



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46815 (13) C2

(51) 6 A61K31/495, C07H19/167

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ МОДУЛЯЦІЇ РЕАКЦІЇ TH1 І TH2 В АКТИВОВАНИХ Т-КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТА, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАННЯ

1

2

(21) 98073815
(22) 21 01 1997
(24) 17 06 2002
(86) PCT/US97/00600, 21 01 1997
(31) 08/590 449
(32) 23 01 1996
(33) US
(31) 60/036 094
(32) 14 01 1997
(33) US
(46) 17 06 2002, Бюл. № 6, 2002 р.
(72) Тем Роберт, US, Рамасамі Кандсамі, US, Аверетт Деврон, US
(73) Ай-Сі-Ен ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК, US
(56) Chen et al "Effect of Ribavirin on NK Activities of Murine Spleen In Vitro", ACTA Pharmaceutica Sinica, 1995, vol 30, №5, pages 417-421
Klassen et al "Ribavirin Efficacy in the Treatment of Murine Autoimmune Disease", Science, 25 February 1977, vol 195, №4280, pages 787-789
US 5,290,540 A, 01 March 1994
Erard et al "Virus Specific CD8 + T Cells can Switch into Noncytolytic CD8-CD4- Cells which Produce TH2 Lymphokines and Help B Cells", Challenges Mod Med 1994, vol 8, pages 44-88
(57) 1. Спосіб модулювання реакції Th1 і Th2 в активованих Т-клітках людини, включаючий введення рибавіріну в Т-клітки в дозі, яка стимулює реакцію Th1 і угнітає реакцію Th2
2. Спосіб по п. 1, відмінний тим, що включає лікування вірусного захворювання
3. Спосіб лікування пацієнта, страждального невірусним захворюванням, характеризується цитокінним профілем, в якому Th1 угнітається, а Th2 посилюється, включаючий введення рибавіріну пацієнту за схемою, яка стимулює реакцію Th1 і угнітає реакцію Th2
4. Спосіб по п. 3, відмінний тим, що захворювання включає алергію
5. Спосіб по п. 3, відмінний тим, що захворювання включає аутоімунне захворювання
6. Спосіб по п. 3, відмінний тим, що захворювання включає захворювання, викликане гельмінтами
7. Спосіб лікування пацієнта, страждального захворюванням, яке включає вірусний компонент

і невірусний компонент, при цьому невірусний компонент характеризується зменшенням рівня Th1 і збільшенням рівня Th2 в активованих Т-лімфоцитах, включаючий введення рибавіріну пацієнту за схемою, достатньою для стимулювання реакції Th1 і угнітання реакції Th2
8. Спосіб по п. 7, відмінний тим, що захворювання включає первинне імунodefіцитне стан
9. Спосіб по п. 7, відмінний тим, що захворювання включає вторинне імунodefіцитне стан
10. Спосіб по п. 7, відмінний тим, що вірусний компонент включає вірус імунodefіцита людини
11. Спосіб лікування захворювання, чутливого до впливу рибавіріну, включаючий розпізнавання розвитку захворювання як опосередкованого по крайній мірі частково лімфоцитами Th1, розпізнавання рибавіріну як ефективного засобу для стимуляції реакції Th1 і угнітання реакції Th2 при введенні в діапазон доз, нижче якого обидві реакції Th1 і Th2 угнітаються, і введення рибавіріну пацієнту, якому таке захворювання, в межах цього діапазону доз
12. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що захворювання включає гепатит С
13. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що дозування складає приблизно 4,5 мг/кг маси тіла пацієнта в день
14. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що дозування досягає рівня сироватки крові пацієнта приблизно 0,25 - 12,5 мг/мл рибавіріну
15. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що захворювання включає гепатит С і дозування досягає рівня сироватки крові пацієнта приблизно 0,25 - 12,5 мг/мл рибавіріну
16. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що захворювання вибирають з групи, що складається з алергічної астми, atopічного дерматиту, гельмінтної інфекції і лейшманиозу
17. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що захворювання - це первинне або вторинне імунodefіцитне стан
18. Спосіб по п. 11, відмінний тим, що сти-

(13) C2

(11) 46815

(19) UA

муляция реакции Th1 характеризуется ростом производства интерлейкина 2 (IL-2), фактора некроза опухоли (TNF α) и γ -интерферона (IFN γ)

19 Способ по любому из пп 11-17, отличающийся тем, что дополнительно включает введение α -интерферона пациенту

Область настоящего изобретения - иммунология

Лимфокины - это группа полипептидов, принадлежащих к семейству цитокинов, то есть к гормоноподобным молекулам, которые могут влиять на различные функции клеток и способствуют взаимодействию между различными клетками. Последние исследования помогают прояснить роль лимфокинов в иммунной реакции. Производство лимфокинов Т-клетками-хелперами CD4⁺ (а также CD8⁺) часто распадается на один из двух фенотипов Th1 и Th2 как в мышиных системах, так и в системах человека (Romagnani, 1991, *Immunol Today* 12 256 - 257, Mosmann, 1989, *Annu Rev Immunol* 7 145 - 173). Th1 - клетки производят интерлейкин 2 (IL-2), фактор некроза опухоли (TNF α) и γ -интерферон (IFN γ) и они, главным образом, отвечают за клеточный иммунитет, например, такой как гиперчувствительность подавляющего типа. Th2-клетки производят интерлейкины IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13, и, главным образом, участвуют в обеспечении оптимального хелперного сигнала для гуморальных иммунных реакций, таких как переключение изотипа антител IgE и IgG4 (Mosmann, 1989, *Annu Rev Immunol* 7 145 - 173).

Сильно поляризованные реакции Th1 и Th2 не только играют различную роль в защите, они также вызывают различные иммунопатологические реакции. Реакции Th1 - типа участвуют в специфическом аутоиммунитете органа, таком как экспериментальный аутоиммунный увеоретинит (Dubey et al, 1991, *Eur Cytokine Network* 2 147 - 152), экспериментальный аутоиммунный энцефалит (EAE) (Beraud et al 1991, *Cell Immunol* 133 379 - 389) и инсулинозависимый сахарный диабет (Hahn et al, 1987, *Eur J Immunol* 18 2037 - 2042), в контактном дерматите (Karsenberget al, *Immunol Today* 12 392 - 395) и в некоторых хронических воспалительных заболеваниях. Напротив, реакции Th2 - типа отвечают за стимуляцию аллергических атоических заболеваний (вызываемых обычными аллергенами окружающей среды), таких как аллергическая астма (Walker et al, 1992, *Am Rev Resp Dis* 148 109 - 115) и атоический дерматит (van der Heijden et al, 1991, *J Invest Derm* 97 389 - 394). Считают, что реакции Th2-типа обостряют течение инфекционного заболевания, вызванного живущими в тканях простейшими, такими как гельминты (Finkelman et al, 1991, *Immunoparasitol Today* 12 A62 - 66) и возбудители Лейшманиоза (Caceres-Dittmar et al, 1993, *Clin Exp Immunol* 91 500 - 505). Эти реакции индуцируются прежде всего при обычных первичных иммунодефицитных состояниях, таких как синдром гипер-IgE (hyper-IgE) (Del Prete et al, 1989, *J Clin Invest* 84 1830 - 1835) и синдром Omenn's (Schandene et al, 1993, *Eur J Immunol* 23 56 - 60), и ассоциируется с ос-

лабленным синдромом гипер-IgE (hyper-IgE) (Del Prete et al, 1989, *J Clin Invest* 84 1830 - 1835) и синдромом Omenn's (Schandene et al, 1993, *Eur J Immunol* 23 56 - 60) и ассоциируется с ослабленной способностью подавлять репликацию ВИЧ (HIV) (Barker et al, 1995, *Proc Soc Nat Acad Sci USA* 92 11135 - 11139).

Итак, очевидным является тот факт, что модуляция лимфокинных профилей вышеупомянутых заболеваний будет демонстрировать терапевтически эффект. Стимуляция реакции Th1 вероятней всего приведет к реверсии фенотипа Th2 и наоборот. Было продемонстрировано, что моноклональные антитела (mAb) к лимфокинам, сами лимфокины и другие агенты, такие как тиоловые антиоксиданты (Jeannin et al, 1995, *J Exp Med* 182 1785 - 1792), вызывают изменения в патогенезе некоторых заболеваний путем ингибирования цитокинного типа Th1 или Th2, стимулирующего заболевание. Например, инфекционные заболевания, вызванные внутриклеточными простейшими, ограничиваются γ -интерфероном (IFN γ), но обостряются IL-4, в то время, как течение инфекционных заболеваний, вызванных нематодами, контролируются IL-4 и обостряются γ -интерфероном (Heinzel et al, 1989, *J Exp Med* 162 59 - 72, Eise et al, 1994, *J Exp Med* 179 347 - 351). Уменьшить симптомы инсулинозависимого сахарного диабета у NOD - мышей и экспериментального аутоиммунного энцефалита у мышей и крыс можно путем лечения IL-4 или моноклональными антителами анти- γ -интерферона (anti-IFN γ mAb) до развития заболевания (Rapoport et al, 1993, *J Exp Med* 178 87 - 99, Racke et al, 1994, *J Exp Med* 180 1961 - 1966, Campbell et al, 1991, *J Clin Invest* 87 739 - 742). Кроме того, аутоиммунная реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD), которая характеризуется синдромом подобным системной красной волчанке, связанным с производством лимфокинов Th2 и ингибируется антителом анти-IL-4 (anti-IL-4) (Umland et al, 1992, *Clin Immunol Immunopathol* 63 66 - 73). С другой стороны, цитокины Th1 производятся при острой реакции "трансплантат против хозяина", в которой донорные Т-клетки CD8⁺ развиваются в цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) и разрушают иммунную систему хозяина. Лечение анти- γ -интерфероном (anti-IFN γ) или моноклональными антителами (mAb) анти-фактора некроза опухоли α (anti-TNF α) уменьшает симптомы заболевания, а лечение моноклональными антителами анти-IL-2 превращает острую реакцию "трансплантат против хозяина" в аутоиммунную реакцию "трансплантат против хозяина" (Via and Finkelman, 1993, *Int Immunol* 5 565 - 572).

Клинические испытания с нативным и рекомбинантным IL-2 при лечении ВИЧ-

инфицированных пациентов развивались с 1983 года (Volberding et al, 1987, AIDS Res Hum Retroviruses, 3 115 - 124). В данном случае взаимосвязь установили из того факта, что, как сообщалось, СПИД связан со сдвигом в структуре производимых лимфокинов (Clerici and Shearer, 1994 Immunol Today 15 575 - 581). Со временем у инфицированных пациентов с прогрессирующим заболеванием иногда проявляется уменьшенная экспрессия лимфокинов Th1, таких как IL-2 (Maggi et al, 1987, Eur J Immunol 17 1685 - 1690, Gruters et al, 1990, Eur J Immunol 20 1039 - 1044, Clerici et al, 1993, J Clin Invest 91 759 - 765), которому сопутствует увеличение производства лимфокинов Th2, таких как IL-4 и IL-10 (Clerici et al, 1994, J Clin Invest 93 768 - 775, Hoffman et al, 1985, Virology 147 326 - 335). Т-клетки у бессимптомных пациентов или у пациентов с длительным сроком выживания, которых лечили IL-2, увеличили свою анти-ВИЧ активность, в то время, как лечение IL-4 или IL-10 ослабило их способность подавлять репликацию ВИЧ и производить IL-2 (Barker et al 1995, Proc Soc Nat Acad Sci USA 92 11135 - 11139).

Эта современная терапия иммуномодуляторами (моноклональные антитела и рекомбинантные цитокины), тем не менее, имеет ограничения. Например, при хроническом лечении моноклональными антителами у животного-хозяина развиваются антитела против моноклональных антител, что ограничивает их полезность. Были разработаны "гуманизированные" моноклональные антитела, которые, по-видимому, уменьшают риск возникновения индуцированных иммунных реакций на эти моноклональные антитела. Однако, эти моноклональные антитела все еще находятся в стадии разработки, и, кроме того, эти новые моноклональные антитела все еще представляют собой крупные белки, и поэтому может возникнуть трудность в доставке их к участкам, на которые должно быть направлено их действие. Лечебные препараты на основе цитокинов также имеют ограничения. Например, лечение IL-12 аутоиммунной реакции "трансплантат против хозяина" может стать причиной развития острой реакции "трансплантат против хозяина" у мышей.

Рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) является синтетическим нуклеозидом, способным ингибировать репликацию вирусных РНК и ДНК (Huffman et al, 1973, Antimicrob Agents Chemother 3 235, Sidwell et al, 1972, Science 177 705). Мы подтвердили наблюдения тех, кто предположил, что рибавирин в дополнение к своей противовирусной активности, оказывает влияние на некоторые иммунные реакции (Jolley and Suchil, 1984, Clinical Applications of Ribavirin p 93 - 96). Мы также подтвердили наблюдения того, что рибавирин влияет на пролиферацию митоген- и антиген-активированных Т и В лимфоцитов (Tarn et al, 1995 (данные не демонстрируются), Peavy et al, 1980, Infection and Immunity 29 583 - 589), а затем и при сочетании с циклоспорином рибавирин демонстрировал эффективность при большом сроке жизнеспособности аллотрансплантата, Jolley et al (1988, Transplantation Proc 20 703 - 706).

Кроме того, мы значительно продвинулись

вперед по сравнению с предшествующими исследованиями, продемонстрировав, что рибавирин модулирует цитокиновую структуру иммунной реакции, по крайней мере частично, путем стимуляции реакции Th1 и подавления реакции Th2. Это открытие совместимо с предшествующими исследованиями. Во-первых, известно, что рибавирин ингибирует как функциональные гуморальные иммунные реакции, (Peavy et al, 1981, J Immunol 126 861 - 864, Powers et al, 1982, Antimicrob Agents Chemother 22 108 - 114), так и IgE-опосредованную модуляцию секреции тучных клеток (Marquardt et al, 1987, J Pharmacol Exp Therapeutics 240 145 - 149 (оба Th2 лимфокин-опосредованных события)). Во-вторых, рибавирин противодействует антивирусному влиянию азидотимидина (АЗТ) в лимфоцитах периферической крови у ВИЧ-пациентов (Vogt et al, 1987, Science 235 1376 - 1379). Это открытие имеет большое значение потому, что АЗТ ослабляет рецептор IL-2 (IL-2R), а не экспрессию IL-2 (Viora and Camponeschi, 1995, Cell Immunol 163 289 - 295). Поэтому, возможно, что рибавирин противодействует АЗТ путем модулирования экспрессии IL-2 и повышения депрессированных уровней рецептора IL-2. В-третьих, лечение рибавирином пациентов с ослабленным иммунитетом, страдающих хронической реакцией "трансплантат против хозяина" (Тn2-опосредованное нарушение), привело к впечатляющему излечиванию, к результату, который не наблюдался при применении традиционных иммуносупрессантов, таких как циклоспорин и глюкокортикоиды (Cassano, 1991, Bone Marrow Transplantation 7 247 - 248). Наконец, в результате лечения рибавирином (в течение 1 года) пациентов с гепатитом С (HCV) уменьшилось количество скоплений лимфоцитов и значительно уменьшилось поражение печени, по сравнению с препаратами плацебо (Dusheiko et al, 1994, Hepatology 20 206A). Это наблюдение отражает тот факт, что доминирующая иммунная реакция на гепатит С опосредована лимфокинами Th1, Т-клетки фенотипа Th0 / Th2 могут быть инфицированы вирусом гепатита С (Zignego et al, 1994, неопубликованные данные) и такое инфицирование может привести к дальнейшему антитело-опосредованному разрушению гепатоцитов.

Таблица 1 представляет остаточные и фобол 12-миристан 13-ацетата (ФМА) / иономицин-активированные уровни, при 48 и 72 часах, лимфокинов, IL-2, IL-4, фактора некроза опухоли α (TNFα) и γ-интерферона (IFNγ) (нг/мл), измеренные во внеклеточных супернатантах, и поверхностно-клеточную экспрессию рецепторов IL-2 (IL-2R) и IL-4 (IL-4R) (средняя интенсивность канальной флуоресценции) из Т-клеток человека.

Фиг 1 - график, изображающий воздействие рибавирина и α-интерферона на внеклеточную экспрессию IL-2, IL-4, фактора некроза опухоли α (TNFα) и γ-интерферона (IFNγ) в ФМА / иономицин-активированных Т-лимфоцитах. Результаты представлены как процентное соотношение увеличенной лимфокинной экспрессии после лечения только ФМА / иономицином.

Фиг 2 - график, изображающий воздействие 2, 10 или 50мМ рибавирина в присутствии

2000МЕ/мл α -интерферона (слева) и воздействие 500, 1000 или 2000МЕ/мл α -интерферона (справа) в присутствии 10мМ рибавирина на внеклеточную экспрессию IL-2 (А и С) и IL-4 (В и D) в ФМА / иономицин-активированных Т-лимфоцитах

Фиг 3 - график, изображающий воздействие рибавирина и α -интерферона на экспрессию IL-2, IL-4 и мРНК (mRNA) γ -интерферона (IFN γ) в ФМА / иономицин-активированных Т-лимфоцитах

Фиг 4 - график, изображающий воздействие рибавирина и α -интерферона на поверхностно-клеточную экспрессию рецепторов IL-2 и IL-4 в ФМА / иономицин-активированных Т-лимфоцитах. Результаты представлены как процентные соотношения усиленной экспрессии лимфокинных рецепторов после лечения только ФМА / иономицином

Фиг 5 - график, изображающий экспрессию внутриклеточного IL-2 в остаточных (А и Е) Т-клетках или активированных Т-клетках CD4⁺ (вверху), или в активированных Т-клетках CD8⁺ (внизу) после лечения только ФМА / иономицином (В и F) или в присутствии 10мМ рибавирина (С и G) или 5000МЕ/мл α -интерферона (D и H). Результаты одного эксперимента представлены как процентное отношение клеток, демонстрирующих двойное положительное окрашивание для IL-2 и CD4 или CD8

Фиг 6 - график, изображающий рассматриваемые аналоги рибавирина

Фиг 7 - набор графиков, демонстрирующий результаты действия различных концентраций аналогов рибавирина на IL-2, TNF α , γ -интерферон, IL-4 или IL-5

Согласно одному аспекту настоящего изобретения нуклеозид рибавирин вводят пациенту в диапазоне доз, эффективном для модулирования экспрессии лимфокинов в активированных Т-клетках. В частности, рибавирин используется для подавления Th2 - опосредованных реакций Т-клеток и стимулирования Th1 - опосредованной реакции Т-клеток

Итак, вместо введения рибавирина в качестве общеизвестного противовирусного агента, рибавирин в настоящей работе используется при лечении нарушений лимфокинной экспрессии. Такие нарушения могут сопровождаться аллергическими, атоическими заболеваниями, такими как аллергическая астма и атоический дерматит, инфекционными заболеваниями, вызванными гельминтами и возбудителями лейшманиоза, и различными первичными и вторичными иммунодефицитными состояниями, которые могут быть связаны, а могут и не быть связаны с вирусной инфекцией

Согласно другим аспектам настоящего изобретения, один или более аналогов рибавирина вводятся пациенту в диапазоне доз, эффективном для модулирования экспрессии лимфокинов в активированных Т-клетках. Аналоги рибавирина могут использоваться для подавления или усиления Th1 или Th2-опосредованных реакций Т-клеток

В предпочтительном варианте осуществления изобретения рибавирин вводится перорально пациенту в дозировке, которая достигает уровня сыворотки крови, а именно от 0,25 до 12,5мг/мл, и

в более предпочтительной дозировке - 2,5мг/мл. У обычных пациентов этот оптимальный сывороточный уровень составляет примерно 4,5мг/кг массы тела в день, который можно вводить в дозах от 200 - 1200мг. Предпочтительно разбивать дозы на более мелкие и вводить их в течение дня

Так как рибавирин находится на рынке уже несколько лет, известно множество его форм выпуска и способов введения, которые можно использовать соответствующим образом. Например, кроме перорального введения, рибавирин можно вводить внутривенно, внутримышечно, интраперитонеально, местно и им подобными способами, все из которых известны. Технология приготовления лекарственного препарата, включающего рибавирин, может также включать один или более фармацевтически приемлемый носитель, который может включать составные части такие как стабилизаторы (для продления срока хранения), эмульгаторы, связывающие агенты, загустители, соли, консерванты, растворители, дисперсные среды, оболочки, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию и им подобные агенты. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в науке. За исключением случаев, когда некоторые традиционные среды или агенты несовместимы с рибавирином, сейчас рассматривается возможность его использования в лечебных соединениях и препаратах. В соединения и препараты можно также включать дополнительные активные ингредиенты

Кроме рассматриваемых здесь терапевтических вариантов использования рибавирина, рибавирин можно также использовать в лабораторных исследованиях абсорбции, дистрибуции, клеточного поглощения и эффективности

Также обнаружили, что некоторые аналоги вируса (известные и неизвестные ранее), от которых раньше отказались из-за того, что они имеют минимальную активность, также обладают существенной цитокинной активностью. Наши исследования демонстрируют, что существует несколько классов аналогов вируса, которые имеют такую активность, их примеры приводятся ниже под заголовком "Аналоги рибавирина". Эти примеры характеризуют позиции, в которых можно модифицировать вирус для получения активных составов, и поэтому это открытие не должно ограничиваться специфическими модификациями, которые демонстрируются. Кроме того, рассматривается возможность применения таких модификаций к стандартной D-форме вируса наряду с применением к L-форме вируса

Примеры

Клеточные линии и очистка Т-клеток

Мононуклеары периферической крови (МПК) (PBMCs) изолировали от лейкоцитарной пленки вслед за центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Нугауе 60мл крови здоровых доноров. Затем Т-клетки очистили от мононуклеаров периферической крови с использованием реагента изоляции лимфоцитов Lymphokwik специфического для Т-клеток (LK-25T, One Lambda, Canoga Park CA). Затем средний урожай Т-клеток 40 - 60 х

10^6 инкубировали в течение ночи при 37°C в 20 - 30мл RPMI-AP5 (в среде RPMI-1640 (ICN, Costa Mesa, CA), содержащей 20мМ буфер HEPES, pH7,4, 5% аутологичную плазму, 1% L-глутамин, 1% пенициллин / стрептомицин и 0,05% 2-меркаптоэтанол) для того, чтобы удалить любые загрязняющие прилегающие клетки. Во всех экспериментах Т-клетки промывали RPMI-AP5, а затем нанесли на титровальные микропланшеты с 96 лунками при концентрации клеток 1×10^6 клеток/мл.

Активация Т-клеток и лечение рибавирином

Т-клетки активировали, добавив 500нг иономицина и 10нг флорбол 12-миристат 13-ацетата (ФМА) (Calbiochem, La Jolla, CA), и инкубировали в течение 48 - 72 часов при 37°C . ФМА / иономицин-активированные Т-клетки обрабатывали 0,5 - 50мМ рибавирином или 250 - 10000МЕ/мл контрольного α -интерферона (Accurate, Westbury, NY) сразу после активации и повторяли обработку через 24 часа. Т-клетки с каждого планшета использовали для иммунофлуоресцентного анализа, а супернатанты использовали для внеклеточных цитокинных измерений. После активации 900мл клеточного супернатанта с каждого микропланшета переместили на другой микропланшет для анализа производства цитокинов, являющихся производными клеток. Затем клетки использовали в иммунофлуоресцентном анализе внутриклеточных цитокинных уровней и экспрессии рецепторов цитокинов.

Внеклеточный анализ цитокинов

Определили концентрации производных от клеток цитокинов человека в супернатантах клеток из каждого микропланшета. Изменения, индуцированные активацией, в уровнях интерлейкина-2 (IL-2) определили с использованием имеющегося на рынке набора ELISA (R & D systems Quantikine kit, Minneapolis, MN) или путем биоанализа с использованием IL-2-зависимой клеточной линии, CTLL-2 (ATCC, Rockville, MD). Индуцированные активацией изменения в уровнях интерлейкина-4 (IL-4), фактора некроза опухоли (TNF α), интерлейкина-8 (IL-8) (R & D systems Quantikine kit, Minneapolis, MN) и γ -интерферона (Endogen (Cambridge, MA) определили с использованием наборов ELISA. Все результаты опытов с ELISA выражались в пг/мл, а результаты биоанализа с CTLL-2 - в импульсах в минуту, представляя IL-2-зависимое клеточное включение ^3H -тимидина (ICN, Costa Mesa, CA) клетками CTLL-2.

Исследования непосредственной иммунофлуоресценции (рецепторы цитокинов)

Для прямого окрашивания меченных флуоресцином антител для клеточных поверхностных антигенов клетки дважды промыли изотоническим солевым раствором, pH7,4 (Becton Dickinson, Mansfield, MA) и повторно суспендировали в 50мл изотонического солевого раствора и разделили на два образца. Один аликвотный образец окрасили совместно РЕ-анти CD25 / ФИТЦ-анти CD4 или РЕ-крысиным антимышиним IgG + анти-CDw124 / ФИТЦ-анти CD4 (моноклональное антитело), а неспецифическую флуоресценцию определили путем окрашивания второго аликвотного образца РЕ / ФИТЦ-меченным, изотонически сходным кон-

трольным моноклональным антителом. Все меченные флуоресцином моноклональные антитела получили от Becton Dickinson (San Jose, CA), за исключением анти-CDw124, который получили от Pharmingen, San Diego, CA. Инкубирование проводили при 4°C в темноте в течение 45 минут, используя насыщающие концентрации моноклональных антител. Невключенную метку удалили путем промывания в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) перед началом анализа с использованием проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson).

Антигенную плотность косвенно определили в открытых живых Т-клетках CD4 $^+$ и выразили как средний канал флуоресценции (СКФ) (MCF). Поверхностную экспрессию специфического антигена (CDw124, CD25) представили как смещение среднего канала (ССК) (MCS), полученное путем вычитания среднего значения канала флуоресценции клеток, окрашенных ФИТЦ- или РЕ-меченными изотонически сходными (IgG1) контрольными mAb, из среднего канала флуоресценции клеток, окрашенных ФИТЦ- или РЕ-меченными антиген-специфическими mAb. Иначе, поверхностную экспрессию субпопуляции CD4 $^+$ клеток, окрашенных моноклональным антителом CD28, определили путем вычитания среднего значения канала флуоресценции клеток CD28 $^+$ CD4 $^+$ из среднего значения канала флуоресценции клеток CD28 $^-$ CD4 $^+$.

Жизнеспособность контрольных необработанных клеток и клеток, обработанных рибавирином и α -интерфероном, определили в каждой серии опытов всех олигонуклеотидов у многочисленных доноров путем окрашивания витальным красителем, пропидиум йодидом (окончательная концентрация 5мг/мл). Процентное соотношение живых клеток, которые исключили пропидиум йодид, определили путем проточной цитометрии. Оно составляло $> 90\%$ (от 90 до 99%) после обработки всеми используемыми концентрациями.

Иммунофлуоресцентный анализ внутриклеточной экспрессии цитокинов

Для анализа внутриклеточной экспрессии IL-2 в Т-клеточных субпопуляциях CD4 $^+$ и CD8 $^+$, Т-клетки первоначально обрабатывали в течение последних 4 часов 48 - 72 часовой активации 10мг Brefeldin A (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) для того, чтобы минимизировать секрецию недавно синтезированного IL-2 во внеклеточную среду. После активации 900мл клеточного супернатанта с каждого микропланшета переместили на другой микропланшет для анализа производства производных от клеток цитокинов. Перед прямым окрашиванием (30 минут, 4°C , в темноте) ФИТЦ-меченными антителами для клеточных поверхностных антигенов CD4 и CD8, клетки дважды промыли в изотоническом солевом растворе, pH7,4, и вновь суспендировали в 100 - 150мл окрашивающего буфера (забуференного фосфатом физиологического раствора (3ФР) (PBS), pH7,4, содержащего 1%-ную фетальную телячью сыворотку (Hyclone, Logan, UT) и 0,1% азид натрия), и расщепили на 2 образца. Окрашенные клетки промыли в 1мл окрашивающего буфера, а дебрис клеток суспендировали в 100мл буфера фиксации (4%-

ный параформальдегид в 3ФР) после аспирации супернатанта. Фиксированные клетки в течение 20 минут содержали при 4°C, затем промыли в 1мл окрашивающего буфера, и дебрис клеток суспендировали, смешав с 50мл буфера проницаемости (0,1%-ный сапонин (ICN, Costa Mesa, CA) в 3ФР). Пермеабиллизированные клетки окрашивали PE-меченным антителом IL-2 в течение 30 минут при 4°C в темноте, а затем промыли в 1мл буфера проницаемости, вновь суспендировали в 250мл окрашивающего буфера перед началом анализа с использованием клеточного сканера с возбуждением флуоресценции.

Анализ мРНК цитокинов

Всю РНК экстрагировали из оставшихся Т-клеток и из необработанных активированных Т-клеток и активированных Т-клеток, обработанных рибавирином и α -интерфероном, с использованием коммерческого варианта методики экстрагирования гуанидин тиоцианата / фенола (реагент Trizol (GIBCO / BRL)). РНК промыли 70%-ным этанолом и, наконец, суспендировали в 10мкл воды, обработанной DEPC.

Реакцию синтеза кДНК проводили согласно инструкциям производителей (Promega, Madison, WI). Вкратце, 1мкг всей РНК нагревали при 65°C в течение 10 минут и охлаждали на льду перед соединением с 2мкл буфера обратной транскрипции 10X (100мМ Трис HCl (pH8,8), 500мМ KCl, 1%-ный Тритон X-100), 5мМ $MgCl_2$, 2мкл 10мМ dNTP (1мМ каждый dNTP), 0,5мкл ингибитора рибонуклеазы, 1мкл олиго (dT)₁₅ праймера (0,5мкг/мкг РНК) и 0,65мкл обратной транскриптазы AMV (H₂O). Продукт реакции инкубировали при 42°C в течение 1 часа, затем при 95°C в течение 10 минут, а затем на 5 минут поместили на лед.

ПЦР выполняли с использованием набора GeneAmp для ПЦР (Perkin-Elmer Cetus, Foster City, CA). В неиспользованной пробирке смесь для RT-реакции (3мкл) соединили с 5мкл 10X буфера ПЦР (500мМ KCl, 100мМ Трис-HCl, pH8,3, 15мМ $MgCl_2$ и 0,01% (% отношение вес/объем) желатин), 1мкл 10мМ dNTP и 1ед полимеразы Taq ДНК. Использовали следующие праймеры: праймеры интерлейкина-2, интерлейкина-4, праймеры γ -интерферона (человека) (Stratagene, La Jolla, CA) и рибосомный ген рНЕ7. Условия, при которых осуществляли амплификацию, были следующими: 45 секунд при 94°C, 1 минута при 57°C и 2 минуты при 72°C для 35 циклов, и затем 8 минут при 72°C. Продукты ПЦР анализировали на 2% агарозном геле, содержащем этид бромид. После электрофореза продукты ПЦР перенесли на мембрану Hybond N+ (Amersham, Arlington Heights, IL) в 20X SSC на всю ночь, и иммобилизовали с использованием 0,4М NaOH. Блоты гибридизировали с пробами ³²P- γ ATP меченных олигонуклеотидов в буфере Rapid-hyb (Amersham) в течение 1 часа при 42°C. Каждую смесь праймеров цитокинов использовали в качестве пробы, меченной радиоактивным изотопом (согласно инструкциям). Эквивалентную нагрузку определили после гибридизации с пробой, генерируемой из смыслового праймера рНЕ7. Затем промытые блоты анализировали с использованием PhosphorImager.

Воздействие рибавирина на внеклеточные

уровни цитокинов в активированных Т-клетках

Обработка ФМА / иономицином (48 - 72 часа) Т-клеток человека существенно увеличивает уровни всех анализируемых цитокинов, а именно IL-2, IL-4, TNF α , γ -интерферона (Таблица 2). Первое число в каждой клетке описывает среднее арифметическое значение, а числа в круглых скобках описывают релевантные диапазоны. N = 4. В демонстрационном эксперименте на Фиг. 1 рибавирин, добавленный в диапазоне доз 0,5 - 50мМ, увеличил активированные уровни цитокинов Th1, IL-2 и TNF α максимально при 5мМ (30%) и 20мМ (36%), соответственно. Напротив, α -интерферон ингибировал экспрессию IL-2 и TNF α , в зависимости от дозы (диапазон 250 - 10000МЕ/мл, максимальное ингибирование 33 и 38%, соответственно), при сравнении с уровнями в необработанных активированных Т-клетках. Кроме того, рибавирин служил промежуточным звеном в сопутствующем снижении активированных уровней цитокина Th2, IL-4 (пиковое ингибирование 74% при 2мМ), в то время как α -интерферон максимально увеличил внеклеточный IL-4 на 26% (10000МЕ/мл). Используя комбинации рибавирина и α -интерферона, Фигура 2 демонстрирует, что постоянное количество 2000МЕ/мл α -интерферона подавляет рост уровней активированного IL-2 (A), обусловленный рибавирином, и реверсирует ингибирование уровней активированного IL-4 (C). Подобным же образом, постоянное количество 10мМ рибавирина реверсировало, в зависимости от дозы, ингибирование уровней активированного IL-2 (B), обусловленное α -интерфероном, и тормозило рост уровней активированного IL-4 (D).

Воздействие рибавирина на уровни мРНК цитокинов в активированных Т-клетках

Это противоположное воздействие рибавирина и α -интерферона на уровни активированных внеклеточных цитокинов также наблюдали на уровне транскрипции. Фигура 3 демонстрирует, что обработка ФМА / иономицином Т-клеток человека существенно увеличивает уровни IL-2, IL-4 и мРНК γ -интерферона. Обработка рибавирином (2, 5 и 10мМ) после активации Т-клеток увеличивает IL-2, уменьшает IL-4 и не оказывает никакого влияния на мРНК γ -интерферона. Напротив, α -интерферон при 1000, 2000 и 5000МЕ/мл уменьшает IL-2, увеличивает IL-4 и уменьшает мРНК γ -интерферона. Поэтому, влияние рибавирина и интерферона, в зависимости от дозы, на экспрессию IL-2, TNF α и мРНК IL-4 соответствует анализу, в котором используется набор ELISA. Эти данные позволяют предположить, что рибавирин стимулирует синтез цитокинов Th1, IL-2 и TNF α и ингибирует экспрессию цитокина Th2, IL-4 в активированных Т-клетках человека.

Воздействие рибавирина на уровни рецепторов IL-2 и IL-4 в активированных Т-клетках

Используя анализ на основе клеточного сканера с возбуждением флуоресценции, мы сравнили воздействие рибавирина и α -интерферона на экспрессию IL-2 (CD25) и экспрессию рецепторов IL-4 (CDw124) в активированных Т-клетках. Обработка ФМА / иономицином усиливает экспрессию

CD25 и CDw124 с остаточных уровней $50,16 \pm 0,45$ и $62,31 \pm 1,46$ к активированным уровням $162,48 \pm 2,89$ и $87,53 \pm 3,98$, соответственно ($n = 4$). Иллюстрируя результаты трех экспериментов, Фигура 4 демонстрирует, что рибавирин ($1 - 50 \text{ мМ}$) оказывает незначительное воздействие на активированные уровни рецептора IL-2 и IL-4, в то время как α -интерферон в диапазоне доз $250 - 10000 \text{ МЕ/мл}$, уменьшает экспрессию рецептора IL-2 и усиливает экспрессию рецептора IL-4, в зависимости от дозы, во время сравнения с уровнями рецепторов в контрольных активированных Т-клетках. Поэтому, эти данные демонстрируют, что воздействие рибавирина на синтез цитокинов происходит независимо от экспрессии рецепторов цитокинов. Напротив, воздействие α -интерферона на рецепторы IL-2 и IL-4 коррелирует с воздействием на экспрессию активированных IL-2 и IL-4.

Воздействие рибавирина на внутриклеточные уровни IL-2 в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ активированных Т-клеток

Мы исследовали, является ли воздействие рибавирина на экспрессию IL-2 специфичным для Т-клеток CD4⁺ или CD8⁺. Экспрессию внутриклеточного IL-2 в фиксированных и пермеабиллизированных активированных Т-клетках определили путем двухцветной проточной цитометрии с использованием меченных флуоресцином антител для CD4 или CD8 и для IL-2. Фигура 5 демонстрирует, что после обработки рибавирином при 10 мМ , процентное соотношение Т-клеток CD4⁺, экспрессирующих IL-2, выросло с 82 до 91%, и процентное соотношение CD8⁺, экспрессирующих IL-2, выросло с 81 до 91%. Напротив, процентное соотношение клеток CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующих IL-2, после обработки α -интерфероном (5000 МЕ/мл) было, соответственно, 81 и 71%. Эти данные позволяют предположить, что рибавирин оказывает воздействие на экспрессию внутриклеточного IL-2 и не делает различий между субпопуляциями Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Напротив, обработка α -интерфероном оказывает незначительное воздействие на Т-клетки CD4⁺ и даже уменьшает экспрессию IL-2 в популяции Т-клеток CD8⁺.

Аналоги рибавирина

Существует несколько классов аналогов рибавирина, которые, как полагают, являются эффективными в клинических условиях при модулировании Th1 или Th2 - опосредованных реакций Т-клеток. Эти аналоги включают молекулы, совпадающие с характерными формулами Фигуры 6, где X - это O, S, CH₂CHOH или N-CO-R₁₁, A, B и C - это независимо N, P, CH, C-OH, C-CH₃, C-алкил, C-алкенил, C-CH₂, -CN, C-галоген, C-CN, C-COOCH₃, C-NH₂, C-SNH₂, C-SO₂-NH₂, C-CONH₂, C-CS-NH₂, C-C(NH)NH₂, CPO₂-NH₂, или C - гетероциклическая кольцевая система, D - это S, Se, Te, PH, NH или NR₁₂, R₁ - это H, (CH₂)_p(OH), галоген, CN, (CH₂)_pONH₂, (CH₂)_pNH₂, CH₃, CH₂SPH или (CH₂) - гетероциклическое кольцо, R₂ - это H, OH, OCH₃, SH, SCH₃, галоген, CN, NH₂, ONH₂, NHCH₃, (CH₂)OH, (CH₂)_pNH₂, CH₃, или COOMe, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ - независимо H, OH, OCH₃, SH, SCH₃, галоген, CN, NH₂, ONH₂, NHCH₃, (CH₂)OH, (CH₂)_pNH₂, CH₃, COOMe или фенил, R₉ - это H, галоген, NH₂, CH₃, CONH, CSNH₂, COOMe, SNH₂,

SO₂NH₂, PO₂NH₂, (CH₂)_p, (CH₂)_p - гетероциклическая кольцевая система или (CH₂)_p-глюкоза, R₁₀ - это H, галоген, NH₂, CH₃, CONH, CSNH₂, COOMe, SNH₂, SO₂NH₂, PO₂NH₂, (CH₂)_p, (CH₂)_p - гетероциклическая кольцевая система, (CH₂)_p-глюкоза, O-CH₃, O-CH₂CH₃ или аминокислота, Y - это O, S, NH•HCl, NOH, NOCH₃ или NOCH₂PH, R₁₀ и Y в комбинации - гетероциклические кольцевые системы, такие как тиазол, имидазол и т.д., R₁₁ - это CH₃, (CH₂)_pNH₂, (CH₂)_p-гетероцикл, (CH₂)_p-аминокислота или (CH₂)_p-сахар (глюкоза и т.д.), p - это целое число между 0 и 8, описанное выше включает L и D нуклеозиды.

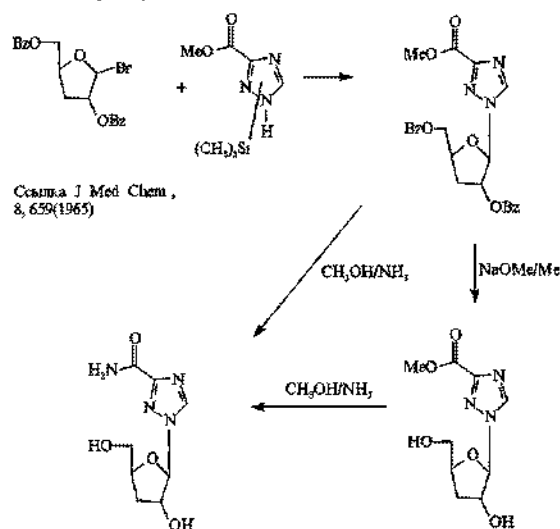
Такие молекулы можно производить согласно одной или более типовых схем, приведенных далее.

1 Синтез ICN1389 (Пиразомицин) Методика синтеза для этого соединения описана в следующих работах: (a) J Farkas, Z Flegelova and F Sorm, Tetrahedron Letts, 22, 2279 (1972), (b) S De Bernardo and M Weigele, J Org Chem, 41, 287 (1976), (c) J G Buchanan, A Stobie and R H Wightman, J Chem Soc Chem Commun, 916 (1980), N Karagin, K Takashima, T Haneda and T Kato, J Chem Soc Perkin Transl, 553 (1984).

2 Синтез ICN3438 (1-β-D-ксилофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) Синтез этого соединения выполнялся согласно процедуре, описанной в J T Witkowski, M Fuertes, P D Cook and R K Robins, J Carbohydr Nucleosides, Nucleotides 2 (1), 1 (1975).

3 Синтез ICN3844 (1(5-O-сульфамойл-β-D-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) Соединение готовили согласно процедуре, описанной в G D Kini, B M Henry, R K Robins, S B Larson, J J Marr, R L Berens, C J Bacchi, H C Nathan and S S Keithly, J Med Chem, 33, 44 (1990).

4 Синтез ICN4625 (1(3-деокси-β-D-эритропентофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) Соединение готовили с применением следующего метода синтеза.

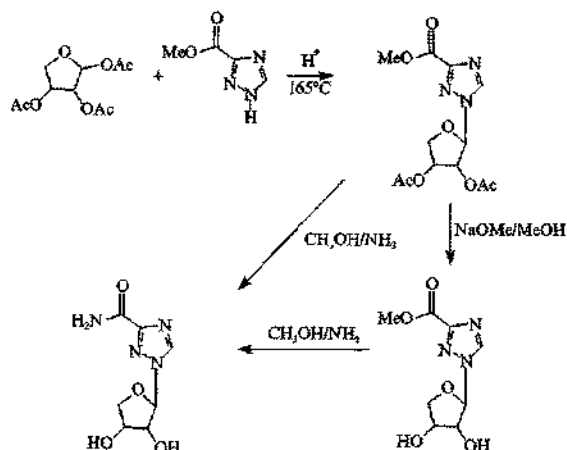


5 Синтез ICN5531 (5-амино-1-β-D-рибофуранозилпиразол-4-карбоксамид) Метод синтеза, который использовали для приготовления соединения, описан в B K Bhattacharya, R K

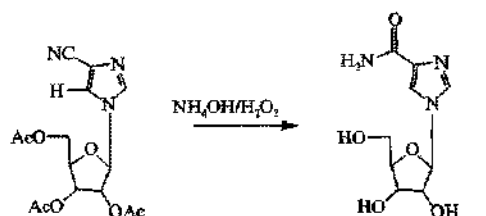
Robins and G R Revankar J Heterocyclic Chem, 21, 795 (1990)

6 Синтез ICN5676 (1-β-D-арабинофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) Синтез этого соединения осуществили с помощью процедуры, описанной в J T Witkowski, M Fuefles, P D Cook and R K Robins J Carbohydr Nucleosides, Nucleotides, 2 (1), 1 (1975))

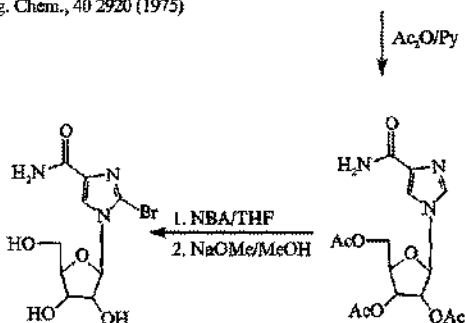
7 Синтез ICN5839 (1-β-D-эритрофуранозил-1,2,4-3-карбоксамид) Это соединение готовили с использованием последовательности синтеза, описанной ниже



8 Синтез ICN6242 (2-бromo-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид) ICN6242 готовили согласно способу, представленному ниже



Ссылка: P C Srivastava, G A Ivanovics, R J Rousseau and R K Robins, J. Org. Chem., 40 2920 (1975)

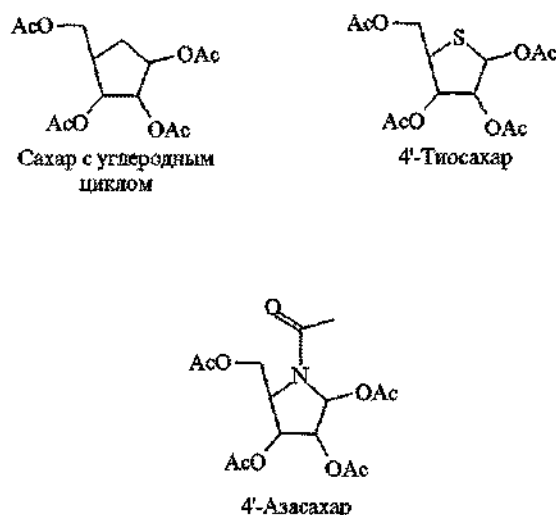


9 Синтез ICN11808 (1-β-D-рибофуранозил-пирозол-3,4-дикарбоксамид) Синтез этого соединения осуществляли согласно описанию, представленному в Y S Sanghvi, B K Bhattacharya, G D Kini, S S, Matsumoto, S B Larson, W J Jolley, R K Robins and G R Revankar, J Med Chem, 33, 336 (1990)

10 Синтез ICN12204 (2-(β-D-рибофуранозил)имидазол-5-карбоксамид) Синтез

этого соединения осуществлен согласно процедуре, описанной в J Igoleo, T H Dinh, A Keib and C Perreux, Chimie Therapeutique, 207 (1972)

Для карбоксильных 4'-тиосахар и 4'-азасахар производных аналогов рибавирина следующие сахара можно конденсировать с соответствующими гет и оциклическими соединениями и синтезировать согласно описанным выше схемам и ссылкам



1 Сахар с углеродным циклом можно приготовить согласно процедуре, описанной в M Yoshikawa, Y Yoshikawa, Y Inoue, S Yamaguchi and N Murakami, Tetrahedron, 50, 9961 (1994), L Agrofoglio, E Suhas, A Parese, R Condom, S R Challand, R A Earl and R Guedj, Tetrahedron, 50, 10611 (1994)

2 4-азасахар готовили согласно процедуре, описанной в E J Reist, D E Gueffroy and L Goodman, J Am Chem Soc, 87, 677 (1965)

3 4-тио-D-рибофуранозу готовили согласно процедуре, описанной в M Hobek and R L Whistler in "Methods in Carbohydrate Chemistry," Vol 1, 292 (1962)

Доказательство эффективности аналогов рибавирина при модулировании цитокинов Th1 и Th2 приведено на Фигуре 7 и в таблице, представленной ниже. Анализы, которые описаны здесь, включают короткий список 35 тестируемых аналогов рибавирина, все анализы проводили три раза. Вообще, видно, что тестируемые соединения делятся на три основные категории: (1) соединения, такие как ICN1369 и ICN3844, которые подавляют γ-интерферон, IL-2, IL-4, IL-5 и TNFα, (2) соединения, такие как рибавирин, которые усиливают IL-2 и TNFα и подавляют IL-4 и IL-5, и (3) соединения, такие как ICN6242, ICN3839 и ICN3531, которые усиливают IL-2 и γ-интерферон и подавляют IL-4 и IL-5. Такой список видов активности позволяет определить, в какой модуляции цитокина произойдет соответствующая иммунная реакция.

Таблица 2

Концентрация клеток на лунку $2 \times 10^6 \times 24 = 48 \times 10^6$ в 48мл (полный объем каждой лунки 2000мкл)

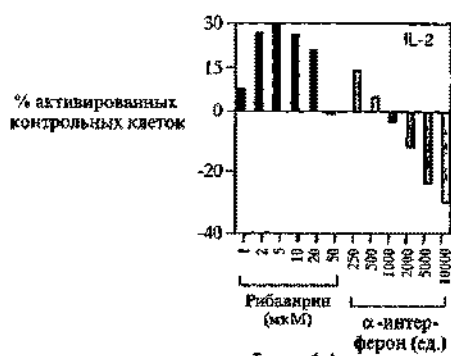
	1	2	3	4	5	6
A	Среды	ФМА ICN	ФМА ICN	ФМА ICN 10мкМ 1369	ФМА ICN 5мкМ 1369	ФМА ICN 2мкМ 1369
B	ФМА ICN 10мкМ 3438	ФМА ICN 5мкМ 3438	ФМА ICN 2мкМ 3438	ФМА ICN 10мкМ 3844	ФМА ICN 5мкМ 3844	ФМА ICN 2мкМ 3844
C	ФМА ICN 10мкМ 4625	ФМА ICN 5мкМ 4625	ФМА ICN 2мкМ 4625	ФМА ICN 10мкМ 5531	ФМА ICN 5мкМ 5531	ФМА ICN 2мкМ 5531
D	ФМА ICN 10мкМ 5676	ФМА ICN 5мкМ 5676	ФМА ICN 2мкМ 5676	ФМА ICN 10мкМ 5839	ФМА ICN 5мкМ 5839	ФМА ICN 2мкМ 5839

Концентрация клеток на лунку $2 \times 10^6 \times 24 = 48 \times 10^6$ в 48мл (полный объем каждой лунки 2000мкл)

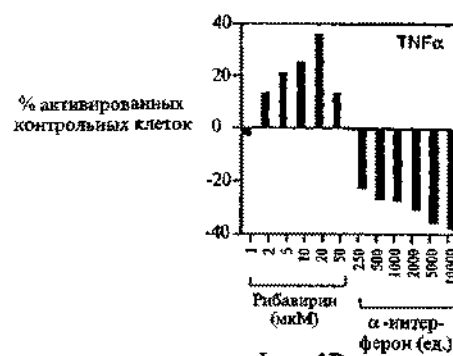
	1	2	3	4	5	6
A	ФМА ICN 10мкМ 6242	ФМА ICN 5мкМ 6242	ФМА ICN 2мкМ 6242	ФМА ICN 10мкМ 11808	ФМА ICN 5мкМ 11808	ФМА ICN 2мкМ 11808
A	ФМА ICN 10мкМ 12204	ФМА ICN 5мкМ 12204	ФМА ICN 2мкМ 12204	ФМА ICN 10мкМ RIB	ФМА ICN 5мкМ RIB	ФМА ICN 2мкМ RIB

Итак, мы продемонстрировали эффективность рибавирина и аналогов рибавирина в модифицировании экспрессии лимфокинов в активированных Т-клетках. Несмотря на специфические варианты осуществления и применения настоящего изобретения, для специалистов в этой обла-

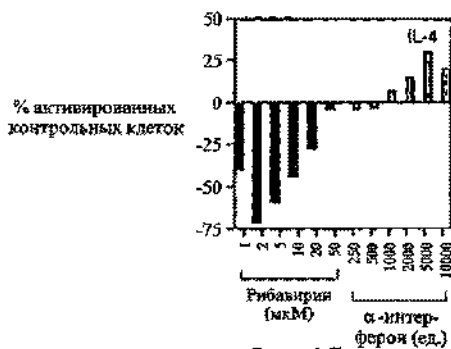
сти станет очевидной возможность различных модификаций, не отходящих от концепций настоящего изобретения. Поэтому изобретение не ограничивается, кроме как в духе прилагаемой формулой изобретения.



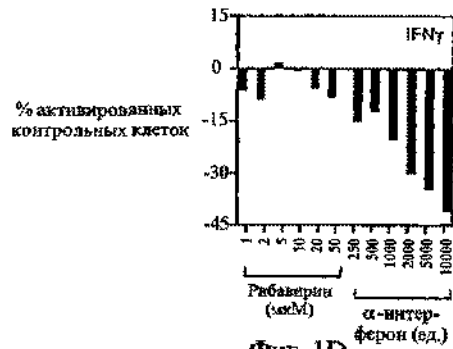
Фиг. 1А



Фиг. 1В

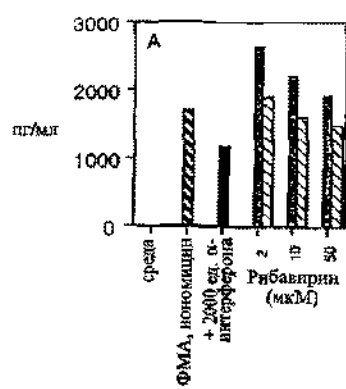


Фиг. 1С

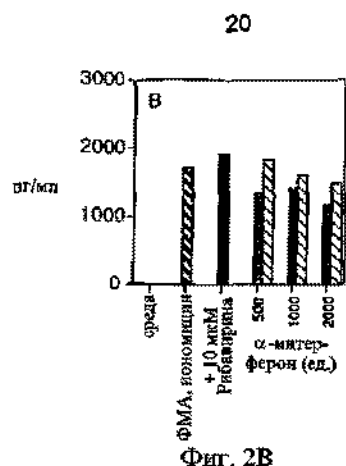


Фиг. 1D

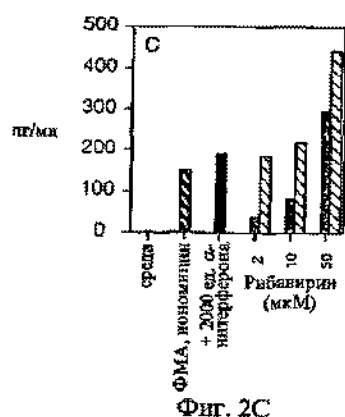
Фиг. 1



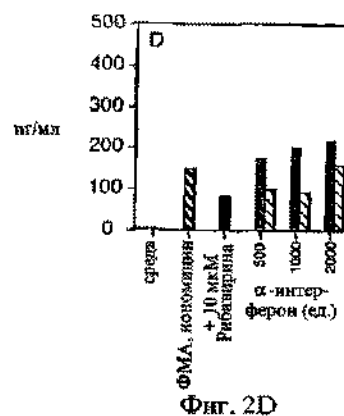
Фиг. 2А



Фиг. 2В

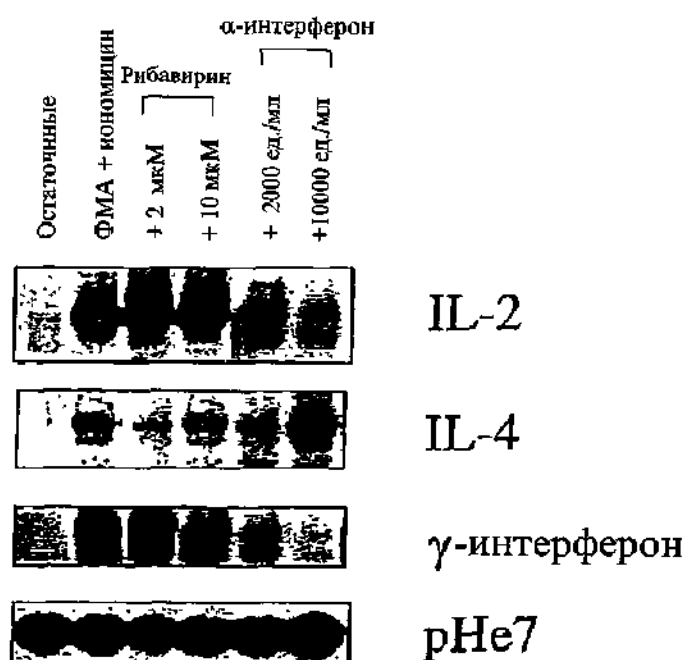


Фиг. 2С

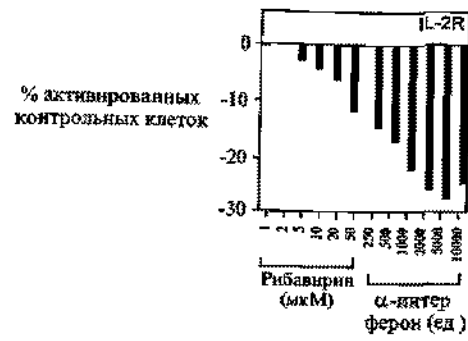


Фиг. 2Д

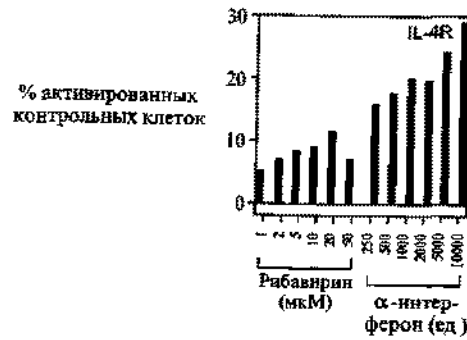
Фиг. 2



Фиг. 3

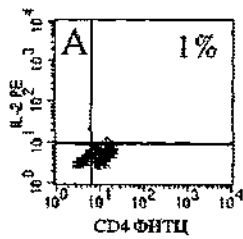


Фиг. 4А

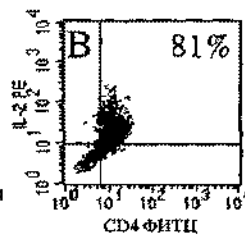


Фиг. 4В

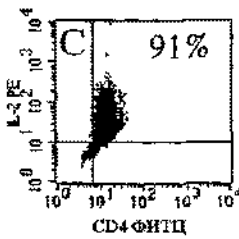
Фиг. 4



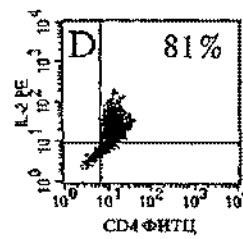
Фиг. 5А



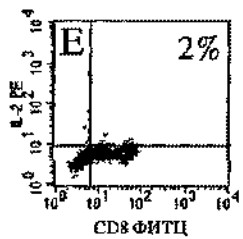
Фиг. 5В



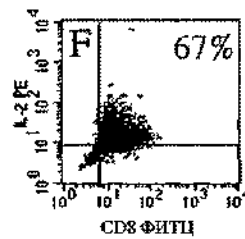
Фиг. 5С



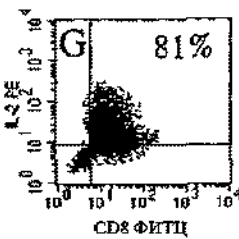
Фиг. 5Д



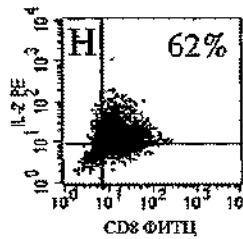
Фиг. 5Е



Фиг. 5Ф

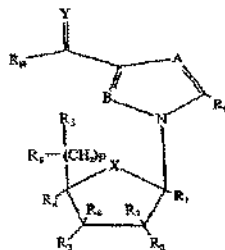
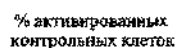


Фиг. 5Г

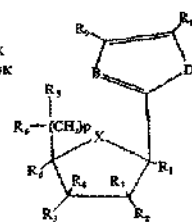
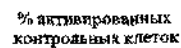


Фиг. 5Н

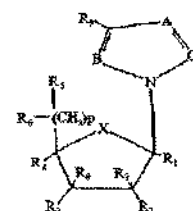
Фиг. 5



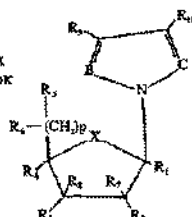
Фиг. 6А



ΦΕΥ. 6B

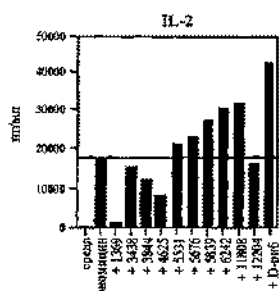


Фиг. 6С

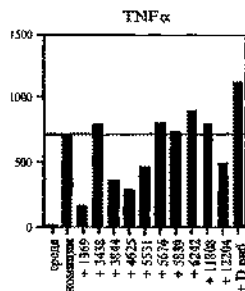


ΦΡΓ. 6D

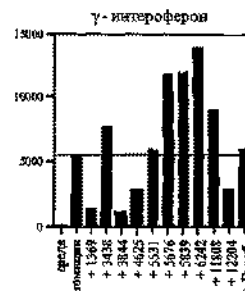
Фиг. 6



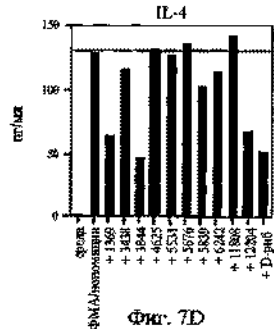
Фиг. 7А



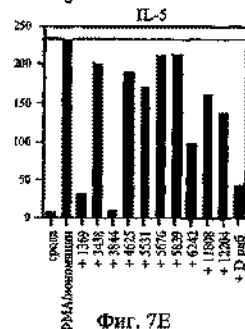
Фиг. 7В



Фиг. 7С



ΦΜΕ. 7D



Фиг. 7Е

Фиг. 7

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна
(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71