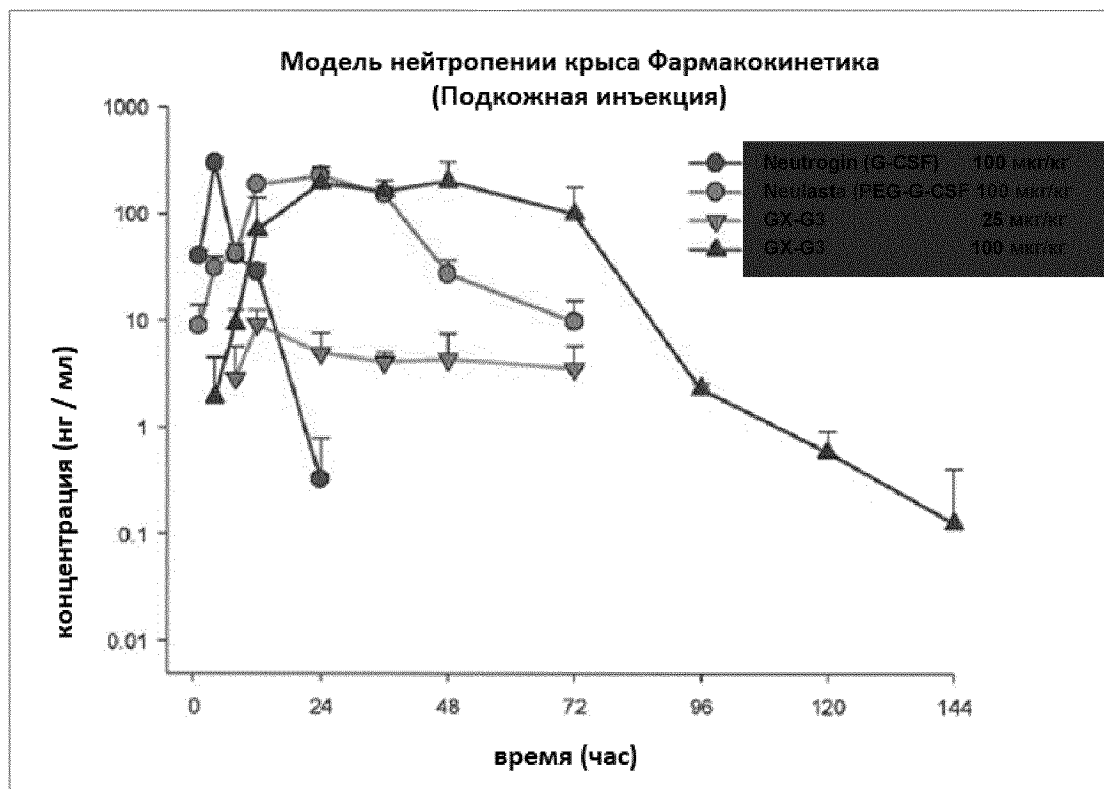
Фигура 2

3/24



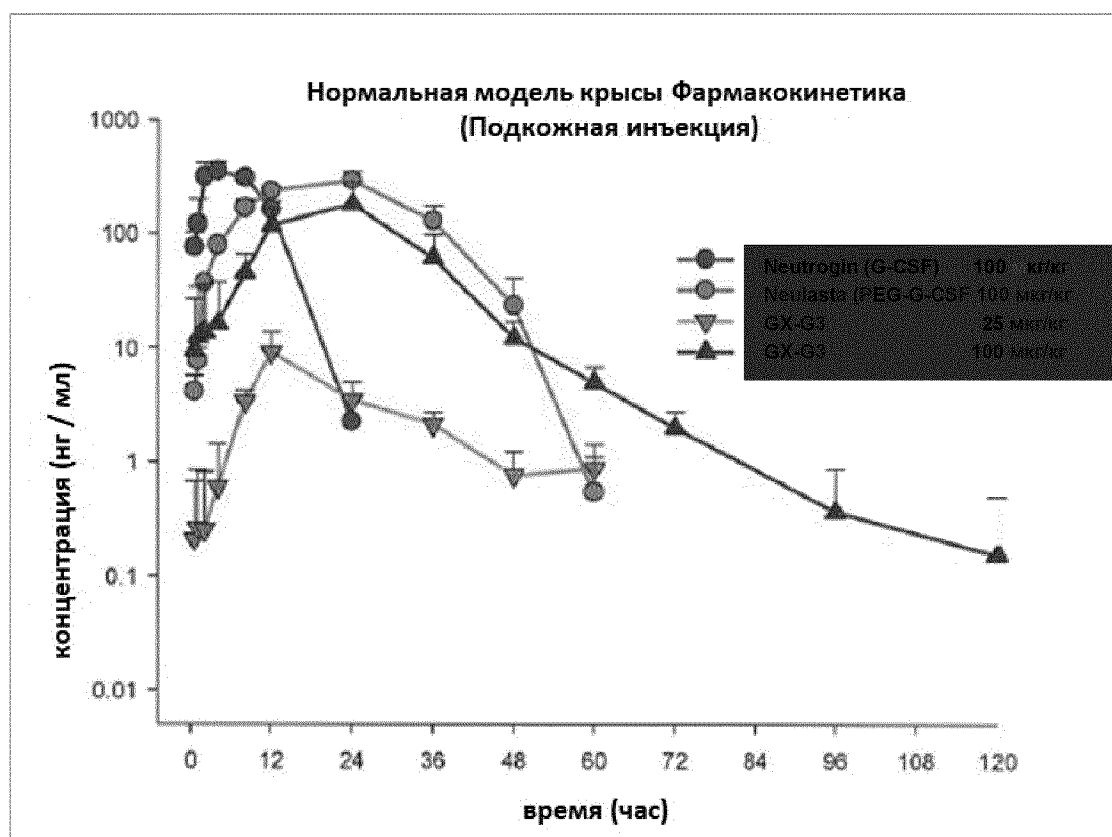
Фигура 3

4/24



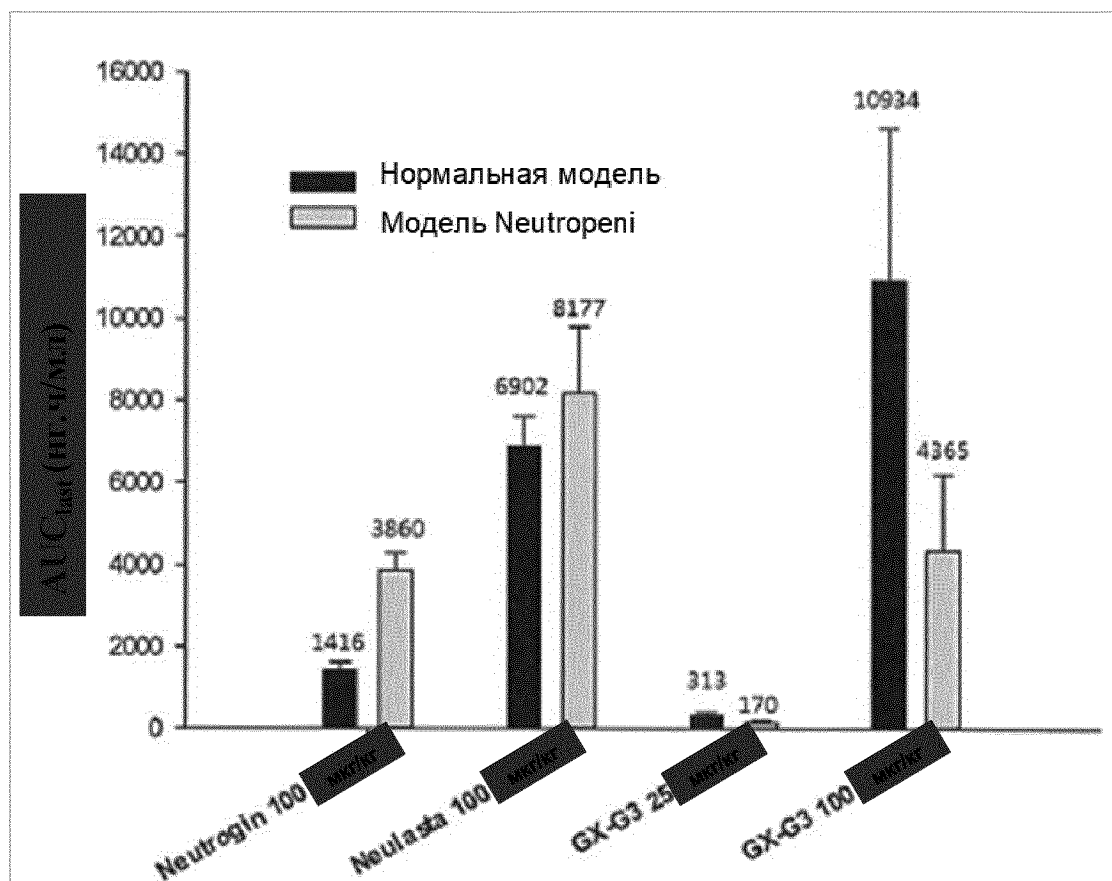
Фигура 4

5/24



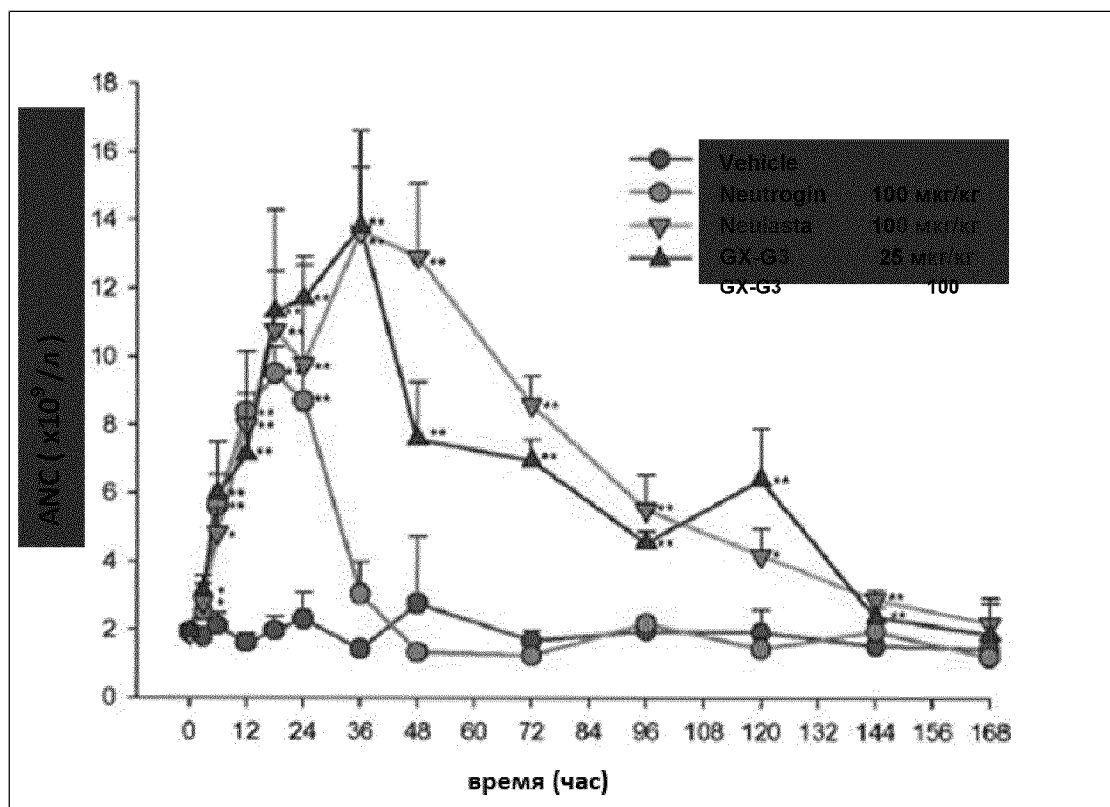
Фигура 5

6/24



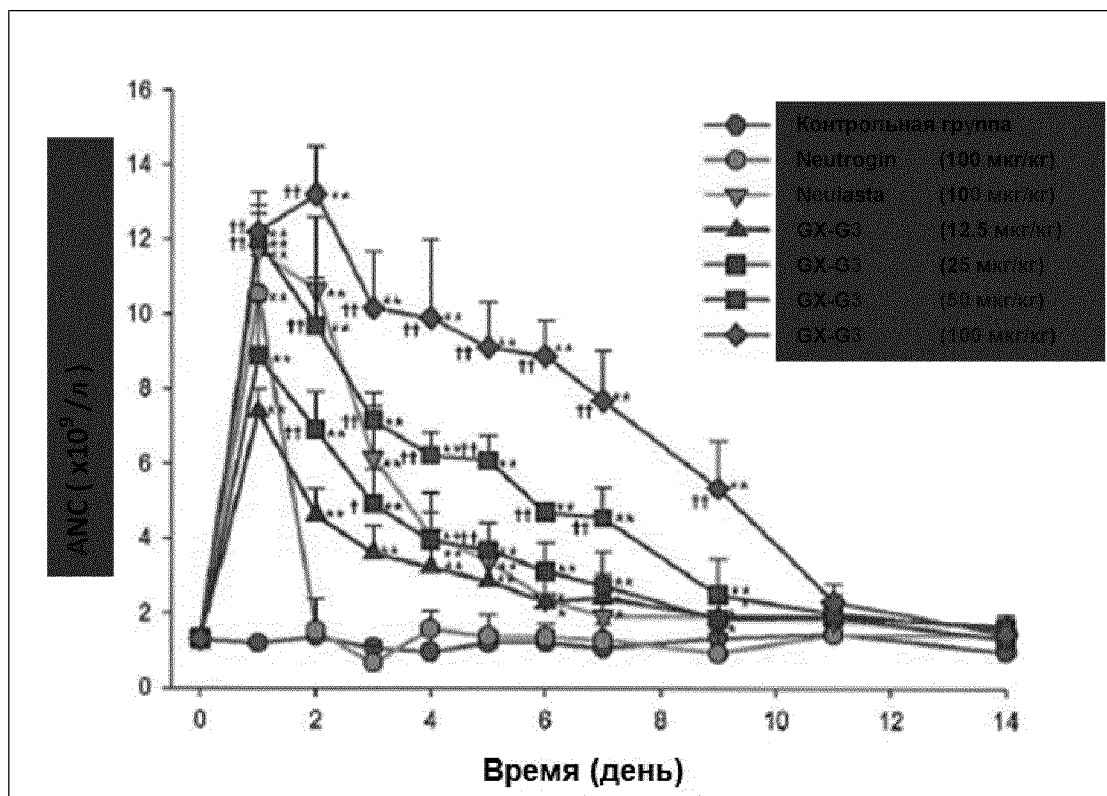
Фигура 6

7/24



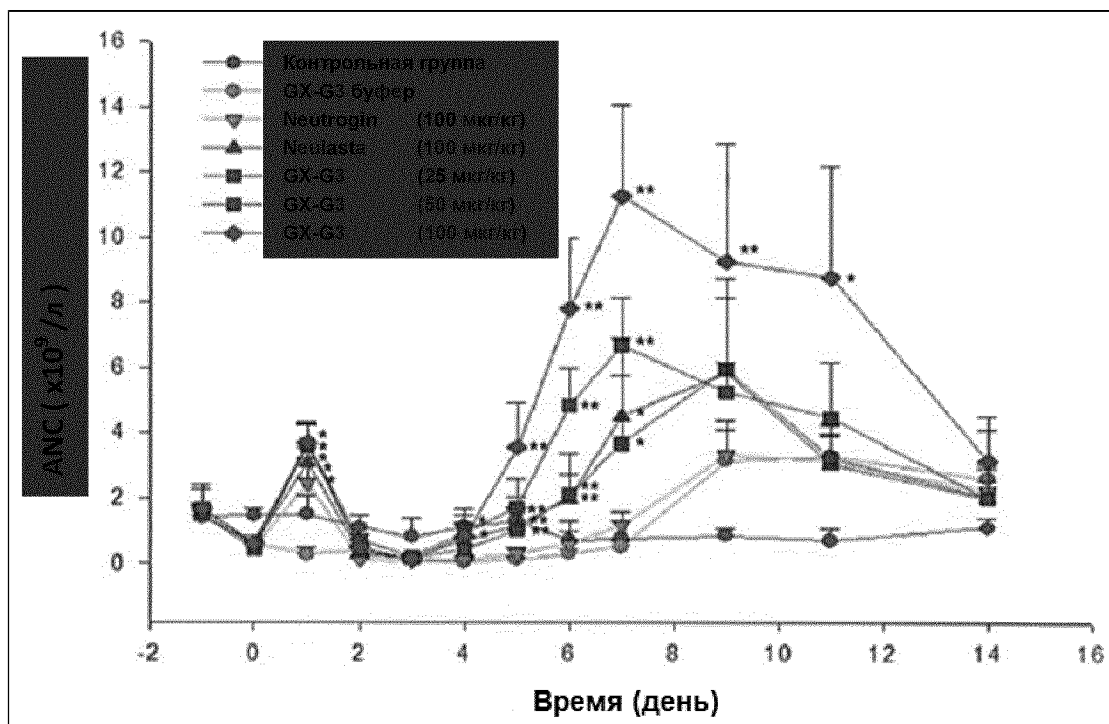
Фигура 7

8/24



Фигура 8

9/24



Фигура 9

		Животное	Доза	Инъекция	NOAEL*
Фармакология безопасности	Пример 5: (анализ hERG)	-	6, 30, 60 мкг/кг	перфузия	> 60 мкг/кг
	Пример 6: (Ирвин тест & Температура тела)	Крыса	0, 1, 3, 10 мг/кг	Подкожный, одиночный	Без эффектов
	Пример 7: (Респираторный тест)	Крыса	0, 1, 3, 10 мг/кг	Подкожный, одиночный	Без эффектов
	Пример 8: (Сердечно-сосудистый тест)	Обезьяна	0, 1, 3 мг/кг	Подкожный, одиночный	Без эффектов

*NOAEL: Уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов

Фигура 10

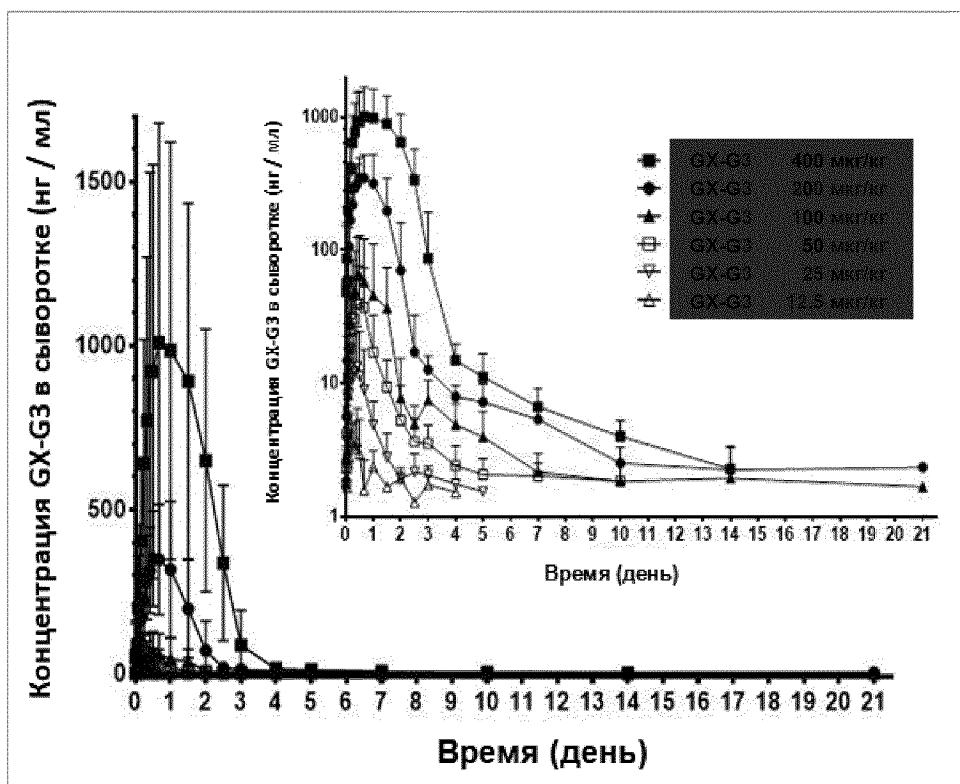
Токсикологические и токсикокинетические исследования					
	Животное	Доза	Инъекция	NOAEL	
Пример 9	Крыса	0, 1, 3, 10 мг/кг	Подкожный, одиночный	-	
Пример 10	Крыса	0, 1, 3, 5 мг/кг	Подкожно, каждые 2 дня	-	
Пример 11	Обезьяна	0, 1, 5, 10 мг/кг	Подкожно, каждые 2 дня		
Пример 12	Крыса	0, 1, 3, 10 мг/кг	Подкожно, еженедельно	1 мг/кг	
Пример 13	Обезьяна	0, 1, 3, 10 мг/кг	Подкожно, еженедельно	3 мг/кг	
Пример 14	Крыса	0, 1, 3, 5 мг/кг	Подкожный; GD* 6, 9, 12, 15	5 мг/кг	
Пример 15	Кролик	0, 0.035, 0.1, 0.3, 1 мг/кг	Подкожный; GD* 6, 9, 12, 15, 18	0.035 мг/кг	
Пример 16	Крыса	0, 1, 3, 5 мг/кг	Подкожно, еженедельно	1 мг/кг	
Пример 17	Обезьяна	0, 1, 3, 5 мг/кг	Подкожный; первый раз в неделю, второй прием затем раз в две недели**	3 мг/кг	

*GD: День беременности

** Дни дозирования: 1, 8, 22, 36, 50, 64, 78, 92, 106, 120, 134, 148, 162, 176

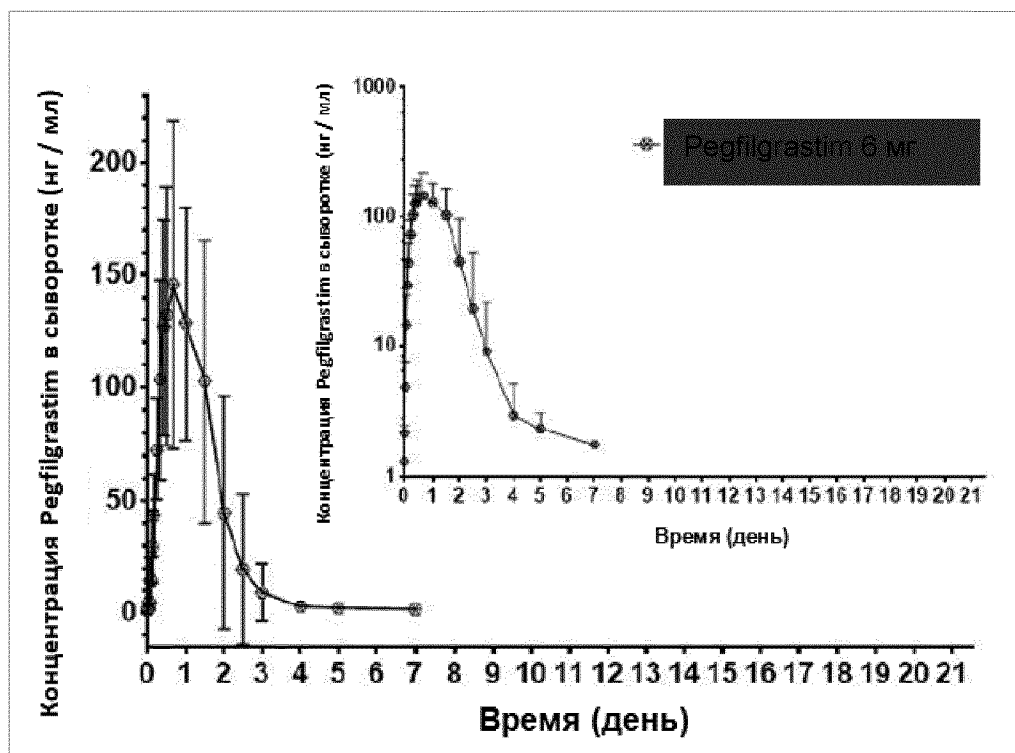
Фигура 11

12/24



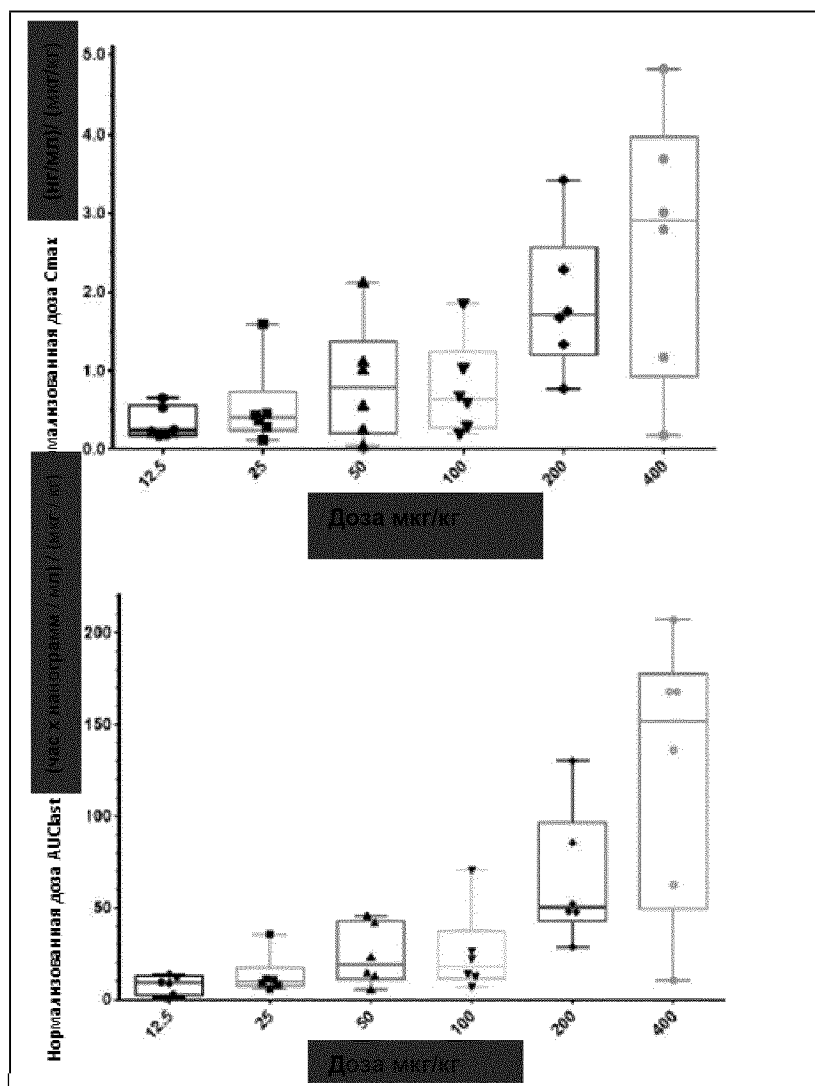
Фигура 12

13/24



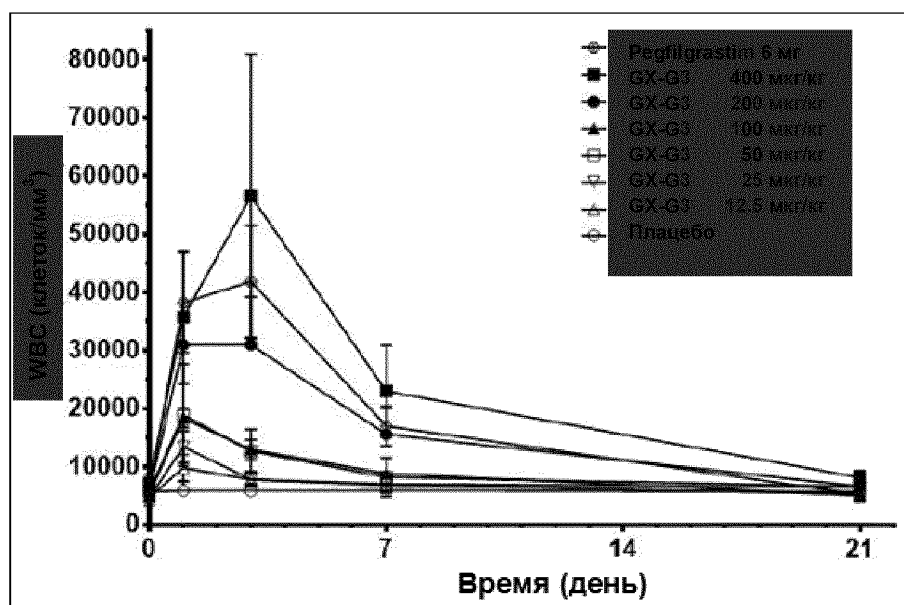
Фигура 13

14/24



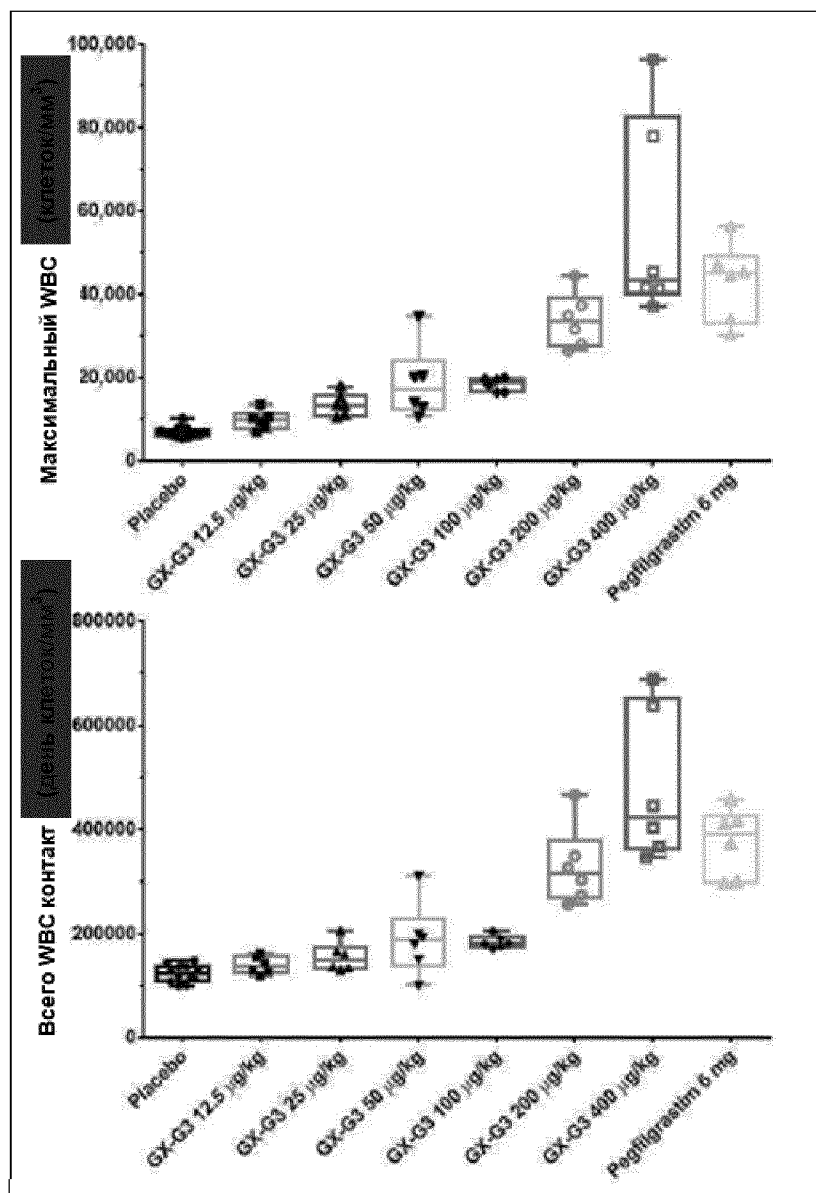
Фигура 14

15/24



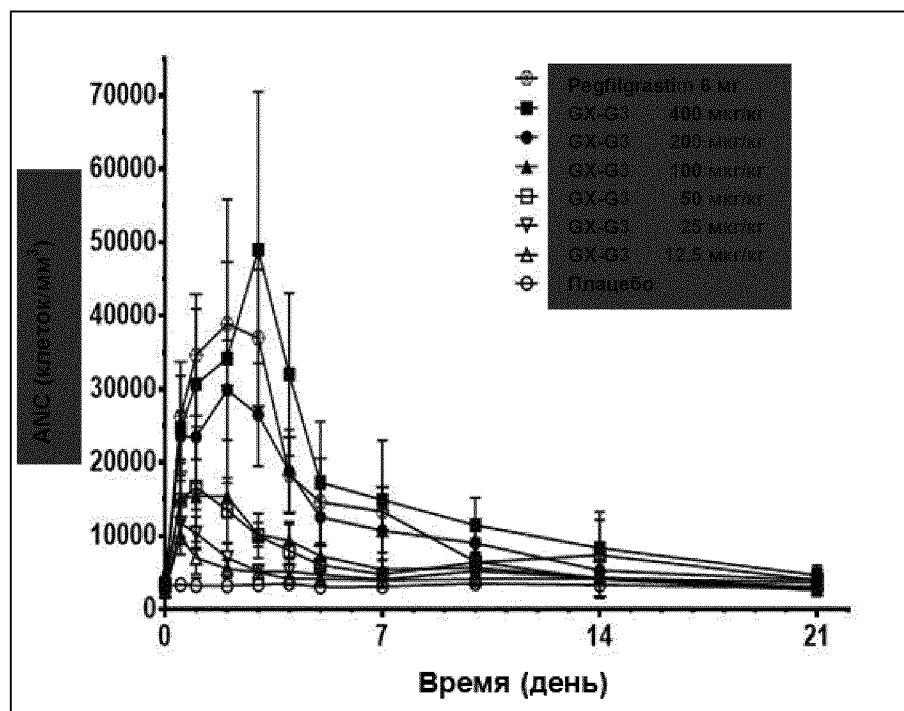
Фигура 15

16/24



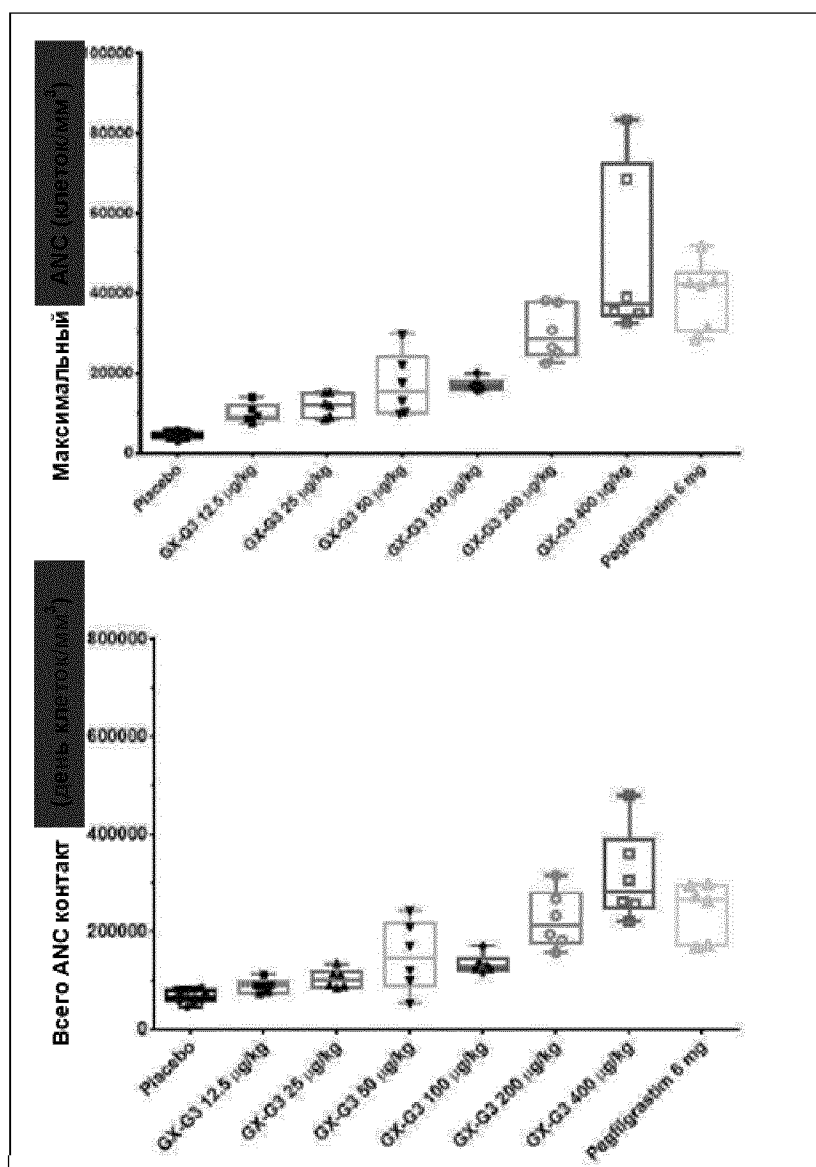
Фигура 16.

17/24



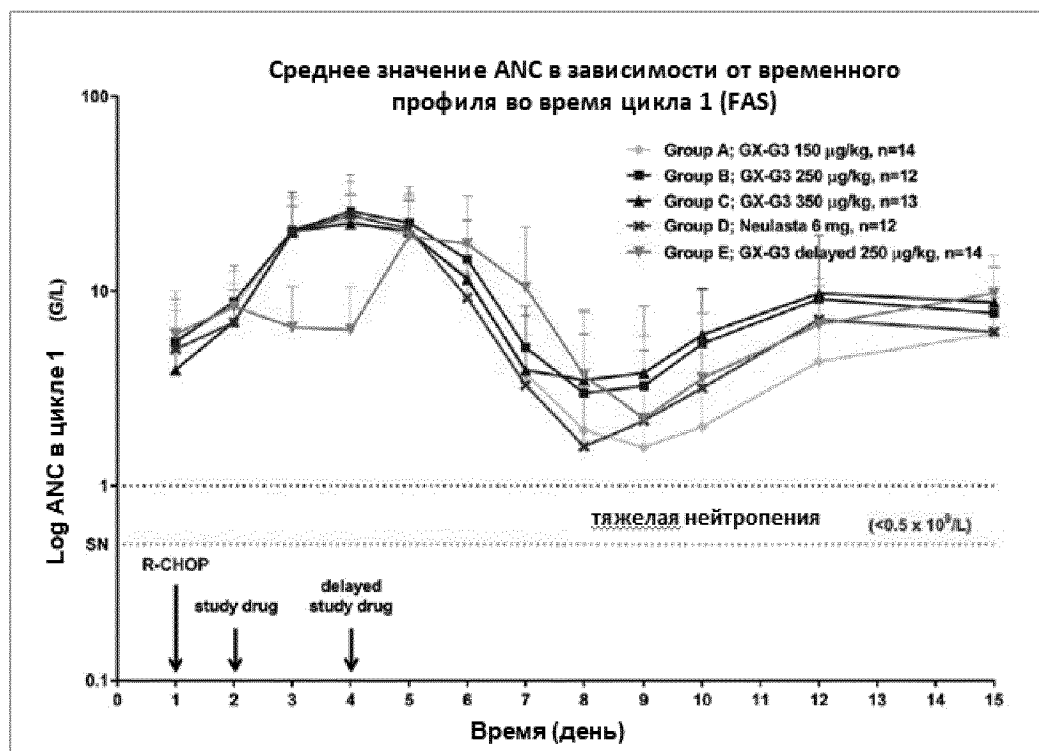
Фигура 17

18/24



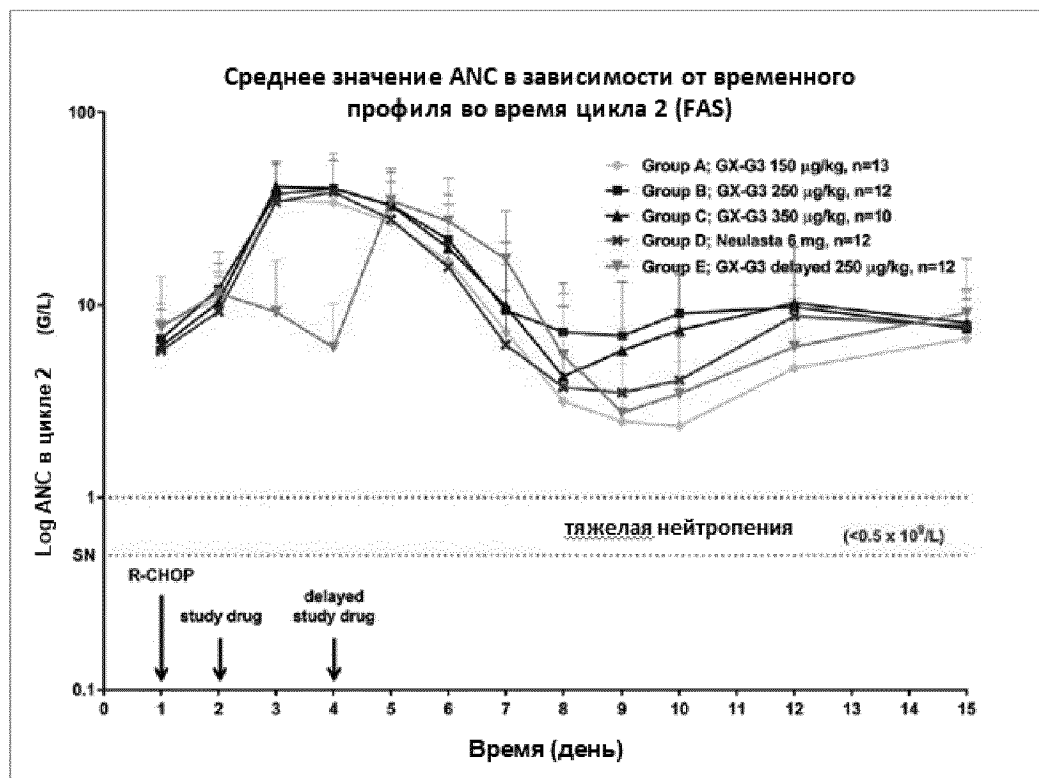
Фигура 18

19/24



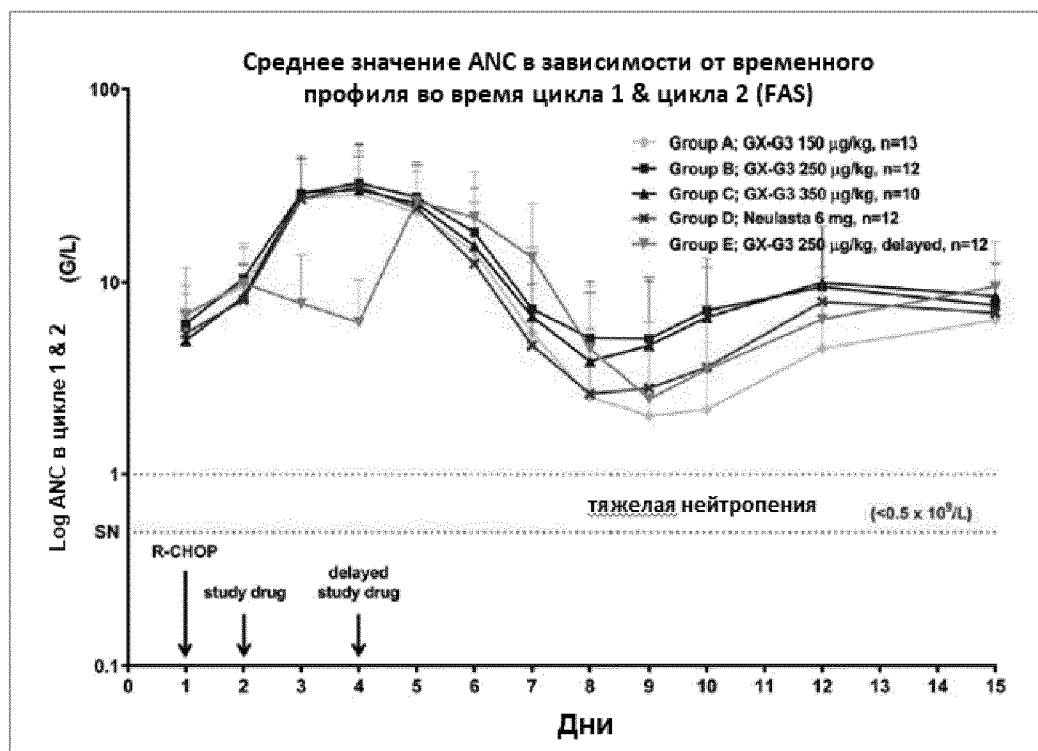
Фигура 19

20/24



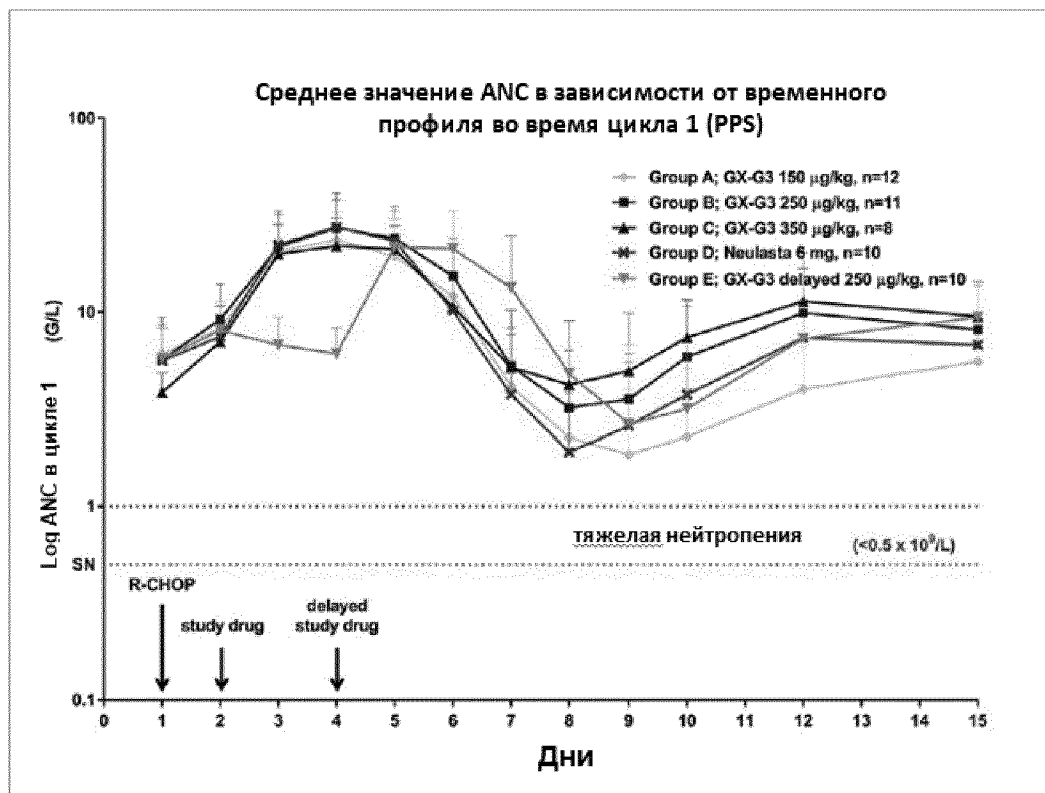
Фигура 20

21/24



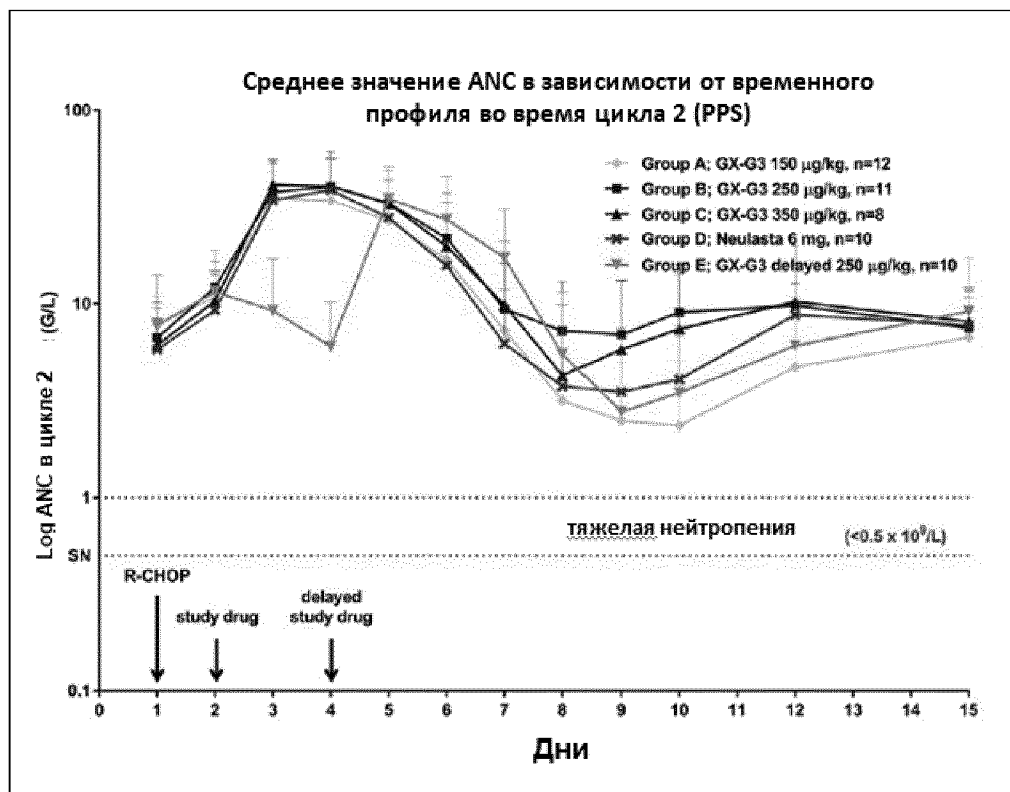
Фигура. 21

22/24



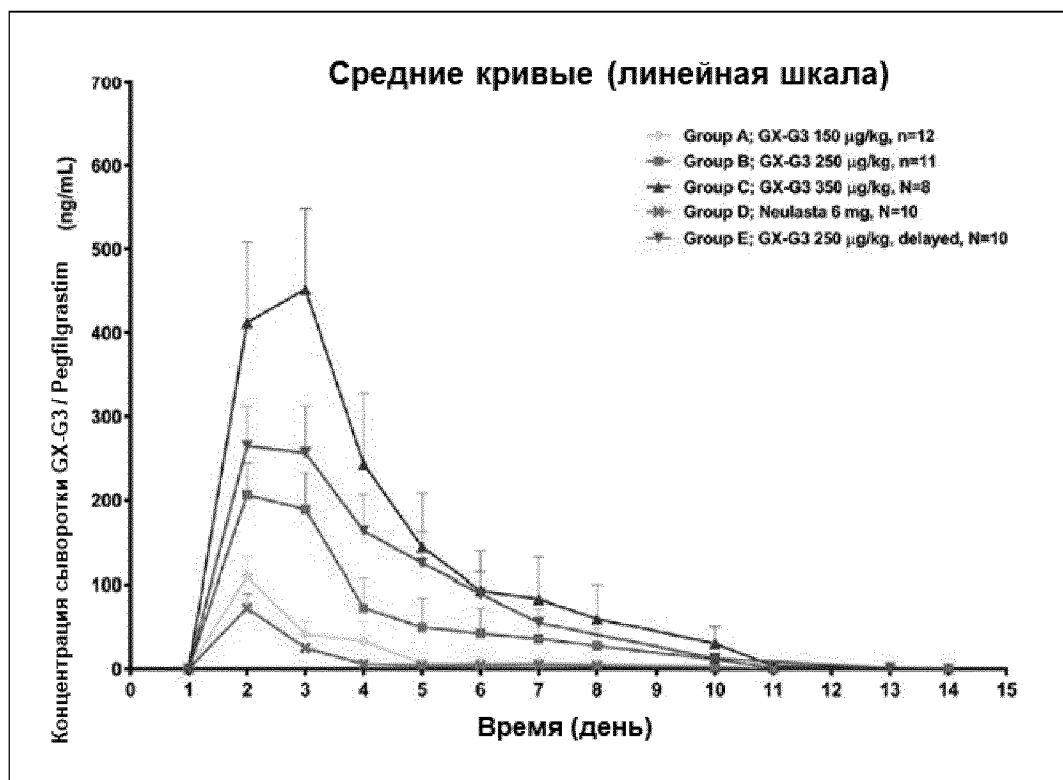
Фигура 22

23/24



Фигура 23

24/24



Фигура 24