



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105324** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**G01N 21/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2015 09727</b>	(72) Винахідник(и): <b>Волянський Андрій Юрійович (UA), Смілянська Майя Володимирівна (UA), Перемот Світлана Дмитрівна (UA), Кашпур Наталія Валеріївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>07.10.2015</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.03.2016</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.03.2016, Бюл.№ 5</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІМФОЦИТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ БІОАНАЛІЗАТОРА AGILENT 2100

### (57) Реферат:

Спосіб оцінки функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 включає забір крові, вилучення лімфоцитів, розведення клітин у живильному ростовому середовищі, розподіл отриманої культури на два зразки, стимулювання одного зразка антигенами або мітогенами, інкубацію зразків, визначення ступеня реакції бластної трансформації лімфоцитів. Інкубацію проводять протягом 15-18 годин, обробляють зразки моноклональними антитілами до білка бромдеоксирідину (BrdU) S-періоду клітинного мітотичного циклу, визначають ступінь функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100.

UA 105324 U



Корисна модель належить до галузі медицини і біології, а саме до імунологічних методів дослідження і стосується визначення імунореактивності лімфоцитів за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) до S-фази мітозу. Цей метод має використовуватися для оцінки функціональної активності лімфоцитів *in vitro* за допомогою реакції бластної трансформації лімфоцитів з використанням біоаналізатора Agilent 2100, шляхом реєстрації ранньої деконденсації одноланцюгових активних ділянок ДНК.

Одним з класичних методів вивчення функціональної активності лімфоцитів є реакція бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ). Перехід лімфоцитів із спокійного стану в бластні форми, здатні до проліферації і подальшого диференціювання, називають бласттрансформацією. Цей процес супроводжується морфологічними змінами лімфоцитів: збільшенням їх розмірів, кількості мітохондрій, рибосом. Під час трансформації у бласти в лімфоцитах відбувається інтенсивний синтез білка, РНК та ДНК. РБТЛ може бути зумовлена специфічними та неспецифічними стимуляторами (мітогенами). Неспецифічним мітогеном рослинного походження є фітогемаглютинін (ФГА), який отримують із насіння квасолі. Специфічними мітогенами є розчинні та корпускулярні антигени, які діють на Т-лімфоцити.

Відомий спосіб оцінки РБТЛ у культурі клітин за морфологічними ознаками (Чернушенко Е. Ф. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения. Метод, рекомендации - Киев, 1988-18 с. - С. 10-11), який включає: взяття крові, вилучення лімфоцитів із крові, постановку культури клітин, розподіл отриманої культури на два зразки, стимулювання одного зразка антигенами або мітогенами з інкубацією протягом 72 годин при температурі  $37 \pm 0,5$  °C, приготування мазків на предметному склі, фарбування їх за методикою Гімза, вивчення під світловим мікроскопом морфології 300 лімфоцитів, прямим підрахунком бластів і визначенням ступеню РБТЛ за відсотком трансформованих (бластних клітин та мітозів).

Недоліками способу є низька точність результатів. Причинами, що перешкоджають досягненню результату, є: тривалий термін культивування для виявлення морфологічно різних ознак РБТЛ, що збільшує термін аналізу в цілому, а також сприяє появі культуральних артефактів (апоптотична загибель клітин, вторинні мітози); значний суб'єктивізм при диференціюванні нетрансформованих (середніх та великих лімфоцитів) від трансформованих, особливо малих бластів, що потребує високої кваліфікації гематолога-імунолога; недостатня кількість клітин, які вивчаються, обмежена фізичними можливостями дослідника, що зменшує репрезентативність вибірки, а отже, і точність визначення; нерівномірний розподіл клітин у мазку (бластні клітини розташовуються переважно по краях препарату) - знижує об'єктивність дослідження.

Ще одним з відомих способів є спосіб визначення РБТЛ радіометричним методом за включенням клітиною радіометричної мітки  $H_3$  - тимідину (Current Protocols in Immunology. Ред. Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M., Strober W. John Wiley & Sons; 2003; ISBN: 0471522767). Який включає: взяття крові, вилучення лімфоцитів, їх культивування, розподіл отриманої культури на два зразки, стимулювання одного зразка антигенами або мітогенами з інкубацією зразків при температурі  $37 \pm 0,5$  °C протягом 48-72 годин, додавання до них  $H_3$  - тимідину за 4 години до кінця культивування, вилучення ДНК з клітин на фільтрі та визначення ступеню РБТЛ за рівнем радіації на сцинтиляційному лічильнику по відношенню числа розпадів у стимульованій та нестимульованій культурах.

Недоліками способу є недостатня експресність та точність результатів, а також його недоступність для більшості імунологічних лабораторій. Причинами, що перешкоджають досягненню результату, є: тривалий термін культивування (48-72 години), що призводить до накопичення артефактів; додавання в культуру  $H_3$  - тимідину за 4 години до кінця інкубування призводить до його включення тільки в ті популяції трансформованих клітин, які знаходяться в даному проміжку часу в S - періоді мітотичного циклу; неоднакові за якістю та терміном зберігання серії ізотопу  $H_3$  - тимідину, сцинтиляційної рідини, що знижують достовірність результатів радіометричного способу; необхідність забезпечення радіонуклідного захисту в лабораторії та висока вартість радіометричних лічильників - все це ускладнює доступність даного способу в експериментальній та клінічній імунології.

Відомий спосіб оцінки проліферативної відповіді шляхом визначення включень бромодезоксиуридину (BrdU) в ДНК за допомогою методу ELISA (Tsehaynesh Messele, Marijke T. L. Roos, Dorte Hamann, Maarten Koot, Amaud L. Fontanet, Frank Miedema, Peter T. A. Schellekens, and Tobias F. Rinke de Wit. Nonradioactive Techniques for Measurement of In Vitro T-Cell Proliferation: Alternatives to the  $[^3H]$ Thymidine Incorporation Assay. Clin Diagn Lab Immunol. 2000 July; 7(4): 687-692.). Однак цей метод має недостатньо високе співвідношення сигнал-шум

(близько 10:1) та його чутливість обмежена межами визначення оптичної щільності при довжині хвилі 450 нм (від 0.0 до 3.0).

За допомогою методу Вестерн-блот було показано, що рівень мРНК гена топоізомерази II альфа (*tpa*) і гена-контролера клітинного циклу 2 (*cdc2*) змінюється протягом клітинного циклу, причому рівень мРНК цих генів зростає або безпосередньо (*cdc2*) (Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. Dynamics of human DNA topoisomerases II alpha and II beta in living cells. *J Cell Biol.* 2002 Apr 1; 157(1): 31-44.), або відразу після мітозу (*tpa*) (Goswami PC, Roti Roti JL, Hunt CR. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr; 16(4): 1500-1508.). Таким чином, можна визначати ступінь проліферативної відповіді клітин за допомогою методу Вестерн-блот, але цей метод вимагає гібридизації з радіоактивно міченою пробою. Крім того, рівень експресії мРНК гена топоізомерази II альфа оцінювали в клітинах, що діляться і не діляться, за допомогою методу захисту від рибонуклеаз (ribonuclease protection assay) (Isaacs RJ, Harris AL, Hickson ID. Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence-arrested cells. *J Biol Chem.* 1996 Jul 12; 271(28): 16741-16747.). За допомогою цього методу теж можна оцінювати ступінь проліферації клітин, однак він також вимагає гібридизації з радіоактивно міченою пробою.

Існує спосіб оцінки ступеня стимуляції лімфоцитів за допомогою проточної цитометрії шляхом вимірювання рівня експресії специфічних маркерних молекул на поверхні клітин. Наприклад, при стимуляції певних CD-маркерів моноклональними антитілами зростає експресія CD38 на поверхні лімфоцитів, і збільшення кількості CD38 визначали за допомогою проточної цитометрії. Проте в даному методі підвищення експресії маркерних молекул на поверхні клітин не завжди збігається з їх проліферацією, і частіше залежить від віку та стану здоров'я організму.

Ще одним способом є оцінка ступеня РБТЛ за допомогою маркерних генів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі (RU 2492244 Спосіб оцінки ступеня проліферації кліток с помощью маркерных генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ребриков Д. В., Трофимов Д. Ю.), що включає процедуру взяття крові, виділення і культивування лімфоцитів з подальшим їх підрахунком, розведення клітин у живильному середовищі, та внесення в лузи планшета отриманої суспензії клітин, додавання в частину луз мітогенів, інкубацію вмісту луз, лізис клітин і виділення нуклеїнових кислот, постановку реакції зворотної транскрипції з використанням специфічних праймерів для генів *tpa* і *cdc2*. Ступінь РБТЛ виражається в індексі проліферації, який представляє собою число, що показує у скільки разів збільшується кількість мРНК гена *tpa* та/або *cdc2* в процесі культивування лімфоцитів з/без додавання ФГА в порівнянні з кількістю мРНК цих генів в свіжевиділених лімфоцитах крові здорового донора.

Недоліками способу є: тривалий термін культивування - до 5 діб, що призводить до накопичення артефактів; багатостадійність та тривала пробопідготовка (лізис клітин і отримання нуклеїнових кислот за допомогою набору для виділення РНК і ДНК, проведення реакції зворотної транскрипції, проведення ПЛР "в реальному часі", визначення рівня експресії мРНК *tpa* щодо ДНК гена *ghr*), що не завжди можливо в клінічних імунологічних лабораторіях.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб оцінки РБТЛ у культурі клітин, винахідниками якого є Фролов О. К., Федотов Є. Р. [Патент № 48845 А, Спосіб оцінки реакції бластної трансформації лімфоцитів у культурі клітин. бюл. № 8, 2002]. Суттєвими ознаками запропонованого рішення є збір крові, вилучення лімфоцитів із крові, постановка добової культури лімфоцитів, розподіл отриманої культури на два зразки, стимулювання одного зразка мітогенами або антигенами, інкубація зразків в термостаті в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, в атмосфері насиченої водяної пари, протягом 24-48 годин, приготування адгезивних відбитків, їх фіксація з подальшим флуорохромуванням акридиноним-помаранчевим, опромінення в ультрафіолетовому спектрі, визначення інтенсивності люмінесценції в умовних одиницях при довжині хвилі 640 нм, вирахування індексу стимулювання за формулою.

Ознаками, спільними з корисною моделлю, що заявляється, є збір крові, вилучення лімфоцитів із крові, розподіл розведеної культури клітин у живильному ростовому середовищі на два зразки, стимулювання одного зразка антигенами або мітогенами, інкубація при температурі 37±0,5 °С, приготування препаратів, їх фарбування та визначення ступеню РБТЛ.

Недоліками способу є: додавання акридинового - помаранчевого, який є мутагеном; визначення інтенсивності люмінесценції на ФМЕЛ-1 в умовних одиницях (у. о.) при довжині хвилі 640 нм, що потребує допоміжного обладнання; вирахування індексу стимулювання за формулою, що призводить до втрати часу; вимагає довготривалого зорового навантаження та передбачає велику ймовірність суб'єктивних помилок.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб оцінки РБТЛ, який шляхом визначення ранньої деконденсації одноланцюгових активних ділянок ДНК та синтезу одноланцюгових РІЖ за допомогою біоаналізатора Agilent 2100 та МКАТ до бромдеоксіурідину (BrdU) дозволяє підвищити оперативність, точність, об'єктивність та доступність способу.

5 Сутність способу полягає в наступному:

- взяття венозної крові в вакутейнер з антикоагулянтном (BD Vacutainer, sodium heparin);
- вилучення клітин моноклеарної фракції на градієнті щільності фіколла (фіколла або фіколла-верографін з щільністю 1,077 г/мл) як описано за стандартною методикою;
- підрахунок клітин, забарвлених трипановим синім, в камері Горяєва на інвертованому мікроскопі або в гематиметрії;
- розведення клітин у живильному ростовому середовищі до концентрації 1 млн / мл;
- розділення кожної культури на два зразки;
- стимуляція одного зразка мітогеном в необхідній концентрації (у разі використання мітогена ФГА, його концентрація становить 2,5-5,0 мкг/мл середовища з клітинами);
- 15 - інкубація культури в термостаті в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, в атмосфері насиченої водяної пари, протягом 15-18 годин;
- обробка зразків моноклональними антитілами до білку S-періоду клітинного мітотичного циклу - бромдеоксіурідин (BrdU) Antibody (3H579) концентрацією 100 мг/мл (Santa Cruz Biotechnology);
- 20 - підготовка зразків з використанням стандартного набору реактивів Cell fluorescence kit, з використанням мікрочипу та подальший аналіз РБТЛ за допомогою програмного пакету біоаналізатора Agilent 2100.

Відмінними від прототипу ознаками є відсутність необхідності культивування протягом 24 годин культури лімфоцитів, зменшення тривалості інкубації з мітогеном до 15-18 годин, обробка зразків моноклональними антитілами до BrdU, використання біоаналізатора Agilent 2100 та автоматичний облік реакції.

Відомо, що в ядрі лімфоцитів у перші хвилини після їх стимулювання мітогенами або антигенами відбуваються зміни третичної структури дезоксирибонуклеїнових кислот (ДНК) (Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки - М Наука, 1978-209с - С-83) Ці зміни супроводжуються конденсацією одних та деконденсуванням інших ділянок ДНК. Деконденсування ДНК супроводжується активуванням білок-синтетичної системи клітин розходженням 2-х ланцюгів ДНК один від одного на ділянці активних генів і на одній з них починається синтез (транскрипція) одноланцюгових рибонуклеїнових кислот (РНК) рибосомальних (р), транспортних (т), інформаційних (і). Всі види РНК (р, т, і) в подальшому виходять із ядра в цитоплазму і беруть участь у синтезі білка (трансляція). Розгортання білок-синтетичної системи лімфоциту у вигляді морфологічно ще нерозрізної реакції бластної трансформації починається в перші години після стимулювання лімфоцитів і вже через 15-18 годин настає S-період мітотичного циклу, коли відбувається редуплікація ДНК і підготовка клітини до мітозу (Козинец Г.И., Котельников В.М, Гольдберг В.Е. Цитофотометрия гемопозитических клеток - Томск, 1986, - 215с. - С. 78)

Таким чином, запропонований спосіб дозволяє об'єктивно реєструвати ранню деконденсацію одноланцюгових активних ділянок ДНК за допомогою моноклональних антитіл до білка S-періоду клітинного мітотичного циклу - бромдеоксіурідину. Аналог тимідину - бромдеоксіурідин (BrdU), вбудовується до синтезованих ДНК клітин в S-період і може використовуватися в якості маркера реакції для оцінки фракцій клітин, що знаходяться у S-періоді мітотичного циклу. До того ж, аналіз за допомогою бромдеоксіурідину - надійний метод для підрахунку рівня синтезу ДНК.

Використання біоаналізатора Agilent 2100 дозволяє істотно скоротити час обробки результатів РБТЛ, оскільки, одночасно проходить аналіз шести проб об'ємом 10 мкл кожна, в яких міститься по 20 000 забарвлених клітин. Мінімізація зразків для проточно-цитометричного аналізу (від 20 000 до 2500 клітин) дозволяє не проводити добове культивування вилучених лімфоцитів. Процес аналізу значно прискорюється ще й завдяки технології фарбування безпосередньо на чипі. Вимірювання інтенсивності флуоресценції проводиться протягом 25 хвилин у двох каналах (приблизно 750 одиничних клітин на пробу) за допомогою флуоресцентного детектора, що реєструє флуоресценцію в межах 670 та 700 нм. Висока чутливість детектування досліджених зразків забезпечується оптичною системою приладу, що автоматично фокусується, з використанням лазерів червоного (685-722 нм) і синього кольору (470-485 нм). Роздільна здатність оптичного механізму: 0,8 мікрона за один дискретний крок, сканування діапазону по горизонталі (тобто уздовж каналу): + 0,5 мікрона, сканування діапазону по вертикалі (тобто при переході з каналу на канал): + 0,25 мікрона, що дозволяє отримувати

надточні результати. Комп'ютерне програмне забезпечення є потужним інструментом для аналізу даних, отриманих на біоаналізаторі, автоматична обробка, точний якісний і кількісний аналіз зразків дозволяють виключити суб'єктивізм в оцінці результатів.

Спосіб здійснюють таким чином. Проводять збір венозної крові в вакутейнер з гепарином натрію (BD Vacutainer, sodium heparin). З отриманої крові вилучають клітини моноклеарної фракції на градієнті щільності фіколл (фіколл або фіколл-верографін з щільністю 1,077 г/мл), як описано за стандартною методикою. Проводять розведення клітин у живильному ростовому середовищі до концентрації 1 млн/мл, а потім ділять кожну культуру на два зразки. Один із зразків стимулюють мітогеном в необхідній концентрації (у разі використання мітогена ФГА, його концентрація становить 2,5-5,0 мкг/мл середовища з клітинами). Культури інкубують в термостаті в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, в атмосфері насиченої водяної пари, протягом 15-18 годин. Проводять обробку зразків моноклональними антитілами до білку S-періоду клітинного мітотичного циклу - BrdU Antibody (3H579) концентрацією 100 мг/мл (Santa Cruz Biotechnology). Відбувається підготовка зразків та мікрочипа з використанням стандартного набору реактивів Cell Kit. Розпочинається аналіз РБТЛ за допомогою програмного пакету біоаналізатора Agilent 2100.

В результаті аналізу ми отримуємо числові данні загальної кількості клітин та відсоток баластних форм у зразку, гістограми та крапкові діаграми результатів. Запропонований спосіб дозволяє об'єктивно реєструвати ступінь проліферації клітин у стимульованому та нестимульованому зразках за допомогою моноклональних антитіл до білка S-періоду клітинного мітотичного циклу BrdU, що, у порівнянні з прототипом, значно скорочує термін інкубації культури - з 48 годин до 15-18 годин. Мінімальне використання зразків - від 20 000 до 2500 клітин. Технологія фарбування зразків безпосередньо на чипі дозволяє уникнути контакту з отруйними фарбниками. За об'єктивністю та точністю запропонований спосіб перевищує прототип, завдяки здатності оптичної системи біоаналізатора Agilent 2100 до автоматично фокусування, високочутливої автоматичної обробки, яка забезпечує точний якісний і кількісний аналіз зразків. Вимірювання інтенсивності флуоресценції на біоаналізаторі відбувається протягом 25 хвилин, що дозволяє значно підвищити оперативність визначення ступеня РБТЛ.

Приклад 1. Порівняльні критерії визначення результатів реакції бласттрансформації лімфоцитів різних методів обліку, а саме - морфологічним методом, за прототипом та запропонованим способом. Результати наведені у табл. 1.

Таблиця 1

Показники реакції бласттрансформації лімфоцитів з використанням різних методів обліку реакції (X ± m)

Метод обліку результатів РБТЛ	Кількість бласттрансформованих лімфоцитів (%)		Час проведення
	Спонтанний рівень	Індукований ФГА	
Морфологічний	6,20±0,98	64,26±3,08	5 діб
Прототип	7,79±1,92	79,20±5,84	3 доби
Agilent 2100	7,85±1,87	77,37±5,07	15-18 годин

Як видно з даних таблиці, статистичних розбіжностей результатів РБТЛ з використанням різних методів не відмічається.

Приклад 2. Використання запропонованого методу обліку результатів РБТЛ з використанням моноклональний антитіл BrdU та Agilent 2100 у хворих з різною патологією. Група 1 - особи з захворюваннями шлунково-кишкового тракту, група 2 - хворі на atopічний дерматит, група 3 - хворі на ревматоїдний артрит, група 4 - хворі на аутоімунний тиреоїдит, група 5 - особи з хронічною персистуючою герпесвірусною інфекцією.

Проводили збір венозної крові в вакутейнер з гепарином натрію (BD Vacutainer, sodium heparin) у 200 обстежених. З отриманої крові вилучали клітини моноклеарної фракції на градієнті щільності фіколл (фіколл-верографін з щільністю 1,077 г/мл), як описано за стандартною методикою. Проводили розведення клітин у живильному ростовому середовищі до концентрації 1 млн/мл, а потім ділили кожну культуру на два зразки. Один із зразків стимулювали мітогеном в необхідній концентрації (ФГА, у концентрації 2,5-5,0 мкг/мл середовища з клітинами). Культури інкубували в термостаті в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, в атмосфері насиченої водяної пари протягом 15-18 годин. Проводили обробку зразків моноклональними антитілами до білку S-періоду клітинного мітотичного циклу - BrdU Antibody (3H579) концентрацією 100 мг/мл (Santa Cruz Biotechnology). З використанням стандартного

набору реактивів Cell Kit готували мікрочипи та розпочинали аналіз РБТЛ за допомогою біоаналізатора Agilent 2100.

Таблиця 2

Показники реакції бласттрансформації лімфоцитів запропонованим способом ( $\bar{X} \pm m$ )

Групи хворих	РБТЛ (%)	
	Спонтанна	Стимульована ФГА
Група 1 (n=78)	7,24±0,96	66,85±2,73
Група 2 (n=46)	9,19±0,36	58,58±1,13
Група 3 (n=25)	7,45±0,56	56,81±1,40
Група 4 (n=19)	8,33±0,60	52,28±1,07
Група 5 (n=12)	6,80±0,50	49,20±2,36
Контрольна група (n=20)	6,7±0,67	64,3±1,71

- 5 Використання корисної моделі обліку результатів РБТЛ дозволяє досить швидко та достовірно отримати дані про стан функціональної активності лімфоцитів у хворих з різноманітною патологією.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб оцінки функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100, що включає забір крові, вилучення лімфоцитів, розведення клітин у живильному ростовому середовищі, розподіл отриманої культури на два зразки, стимулювання одного зразка антигенами або мітогенами, інкубацію зразків, визначення ступеня реакції бластної трансформації лімфоцитів, який **відрізняється** тим, що інкубацію проводять протягом 15-18 годин, обробляють зразки моноклональними антитілами до білка бромдеоксирідину (BrdU) S-періоду клітинного мітотичного циклу, визначають ступінь функціональної активності лімфоцитів за допомогою біоаналізатора Agilent 2100.

15

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601