

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392720 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.14

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.16

(54) ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ, ИСТОЩАЮЩИЕ ФАКТОР ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО РОСТА, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 2021-0021

(32) 2021.03.30

(33) CU

(86) PCT/CU2022/050002

(87) WO 2022/207016 2022.10.06

(71) Заявитель:

СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА
МОЛЕКУЛАР (CU)

(72) Изобретатель:

Лахе Давила Агустин Бьенвенидо,
Ледон Наранхо Нурис, Перейра Яньес
Карла, Сильва Соса Алекса, Фуэнтес
Моралес Даша, Сааведра Эрнандес
Данай, Отеро Альфаро Оскар, Суарес
Формиго Хисела Мария, Рохас
Дорантес Хертрудис, Перес Мартинес
Даяна, Гальвес Валкарсель Хесус
Рамон, Лопес Медианилла Армандо
(CU)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к областям биотехнологии и медицины. В частности, описаны терапевтические вакцинные композиции, способные вызывать аутоиммунную реакцию против гемопоэтических факторов роста, таких как G-SCF и/или GM-CSF, связанных с другими молекулами или их фрагментами путем химической конъюгации или слияния. Такие вакцинные композиции полезны для лечения воспалительных заболеваний, в частности, при которых происходит патологическое увеличение циркулирующих нейтрофилов.

A1

202392720

202392720

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579586EA/032

ВАКЦИННЫЕ КОМПОЗИЦИИ, ИСТОЩАЮЩИЕ ФАКТОР ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО РОСТА, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к областям биотехнологии и медицины. Оно, в частности, относится к вакцинным композициям, антиген которых представляет собой гемопоэтический фактор роста, который может представлять собой гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и/или гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Воспаление представляет собой сложный процесс, при котором лейкоциты и эффекторные белки плазмы рекрутируются в определенные участки ткани, вызывая локальный иммунный ответ (Newton K, Dixit VM. (2012) Cold Spring Harb Perspect Biol. 4 (3): a006049). Хотя это является эффективным способом ограничения инфекции и инициации ремоделирования тканей, его необходимо контролировать, чтобы избежать сопутствующего повреждения тканей. Короткие периоды острого воспаления позволяют сдерживать инфекцию или травму и ускорять заживление ран, но длительные периоды хронического воспаления (из-за активации продуцирующих цитокины клеток и гранулоцитов для увеличения их продукции, создавая петлю положительной обратной связи) могут вызывать локальное усиление повреждения тканей и системно регулируемый иммунитет, особенно ответы Т-клеток.

Хроническое воспаление по разным причинам не имеет фазы полного разрешения, оно никогда не заканчивается. Это происходит по разным причинам, таким как длительный контакт с инфекциями или раздражителями, а также наличие клеток, постоянно секретирующих медиаторы воспаления. Когда воспалительный стимул становится постоянным, развиваются иммуносупрессия и иммунологическая толерантность. В этом случае, хотя и субклинические, но повышенные уровни цитокинов, таких как гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), связаны с иммунной толерантностью, тогда как значительно повышенные уровни связаны с обострениями воспаления (Rogovskii V. (2020) Front Immunol. 11:2061). Фактически, воспалительные цитокины, такие как G-CSF и GM-CSF, могут опосредовать повышение иммунной толерантности. Ценой повышенной иммунной толерантности является повышенная восприимчивость к опухолям (Stape T (2018) Asia Pac J Oncol Nurs 5:40-2).

G-CSF и GM-CSF являются основными цитокинами в гранулопоэзе и дифференцировке нормальных гранулоцитарных предшественников в костном мозге. Их физиологические эффекты опосредованы связыванием со специфическими рецепторами

клеточной поверхности. Известно, что концентрации G-CSF и GM-CSF и их рецепторов в плазме изменяются при воспалительных заболеваниях, проявляющихся нейтрофилией, лихорадкой, воспалением, разрушением тканей, а в некоторых случаях шоком и смертью (Watari K et al. (1989) *Blood*. 73(1):117-22; Hamilton JA (2020) *J Exp Med*.217(1):e20190945).

При возникновении инфекции высвобождение G-CSF и GM-CSF естественным образом увеличивается, поскольку некоторые компоненты инфекционного агента стимулируют их продуцирование. Нейтрофилы, возникшие в результате цепочки реакций, в свою очередь, атакуют инфекционные агенты, способствуя их уничтожению. (Eyles JL et al. (2006) *Nat. Clin. Pract. Rheumatol*. 2(9):500-510; Ahandideh B et al. (2020) *Hum Immunol*. 81(5):206-217). G-CSF и GM-CSF также играют ключевую роль в возникновении, прогрессировании и метастазировании рака (Do H et al. (2020) *Cancers*. 12(2):287). Совместное действие цитокинов, продуцируемых неопластическими клетками, модулирует клеточный ответ иммунной системы хозяина. Высокие уровни воспалительных цитокинов коррелируют с поздней стадией и плохим прогнозом для нескольких типов рака (Silva EM et al. (2017) *PLoS ONE* 12(7):e0181125; Lippitz, BE (2013); *The Lancet Oncology*, 14(6), e218-e228).

Известно, что нейтрофилы играют важную роль при различных патологиях, для которых характерно хроническое воспаление, таких как развитие опухолей, хроническая обструктивная болезнь легких, увеит, артрит, анкилозирующий спондилит, красная волчанка, астма, синдром выброса цитокинов и др. В некоторых из таких заболеваний соотношение нейтрофилы/лимфоциты является прогностическим показателем (Lee HN et al. (2019) *Rheumatol Int*. 39(5):859-868).

В клинике G-CSF и GM-CSF широко используются для лечения нейтропении, связанной с химиотерапией, и для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток для трансплантации (Roberts, AW (2005) *Growth Factors* 23(1):33-4; Mehta HM et. al. (2015) *J. Immunol*. 195(4):1341-1349), однако прецеденты обратного не обнаружены.

Описано моноклональное антитело (Ab), которое может играть диагностическую роль или может быть использовано в качестве пассивной терапии для борьбы с опухолями, для которых характерна высокая экспрессия рецептора G-CSF (G-CSFR). Имеются сообщения о том, что гуманизованное нейтрализующее моноклональное антитело, направленное против G-CSFR, хорошо переносится приматами и не приводит к нейтропении. Кроме того, мышинное моноклональное анти-G-CSFR антитело подавляло артрит и в значительной степени ингибировало накопление нейтрофилов в суставах, без развития нейтропении, что позволяет предположить, что блокада G-CSFR влияет на локализацию нейтрофилов в участках воспаления (Campbell IK (2016). *J. Immunol*. 197:4392-4402). Однако нет никаких доказательств, свидетельствующих об эффективности антипролиферативного и противоопухолевого лечения. Поскольку G-CSF является ключевым лигандом в контроле и функционировании нейтрофилов, использование составов, ингибирующих активацию этого цитокина, в качестве

терапевтических показаний у пациентов с этим типом заболевания является полезным и важным.

Описана фаза I исследования по введению моноклональных анти-G-CSFR антител здоровым добровольцам для лечения ладонно-подошвенного пустулеза с гнойным гидраденитом (WO 2019/178645 и WO 2020/113270), в ходе которого количество циркулирующих нейтрофилов не снизилось до более низкого уровня, ниже критического.

Блокада пути GM-CSF моноклональными антителами, направленными против самого цитокина или его рецептора, описана в WO 2010/124163, и в настоящее время проводятся клинические испытания на пациентах с рефрактерным ревматоидным артритом (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04333147>, доступ: 23 ноября 2020 г.; ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04134728>, доступ: 23 ноября 2020 г.) и на пациентах с COVID (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04376684>, доступ: 23 ноября 2020 г. Также описано применение анти-GM-CSF антител при лечении токсичности, индуцированной иммунотерапией типа АСТ (WO 2019/070680).

Концентрации цитокинов G-CSF и GM-CSF, детектируемые у пациентов, являются высокими, поэтому даже высокие дозы антител не способны полностью нейтрализовать их активность. Нарушение толерантности и развитие иммуногенности не являются очевидными процессами, вызываемыми этими молекулами, поскольку они присутствуют в организме в нормальных условиях. До сих пор не предложено активной иммунотерапии против G-CSF- или GM-CSF-зависимых опухолей, способной ингибировать их рост.

Впервые в настоящем изобретении представлен истощающий иммунный ответ, генерируемый этими гемопозитическими факторами роста, и приведены доказательства терапевтического эффекта этого ответа на экспериментальных моделях воспаления и рака. Указанные композиции вызывают увеличение титров анти-GCSF антител и анти-GM-CSF антител, приводят к уменьшению количества циркулирующих нейтрофилов, и демонстрируют антипролиферативный, противовоспалительный эффект и высокий противоопухолевый эффект. Помимо этого, их можно использовать при хронически заболеваниях, так как они имеют низкую токсичность благодаря низким дозам активных ингредиентов.

Эффекты, продемонстрированные представленными в настоящем описании вакцинными композициями, являются удивительными и неожиданными. Сложная природа цитокиновых сетей и их плейотропные эффекты, а также избыточность генерирующих воспаление механизмов, не делают очевидной способность антител, генерируемых этими вакцинными композициями, избирательно истощать популяцию нейтрофилов, не говоря уже о том, что такое истощение перерастает в противовоспалительный и противоопухолевый эффект.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из вариантов осуществления объектом настоящего изобретения является терапевтическая вакцинная композиция для индукции иммунного ответа против гемопозитических факторов роста, которая содержит белок-носитель, адъювант и по

меньшей мере один антиген, который может представлять собой rG-CSF или rGM-CSF.

Белки-носители, используемые в этих вакцинных композициях, включают холерный токсин В, столбнячный анатоксин, KLH, P64k из *Neisseria meningitidis*, дифтерийный анатоксин, пептиды, способные презентировать Т-клеткам эпитопы G-CSF и GM-CSF, иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, область Fc антител, переменные фрагменты антител и белки бактерий, дрожжей или млекопитающих. Эти белки-носители могут быть присоединены к антигену методами химической конъюгации или слияния.

Адьювантами, которые можно использовать в вакцинных композициях по настоящему изобретению, являются неполный адьювант Фрейнда, полный адьювант Фрейнда, адьюванты на основе сквалена, адьюванты синтетического происхождения, адьюванты минерального происхождения, адьюванты растительного происхождения, адьюванты животного происхождения, белковые адьюванты в виде частиц, адьюванты типа протеолипосом, липосомы и смеси любого из вышеперечисленного.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению представленных в настоящем описании вакцинных композиций для лечения воспалительных заболеваний, выбранных из группы, включающей рак, хроническую обструктивную болезнь легких, увеит, ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, красную волчанку, болезнь Крона, астму, дерматит, синдром высвобождения цитокинов и заболевания, при которых важную роль играет клеточная дегрануляция.

В другом варианте осуществления предлагается способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества вакцинных композиций по настоящему изобретению в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг массы тела. В частности, стадия индукции иммунного ответа осуществляется путем по меньшей мере еженедельного введения от 1 до 6 доз, и другая стадия для поддержания указанного иммунного ответа осуществляется путем введения 1 дозы и более до тех пор, пока не возникнет токсичность, ограничивающая применение этой композиции. Этот способ включает введение вакцинных композиций либо внутримышечно, либо подкожно, либо внутриопухолево.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вакцинные композиции

Настоящее изобретение включает получение вакцинных препаратов, индуцирующих иммунный ответ против гемопоэтических факторов роста G-CSF и GM-CSF и вызывающих также снижение количества циркулирующих нейтрофилов, антипролиферативный эффект и высокий противоопухолевый эффект *in vivo*.

Активным агентом вакцинных композиций по настоящему изобретению является белковый конъюгат антигена (G-CSF и/или GM-CSF), связанный с белком-носителем. Указанный белок-носитель выбирают, без ограничения, из холерного токсина В, столбнячного анатоксина, KLH, P64k из *Neisseria meningitidis*; дифтерийного анатоксина и пептидов, которые способны презентировать Т-клеткам эпитопы G-CSF и GM-CSF. В вышеуказанных конъюгатах белок может быть слит с иммуноглобулинами G,

иммуноглобулинами М, областью Fc Ab человека или других видов животных. При этом, указанная область Fc может представлять собой вариант с ограниченным связыванием с Fc-рецепторами, состоящий из мутированного в области C γ 2 IgG1 с мутациями L234A и L235A. Кроме того, конъюгаты могут быть слиты с различными фрагментами Ab, белками бактерий, дрожжей или млекопитающих.

Кроме того, описанные выше белковые конъюгаты содержат адъювант, который усиливает или дополняет ответ анти-G-CSF и/или анти-GM-CSF антител. Эти адъюванты могут представлять собой неполный адъювант Фрейнда, полный адъювант Фрейнда, адъюванты на основе сквалена, адъюванты синтетического происхождения, адъюванты минерального происхождения, адъюванты растительного происхождения, адъюванты животного происхождения, белковые адъюванты в виде частиц, адъюванты типа протеолипосом, липосомы или смесь любого из вышеперечисленного.

В системах анти-G-CSF и/или анти-GM-CSF антител, включенных в настоящее изобретение, используют подходящие фармацевтические наполнители. Они включают, без ограничения, воду для инъекций, хлорид натрия, соли фосфора и калия, хлорид кальция, гидроксид и цитрат натрия и ЭДТА. Пациентам можно вводить парентеральные составы с концентрацией белка от 0,01 до 10 мг/мл в дозах от 10 до 100 мкл/кг или 10-100 мкг общего белка на килограмм или до 5 мг общего белка, более предпочтительно 10-60 мкг/мл.

Хранить терапевтическую композицию можно в жидкой форме при температуре от -80°C до 8°C или после процесса лиофилизации при температуре от 2 до 8°C.

Получение химического конъюгата белка-носителя с рекомбинантным G-CSF (rG-CSF) и/или рекомбинантным G-CSF (rGM-CSF)

На основе оценки и оптимизации условий реакции химической конъюгации между белками rGCSF и/или rGM-CSF и некоторыми из указанных выше белков-носителей был разработан способ химической конъюгации, согласно которому для гарантии высокой эффективности конъюгации двух компонентов в процессе конъюгации требуется высокая молярная доля аутологичного белка. Необходимый избыток аутологичного белка при конъюгации затем устраняется методом ультрафильтрационной мембранной очистки, что позволяет получить высоко гомогенный вакцинный препарат.

Способ, описанный в настоящем изобретении, гарантирует адекватную химическую конъюгацию между обоими белками и состоит из одного этапа. Этот способ начинается со смешивания предварительно концентрированных белков rGCSF и/или rGM-CSF в диапазоне от 0,1 до 1 мг/мл с конъюгируемой молекулой в диапазоне от 0,6 до 20 мг/мл в реакторе конъюгации. Затем эту белковую смесь добавляют к раствору PBS/MgCl₂ (pH 6,0-7,2) и раствору для конъюгации на основе глутаральдегида в диапазоне 0,1-0,8%. Смесь выдерживают при постоянном перемешивании от 15 минут до 4 часов при температуре от 20 до 24°C \pm 2°C. Общая концентрация белка во время реакции конъюгации составляет 1-20 мг/мл.

Далее выполняют очистку с использованием ультрафильтрационных мембран с

границей отсечки в диапазоне 50-100 кДа, которая состоит из двух этапов. На начальном этапе выполняют последовательные замены буферного раствора (диафильтрацию) для удаления глутаральдегида и устранения избытка аутологичного белка, как свободного, так и образующего конъюгаты только белка rGCSF или только белка rGM-CSF разных размеров. На этом этапе выполняют от 3 до 15 замен буферного раствора. Второй этап состоит в увеличении концентрации очищенного химического конъюгата.

Терапевтический препарат, полученный мембранной очисткой, характеризуется соотношением химической конъюгации между белками rGCSF и молекулой, с которыми они конъюгированы, в диапазоне от 5:1 до 20:1 и не содержит глутаральдегида.

Получение терапевтической композиции методом экспрессии слитого белка

Вакцинные композиции по настоящему изобретению также могут быть получены путем создания генетических конструкций на основе генов rG-CSF и rGM-CSF, клонированных в векторе экспрессии, без ограничения, предпочтительно РСМХ, и слитых с генами любого из указанных выше белков-носителей. Клетки, используемые при трансфекции, могут представлять собой НЕК-293Т, НЕК-293-GE, Expi 293, НЕК-293 или СНОк1. Супернатанты трансфицированных клеток собирают через 6-10 дней культивирования. Указанные рекомбинантные белки затем очищают с помощью аффинной хроматографии с белком А или аффинной хроматографии с ионами металлов.

Методы лечения

Описанные выше системы эффективны для поддержания иммунного ответа против G-CSF и/или против GM-CSF с предварительной индукцией антител, генерируемых системами, описанными в настоящем изобретении. Они полезны при лечении воспалительных заболеваний, в которых G-CSF и GM-CSF играют важную роль. Эти заболевания включают (без ограничения) рак (в частности, опухоли, зависящие от G-CSF или GM-CSF), хроническую обструктивную болезнь легких, увеит, артрит, болезнь Бехтерева, красную волчанку, болезнь Крона, астму, дерматит, синдром высвобождения цитокинов и заболевания, при которых важную роль играет клеточная дегрануляция.

Дозы, одобренные для применения людьми или животными, вводят на этапе индукции в количестве от 1 до 6 доз по меньшей мере еженедельно, и затем на этапе поддержания иммунного ответа вводят 1 и более доз до тех пор, пока не возникнет токсичность, ограничивающая их введение, которое можно осуществлять, по меньшей мере, еженедельно, а также раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или ежегодно путем внутримышечного, подкожного или внутриопухолевого введения.

Настоящее изобретение дополнительно описано с помощью приведенных ниже примеров и чертежей. Однако эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

Фиг. 1. Характеристика системы rG-CSF-P64k с помощью SDS PAGE электрофореза.

Фиг. 2. Характеристика систем rG-CSF-Fc и rGM-CSF-Fc с помощью SDS PAGE

электрофореза.

Фиг. 3. Изучение кинетики титров анти-G-CSF Ab после введения терапевтической композиции rG-CSF-P64k, отдельно или в комбинации с G-CSF.

Фиг. 4. А) Получение титров анти-G-CSF антител после введения терапевтической композиции rG-CSF-P64k, в разных дозах; В) Кинетика титров анти-G-CSF антител после введения терапевтической композиции rG-CSF-P64k, в разных дозах.

Фиг. 5. Оценка количества циркулирующих нейтрофилов после введения терапевтической композиции rG-CSF-P64k, отдельно или в комбинации с G-CSF.

Фиг. 6. Ингибирование пролиферации клеток, индуцированное сыворотками, полученными от мышей, иммунизированных терапевтической композицией rG-CSF-P64k.

Фиг. 7. Оценка противовоспалительного эффекта после введения терапевтической композиции rG-CSF-P64k на модели воспаления, вызванного нанесением кротонового масла. А) Снижение количества циркулирующих нейтрофилов, В) Уменьшение отека предсердий.

Фиг. 8. Изучение кинетики титров анти-G-CSF Ab после введения терапевтической композиции rG-CSF-Fc, отдельно или в комбинации с G-CSF.

Фиг. 9А) Изучение выработки титров анти-G-CSF антител после введения терапевтической композиции rG-CSF-Fc в разных дозах; В) Кинетика титров анти-G-CSF антител после введения терапевтической композиции rG-CSF-Fc в разных дозах.

Фиг. 10. Изучение кинетики титров анти-G-CSF антител после введения терапевтической композиции rG-CSF-Fc в линии Balb/c.

Фиг. 11. Оценка количества циркулирующих нейтрофилов после введения терапевтической композиции rG-CSF-Fc, отдельно или в комбинации с G-CSF.

Фиг. 12. Ингибирование пролиферации клеток, индуцированное сыворотками, полученными от мышей, иммунизированных терапевтической композицией rG-CSF-Fc.

Фиг. 13. Изучение кинетики титров анти-GM-CSF антител при применении терапевтической композиции rGM-CSF-Fc.

Фиг. 14А). Изучение титров анти-GM-CSF антител после введения терапевтической композиции rGM-CSF-Fc, в разных дозах; В) Изучение кинетики титров анти-GM-CSF антител после введения терапевтической композиции rGM-CSF-Fc в разных дозах.

Фиг. 15. Ингибирование пролиферации клеток, индуцированное сыворотками, полученными от мышей, иммунизированных терапевтической композицией rGM-CSF-Fc.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение химического конъюгата рекомбинантного белка rP64k с rG-CSF

Для получения химического конъюгата белков rG-CSF с P64k в соотношении 20:1 к буферному раствору $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (0,01 М) и 0,5% раствору глутаральдегида для конъюгации в реакторе сначала добавляют 17,6 мг белка GCSF и затем добавляют 3 мг белка-носителя P64k и перемешивают в течение 1 часа. Затем с помощью системы

ультрафильтрации удаляют детергенты, примеси и неконъюгированные белки. Этот процесс выполняют с использованием буфера, содержащего полисорбат 80, сорбит, ацетат натрия, уксусную кислоту и воду для инъекций. В ходе этой процедуры замену буфера выполняют 7 раз. Раствор после ультрафильтрации концентрируют до доведения его концентрации в одной дозе 1 мг/мл. Полученный раствор затем хранят при температуре 2-8°C.

Для оценки чистоты очищенных белков используют 10% SDS-PAGE гель и 1 мкг белка. На фиг. 1 показано, что полученная вакцинная композиция соответствует молекулярной массе примерно 200 кДа.

Пример 2. Получение терапевтических композиций путем экспрессии слитых белков

Создавали генетическую конструкцию на основе гена G-CSF и гена GM-CSF, которые сливали с областью Fc человеческого иммуноглобулина G1 и клонировали в вектор экспрессии PCMX. Клетки Expi 293 трансфицировали исследуемой генетической конструкцией, смешанной с полиэтиленимином. Супернатанты трансфицированных клеток собирали через 6 дней культивирования. Указанные рекомбинантные белки очищали путем связывания белком А матрикса. Для оценки чистоты очищенных белков использовали 7,5% SDS-PAGE гель, масса использованного G-CSF-Fc составляла 2 мкг, а белка GM-CSF-Fc - 9 мкг.

На фиг. 2 показано, что молекулярная масса обеих исследуемых композиций соответствует примерно 35 кДа.

Пример 3. Терапевтическая композиция rG-CSF-P64k индуцирует образование анти-G-CSF антител.

Мышей линии C57BL/6 (n=5) иммунизировали в дни 0, 7, 21, 35 и 42 внутримышечно 50 мкг/кг состава из примера 1 с адъювантом Монтанид (1:1 по объему). Начиная с 14-го дня им также вводили G-CSF или PBS подкожно три раза в неделю.

Кровь для обработки сыворотки брали в дни 0 (до иммунизации), 14, 35 и 56. Титр специфических анти-G-CSF антител определяли с помощью ELISA. Для этого планшеты покрывали 5 мкг/мл G-CSF и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После соответствующего блокирования добавляли разведения сыворотки (1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/20000). Реакцию визуализировали с использованием конъюгированных с щелочной фосфатазой антител к мышинному IgG (Sigma) и соответствующего ферментного субстрата. Поглощение измеряли при 405 нм. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку до иммунизации. Титр антител определяли как максимальное разведение сыворотки, которое давало значение оптической плотности (OD), полученное методом ELISA, плюс пять стандартных отклонений от среднего значения OD, полученной для лунок, содержащих сыворотку до иммунизации.

Среднее геометрическое титров анти-G-CSF антител, оцененных с помощью ELISA в каждой экспериментальной группе, использовали для определения состояния иммунного ответа.

У иммунизированных мышей развивались специфические антитела, титры которых превышали 1/10000, что свидетельствует о том, что вакцинная композиция индуцирует иммунный ответ против собственного G-CSF (фиг. 3).

Пример 4. Терапевтическая композиция rG-CSF-P64k в различных концентрациях индуцирует анти-G-CSF антитела

Мышей линии C57BL/6 (n=5) иммунизировали 6 дозами с интервалом в 14 дней внутримышечно, используя разные концентрации 50, 25, 12,5, 6,25 и 3,125 мкг состава из примера 1 с адъювантом Монтанид (1:1 по объему). После второй иммунизации им также вводили G-CSF или PBS подкожно два раза в неделю.

Кровь для обработки сыворотки брали в дни 0 (до иммунизации) и через пятнадцать дней после каждой иммунизации. Титр специфических анти-G-CSF антител определяли методом ELISA. Для этого планшеты покрывали 5 мкг/мл G-CSF и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После соответствующего блокирования добавляли разведения сыворотки (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000). Затем следовали процедуре, описанной в примере 3.

У иммунизированных мышей вырабатывались специфические антитела, титры которых достигали более 1/1000 при разных концентрациях вакцинной композиции, демонстрируя индукцию иммунного ответа против G-CSF. Между титрами, полученными у мышей, иммунизированных этими дозами антигена, наблюдаются значимые различия (фиг. 4А). Это свидетельствует о том, что наблюдаемый ответ, измеренный у иммунизированных групп в виде титра антител, зависит от дозы.

Также оценивали гуморальный иммунный ответ в разные интервалы времени, соответствующие 3, 4, 5 и 6 дозам вакцинной композиции. Титр антител у всех животных, иммунизированных разными концентрациями вакцинного препарата, увеличивается дозозависимым образом, при этом плато титра антител достигается после 5-й иммунизации (фиг 4В).

Пример 5. Терапевтическая композиция rG-CSF-P64k снижает количество циркулирующих нейтрофилов у мышей C57BL/6

Мышей C57BL/6 (n=5) иммунизировали вакцинным составом из примера 1 с адъювантом Монтанид (1:1 по объему), следуя схеме иммунизации примера 3. Начиная с 14 дня, им также вводили G-CSF или PBS подкожно 3 раза в неделю. В день 0 (до иммунизации) и через 56 дней после первой иммунизации из верхнечелюстной пазухи животных брали периферическую кровь и собирали во флаконы с ЭДТА (40 мкл/мл крови) для подсчета нейтрофилов с помощью микроскопа Carl Zeiss.

Нормальность распределения проверяли по критерию Колмогорова-Смирнова, однородность дисперсий определяли по критерию Левена и парному t-критерию Стьюдента между значениями, полученными для каждого животного до иммунизации и в дни 35 и 56. Используемый уровень значимости составлял $p < 0,05$. У животных, обработанных конъюгатом G-CSF-P64k, в день 56 наблюдали статистически значимое снижение нейтрофилов, что позволяет предположить, что данная фармацевтическая

композиция способна вызывать нейтропению, опосредованную генерируемыми ею анти-G-CSF антителами (Фиг. 5). Следует также отметить, что нейтропения не привела к снижению выживаемости мышей.

Пример 6. Терапевтическая композиция rG-CSF-P64k ингибирует пролиферацию клеток мышинной миелобластной линии NFS60

Используя терапевтическую композицию из примера 1 и схему иммунизации, описанную в примере 3, эффекты сыворотки, полученной через 14 и 28 дней, оценивали с помощью анализа пролиферации клеток в мышинной миелобластной линии NFS60 (зависимой от G-CSF) после иммунизации мышей C57BL/6.

Клетки предварительно размораживали и выдерживали в культуре в течение 48 часов для достижения экспоненциального роста. Условия инкубации во время проведения теста были следующими: температура 37°C и атмосфера с содержанием 5% CO₂. Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты с плотностью 10000 клеток на лунку в присутствии вакцинного состава, активным ингредиентом которого является белковый конъюгат rP64k-rG-CSF, в разведениях 1/250; 1/500 и 1/1000. Эталонный материал hG-CSF (MRT (QFB) G-CSF/1905) использовали в тех же концентрациях, что и положительный контроль для этих анализов, а в качестве отрицательного контроля использовали клетки со средой без G-CSF. Через 48 часов инкубации добавляли по 20 мкл Alamar Blue на лунку и инкубировали в течение 6 часов. Планшеты считывали при 540 и 620 нм. Все образцы тестировали в двух экземплярах.

На фиг. 6 показано, что при введении вакцинной композиции происходит ингибирование пролиферации, которое зависит от разведения (чем меньше разведение, тем больше эффект) и времени от начала обработки, поскольку в день 28 наблюдаемый ингибирующий эффект был сильным, чем в день 14, что свидетельствует о том, что вакцинный состав ингибирует пролиферативный эффект G-CSF, который является ключевым в гранулопоэзе оцениваемой опухолевой линии.

Пример 7. Терапевтическая композиция rG-CSF-P64k оказывает противовоспалительное действие

Мышей C57BL/6 иммунизировали подкожно в дни 0, 7 и 21 вакцинным составом из примера 1 в полном адьюванте Фрейнда (1:1 об./об.) в количестве 50 мкг/кг веса. Остальные иммунизации выполняли, используя неполный адьювант Фрейнда. В качестве контрольной группы мышам вводили физиологический раствор тем же способом и с той же частотой.

Животным наносили по 10 мкл 0,4% кротонового масла на поверхность правого уха в дни 0, 7 и 21. На левое ухо наносили такой же объем физиологического раствора. В дни 0 и 20, перед началом нанесения кротонового масла, у всех животных брали пробы крови для подсчета нейтрофилов. В день 35, через 4 ч после нанесения раздражающего вещества, животных умерщвляли и определяли реакцию на отек ушной раковины. Для этого из ушей извлекали фрагменты тканей диаметром 6 мм, которые взвешивали на аналитических весах. По весу дисков из обеих ушей каждого животного, рассчитывали

образовавшийся отек и процент ингибирования воспаления, следующим образом:

Отек=Вес опухшего уха (правое ухо) - Вес неопухшего уха (левое ухо)

% ингибирования воспаления= $[(Pc - Pt) / Pc] \times 100$, где:

Pc: среднее арифметическое изменение веса в контрольной группе,

Pt: среднее арифметическое изменения веса в группе, получавшей лечение.

Для обработки данных использовали статистический пакет MINITAB (Minitab Inc. Версия 16.1.0. MINITAB, 2010 г.) с установленным уровнем достоверности 90% при интерпретации результатов. Данные сравнивали между группами, анализируя нормальность и однородность дисперсии с помощью критериев Колмогорова-Смирнова (КС) и Левена, соответственно. Для определения наличия значимых различий между экспериментальными группами при определении отека использовали параметрический t-критерий Стьюдента (количество нейтрофилов), и U-критерий Манна-Уитни.

В результате предыдущей процедуры в день 20 было обнаружено статистически значимое снижение ($p < 0,1$) количества нейтрофилов в группе, получавшей конъюгат GCSF-P64K, по сравнению с контрольной группой (фиг. 7A). При этом в день 35 в группе, получавшей конъюгат GCSF-P64K, наблюдали подавление острого воспаления, вызванного кротоновым маслом, относительно контрольной группы (фиг. 7B), что проявлялось в статистически значимом снижении отека уха на 53,85% ($p < 0,1$), что указывает на то, что в модели острого воспаления вакцинный препарат оказывает противовоспалительное действие.

Пример 8. Терапевтическая композиция rG-CSF-Fc индуцирует ответ антител

Группу из пяти мышей C57BL/6 иммунизировали внутримышечно 20 мкг/кг вакцинной композиции, описанной в примере 2, содержащей связанный с Fc G-CSF в качестве антигена и адъювант Монтанид, в дни 0, 14, 28 и 42. Кровь для обработки сыворотки брали в дни 14 и 56 и методом ELISA определяли титры специфических анти-G-CSF антител. Для этого планшеты покрывали 5 мкг/мл G-CSFh с хвостом из 6 молекул гистидина, и выдерживали в течение 16 до 20 ч при 4°C. Планшеты блокировали 4% сухим обезжиренным молоком, разведенным в фосфатно-солевом буферном растворе, в течение 1 часа при 25 °C. Добавляли серийные разведения сыворотки иммунизированных мышей и сыворотки до иммунизации в блокирующем растворе (1/10-1/107) и инкубировали в течение 1 часа при 25°C. Выполняли 6 промывок 0,1% (об./об.) раствором Твин20. Добавляли конъюгированный с пероксидазой хрена антимишинный иммуноглобулин (Sigma, A2554-1 мл), разведенный 1:35000 в блокирующем растворе, и инкубировали в течение 1 часа при 25°C. Для проявления окраски использовали ортофенилен-диамин (0,5 мг/мл) (Sigma, США) в субстратном буферном растворе (Na_2HPO_4 200 ммоль/л, лимонная кислота 100 ммоль/л, pH=5) с 0,015% перекисью водорода в течение 30 минут при 25°C. Реакцию останавливали 10% H_2SO_4 . Поглощение определяли при 490 нм на приборе ELISA Dialab GmbH, ELx808.

Титр определяли как наибольшее разведение, при котором наблюдалось поглощение, по меньшей мере, в два раза превышающее значение поглощения сыворотки

до иммунизации, полученной от того же животного.

Результаты, показанные на фиг. 8, соответствуют титрам сыворотки, полученным в дни 14 и 56. График показывает, что иммунизация против G-CSFh способна генерировать у мышей гуморальный ответ с высоким титром антител против указанного цитокина.

Пример 9. Терапевтическая композиция rG-CSF-Fc в разных концентрациях индуцирует анти-G-CSF антитела

Мышей линии C57BL/6 (n=7) иммунизировали 6 дозами с интервалом в 14 дней внутримышечно составом из примера 2, содержащего в качестве антигена связанный с Fc G-CSF и адъювант Монтанид (1:1 по объему), в разных концентрациях: 80, 40, 20, 10 и 5 мкг. Кровь для обработки сыворотки брали в день 0 (до иммунизации) и через четырнадцать дней после каждой иммунизации. Титр специфических анти-G-CSF антител определяли методом ELISA, и затем следовали процедуре, описанной в примере 3.

У иммунизированных мышей вырабатывались специфические антитела, титры которых превышали 1/1000 без статистических различий между группами, иммунизированными разными концентрациями вакцинной композиции, что демонстрирует индукцию в организме иммунного ответа против G-CSF, который не зависит от дозы в оцениваемом интервале (фиг. 9А).

Гуморальный иммунный ответ оценивали у животных, иммунизированных 40 и 5 мкг вакцинной композиции, через различные интервалы времени, следуя процедуре из примера 4. Кинетика титра антител оставалась в фазе плато после 3-й иммунизации с небольшими изменениями после 4-й дозы. При развитии гуморального ответа с течением времени сохранялась независимость от концентрации (фиг. 9Б).

Пример 10. Терапевтическая композиция rG-CSF-Fc в линии Balb/c индуцирует образование анти-G-CSF антител

Мышей Balb/c иммунизировали 5 дозами по 5 мкг терапевтической композицией из примера 2, содержащая слитый с Fc G-CSF в качестве антигена, вводимой подкожно с адъювантом Монтанид, с интервалом 14 дней. Кровь брали в дни 0 (до иммунизации), 42, 70 и 77.

Титр специфических анти-G-CSF антител для различных экстрактов сыворотки определяли методом ELISA. Для этого планшеты покрывали 5 мкг/мл G-CSF и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После соответствующего блокирования добавляли разведения сыворотки (1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000, 1/1 000 000) и затем следовали процедуре, описанной в примере 3.

У иммунизированных мышей Balb/c вырабатывались специфические антитела, средний титр которых достигал 1/10000, демонстрируя, что вакцинная композиция индуцирует сильный иммунный ответ против G-CSF (Фиг. 10).

Пример 11. Терапевтическая композиция rG-CSF-Fc снижает количество циркулирующих нейтрофилов у мышей C57BL/6

Мышам C57BL/6 (n=5) вводили 20 мкг/кг вакцинной композиции, описанной в примере 2, содержащей связанный с Fc G-CSF в качестве антигена и адъювант Монтанид,

следуя схеме иммунизации, описанной в примере 3. Количество нейтрофилов оценивали с использованием микроскопа Carl Zeiss. В день 0 (до иммунизации) и через 56 дней после первой иммунизации брали периферическую кровь из верхнечелюстной пазухи животных, которую собирали во флаконы с ЭДТА (40 мкл/мл крови). Подсчет нейтрофилов выполняли с помощью микроскопа Carl Zeiss.

Нормальность проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, а однородность дисперсий определяли по критерию Левена и парного t-критерия Стьюдента между значениями, полученными для каждого животного до иммунизации и в дни 35 и 56, при уровне значимости $p < 0,05$.

Статистически значимое снижение количества нейтрофилов наблюдали в день 56 у животных, получавших конъюгат GCSF-P64k, что позволяет предположить, что эта фармацевтическая композиция способна вызывать нейтропению, опосредованную генерируемыми ею анти-G-CSF антителами (фиг. 11). Следует также отметить, что нейтропения не привела к снижению выживаемости мышей.

Пример 12. Терапевтическая композиция rGCSF-Fc ингибирует пролиферацию клеток мышинной миелобластной линии NFS60

Мышей C57BL/6 иммунизировали терапевтической композицией из примера 2, которая содержала слитый с Fc GCSF в качестве антигена, 7 внутримышечными дозами по 40 и 5 мкг с адьювантом Монтанид, разделенными 14-дневными интервалами.

Используя анализ пролиферации клеток мышинной миелобластной линии NFS60 (G-CSF-зависимой), оценивали эффекты сывороток, полученные в день 0 (до иммунизации) и в конце схемы иммунизации, следуя процедуре, описанной в примере 5.

На фиг. 12 показано, что при введении вакцинной композиции происходит ингибирование пролиферации, которое не наблюдается при введении сыворотки неиммунизированных животных (до иммунизации), что свидетельствует о том, что вакцинная композиция ингибирует пролиферативный эффект G-CSF, являющегося ключевым фактором в гранулопоэзе линии NFS60. Ингибирование пролиферации оцениваемых сывороток не демонстрирует зависимость от концентрации вакцинной композиции.

Пример 13. Терапевтическая композиция rGM-CSF-Fc индуцирует гуморальный ответ

Группу из четырех мышей BALB/c иммунизировали подкожно 20 мкг человеческого GM-CSF, слитого с Fc IgG1. Сыворотку брали у мышей за два дня до первой иммунизации и использовали в качестве контроля сыворотки до иммунизации. Выполняли шесть иммунизаций с 14-дневными интервалами, и кровь брали через семь дней после введения шестой дозы. В день 0 иммунизацию выполняли 20 мкг белка, эмульгированного в полном адьюванте Фрейнда (1:1 об./об.). Остальные иммунизации выполняли с неполным адьювантом Фрейнда.

В дни 0, 35, 49 и 77 брали кровь и определяли титр анти-GM-CSF антител в сыворотке методом ELISA. Для этого 96-луночные планшеты покрывали 5 мкг/мл

человеческого GM-CSF, растворенного в фосфатно-солевом буферном растворе, в течение 16-20 часов при 4°C. Планшеты блокировали 4% сухим обезжиренным молоком, разведенным в фосфатно-солевом буферном растворе, в течение 1 часа при 25°C. Добавляли серийные разведения сыворотки иммунизированных мышей и сыворотки мышей до иммунизации в блокирующем растворе (1/10-1/10⁷) и инкубировали в течение 1 часа при 25°C. Выполняли 6 промывок 0,1% (об.:об.) раствором Твин20. Добавляли конъюгированный с пероксидазой хрена антимышиный IgG, разведенный 1/35000 в блокирующем растворе, и инкубировали в течение 1 часа при 25°C. Для проявления окраски использовали ортофенилен-диамин (0,5 мг/мл) в субстратном буферном растворе (200 ммоль/л Na₂HPO₄, 100 ммоль/л лимонной кислоты, pH=5) с 0,015% перекисью водорода в течение 30 минут при 25°C. Реакцию останавливали 10% H₂SO₄. Поглощение определяли при 490 нм. Все образцы наносили в двух экземплярах, и титр антител, присутствующих в сыворотке иммунизированных мышей, считали самым высоким разведением, при котором наблюдалось поглощение, которое по меньшей мере в два раза превышает значение поглощения сыворотки до иммунизации, полученной от того же животного.

График на фиг. 13 демонстрирует, что иммунизация против человеческого GM-CSF вызывает высокий ответ с титрами до 1×10⁷. Результаты показывают, что иммунизация способна вызвать у мышей гуморальный ответ с высоким титром антител против такого цитокина.

Пример 14. Терапевтическая композиция rGM-CSF-Fc в разных концентрациях индуцирует анти-GM-CSF антитела

Мышей линии C57BL/6 (n=7) иммунизировали внутримышечно 6 дозами состава из примера 2, содержащего связанный с Fc GMCSF в качестве антигена и адьювант Монтанид (1:1 по объему), в разных концентрациях: 40, 20, 10, 5 и 2,5 мкг, с интервалом 14 дней.

Кровь для обработки сыворотки брали в дни 0 (до иммунизации) и через четырнадцать дней после каждой иммунизации. Титр специфических анти-GM-CSF антител определяли методом ELISA. Для этого планшеты покрывали 5 мкг/мл GM-CSF и инкубировали при 37°C в течение 1 часа, следуя процедуре из примера 4.

Среднее геометрическое титров анти-GM-CSF антител, оцененных с помощью ELISA в каждой экспериментальной группе, использовали для определения состояния иммунного ответа.

У иммунизированных мышей вырабатывались специфические антитела, титры которых превышали 1/1000 без статистически значимых различий между группами, иммунизированными разными концентрациями вакцинной композиции, что демонстрирует индукцию иммунного ответа против GM-CSF (фиг. 14A), которая в диапазоне тестируемых доз не зависит от концентрации.

Гуморальный иммунный ответ оценивали у животных, иммунизированных 20 и 5 мкг вакцинной композиции, через различные интервалы времени, следуя процедуре,

описанной в примере 4. Кинетика титра антител демонстрирует увеличение количества антител в соответствии с количеством доз. Начиная с 5-й дозы наблюдается фаза плато, когда отсутствуют изменения в ответе. При развитии гуморального ответа с течением времени сохраняется независимость от концентрации (фиг. 14Б).

Пример 15. Терапевтическая композиция rGMCSF-Fc ингибирует пролиферацию клеток мышинной миелобластной линии NFS60

Мышей Balb/c иммунизировали терапевтической композицией из примера 2, содержащей слитый с Fc GMCSF в качестве антигена, 5 дозами по 5 мкг, введенными подкожно с адъювантом Монтанид, разделенными 14-дневными интервалами. Кровь брали в день 0 (до иммунизации) и через 14 дней после последней иммунизации.

Эффекты сывороток, полученных в результате иммунизации, оценивали с помощью анализа пролиферации клеток мышинной миелобластной линии NFS60 (зависимой от G-CSF), следуя процедуре, описанной в примере 6.

На фиг. 15 показано, что при введении вакцинной композиции rGMCSF-Fc происходит ингибирование пролиферации у иммунизированных животных, которое отсутствует при введении сывороток неиммунизированных животных (до иммунизации), что свидетельствует о том, что вакцинная композиция ингибирует пролиферативный эффект G-CSF, который является ключевым в гранулопоэзе линии NFS60.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая вакцинная композиция для индукции иммунного ответа против гемопозитических факторов роста, содержащая белок-носитель, адъювант и по меньшей мере один антиген, выбранный из группы, содержащей:

- рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (rG-CSF) и
- рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rGM-CSF).

2. Вакцинная композиция по п.1, где белок-носитель выбран из группы, содержащей:

- субъединицу В холерного токсина,
- столбнячный анатоксин,
- KLH,
- P64k из *Neisseria meningitidis*,
- дифтерийный анатоксин,
- пептиды, способные презентировать эпитопы G-CSF и GM-CSF,
- иммуноглобулин G,
- иммуноглобулин M,
- область Fc антитела,
- вариабельную область антитела,
- бактериальные белки,
- дрожжевые белки и
- белки млекопитающих.

3. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-2, где белок-носитель связан с антигеном любым из следующих способов:

- химической конъюгацией и
- слиянием.

4. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-3, где антиген представляет собой rG-CSF.

5. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-3, где антиген представляет собой rGM-CSF.

6. Вакцинная композиция по любому из пп. 1-3, где адъювант выбирают из группы, содержащей:

- неполные адъюванты Фрейнда,
- полные адъюванты Фрейнда,
- адъюванты на основе сквалена,
- адъюванты синтетического происхождения,
- адъюванты минерального происхождения,
- адъюванты растительного происхождения,
- адъюванты животного происхождения,
- белковые адъюванты в виде частиц,

- адъюванты типа протеолипосом,
- липосомы и
- смесь вышеуказанных адъювантов.

7. Применение вакцинной композиции по любому из пп. 1-6 в лечении воспалительных заболеваний, выбранных из группы, состоящей из:

- рака,
- хронической обструктивной болезни легких,
- увеита,
- ревматоидного артрита,
- анкилозирующего спондилоартрита,
- красной волчанки,
- болезни Крона,
- астмы,
- дерматита,
- синдрома высвобождения цитокинов и
- заболеваний, в которых важную роль играет клеточная дегрануляция.

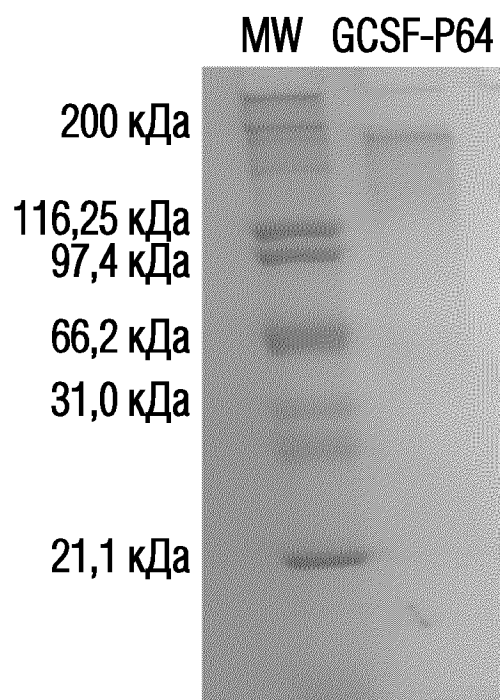
8. Способ лечения нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества терапевтической вакцинной композиции по любому из пп. 1-6 в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг массы тела.

9. Способ по п.8, где индукция иммунного ответа достигается путем по меньшей мере еженедельного введения от 1 до 6 доз вакцинной композиции, и в качестве поддерживающего еженедельного введения используют по меньшей мере 1 дозу и более, вводимые до тех пор, пока не возникнет токсичность, ограничивающая это введение.

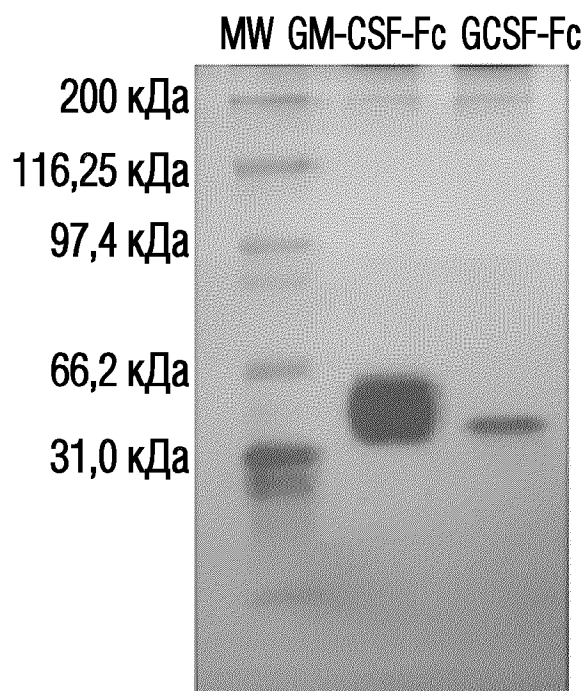
10. Способ по п.9, где путь введения вакцинной композиции выбирают из группы, содержащей внутримышечное, подкожное и внутриопухолевое введение.

1/10

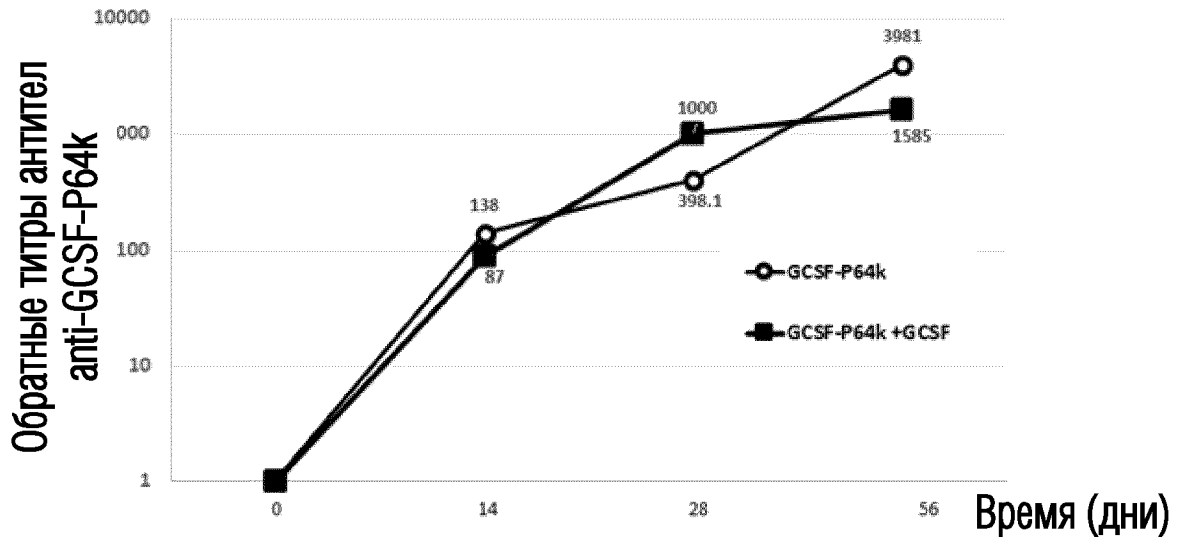
ФИГ. 1



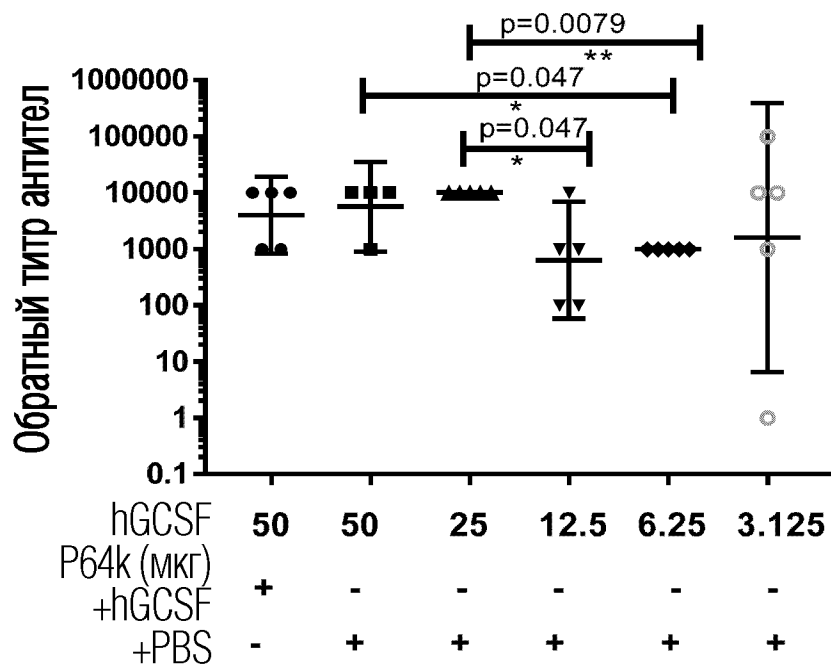
ФИГ. 2



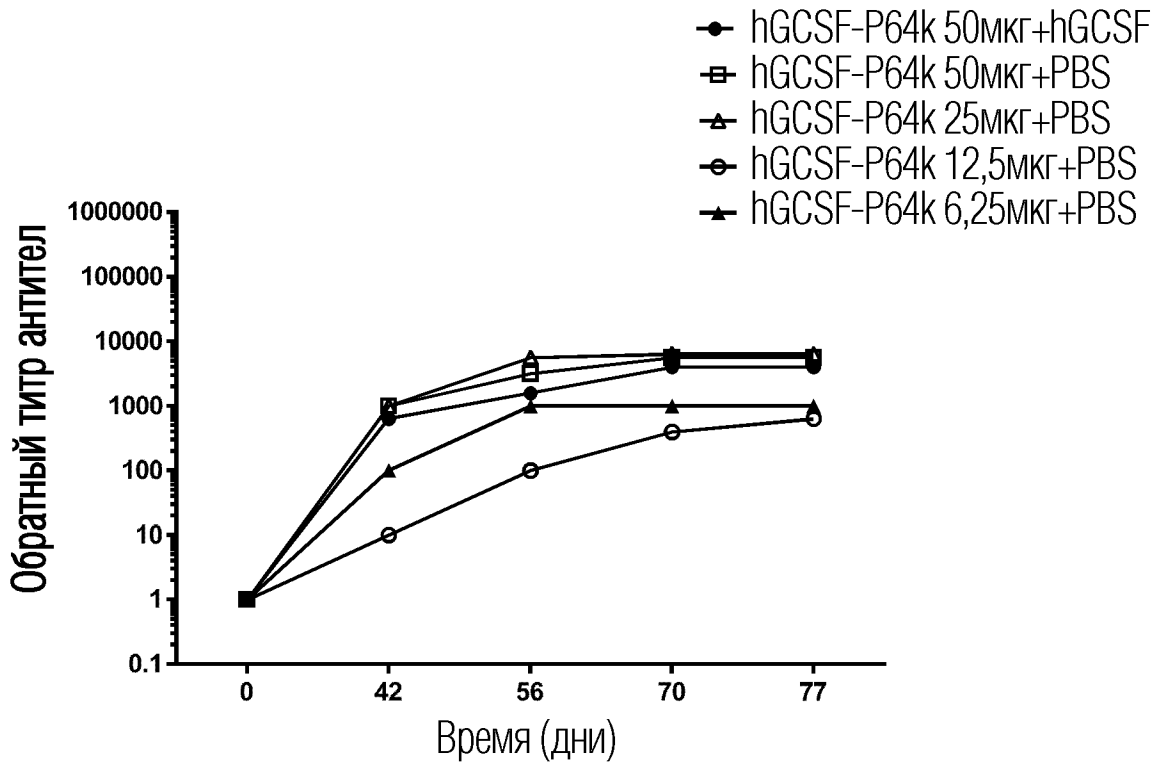
ФИГ. 3



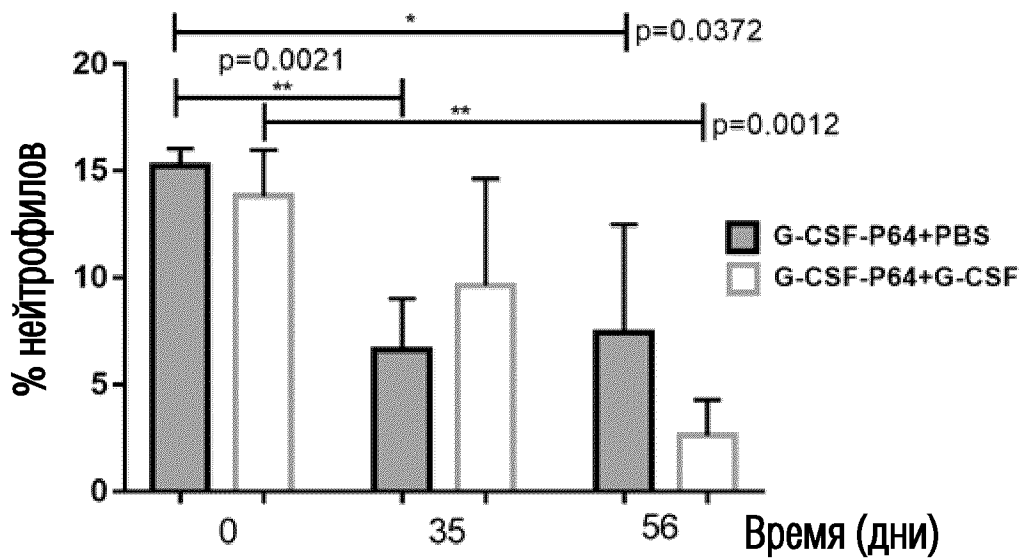
ФИГ. 4А



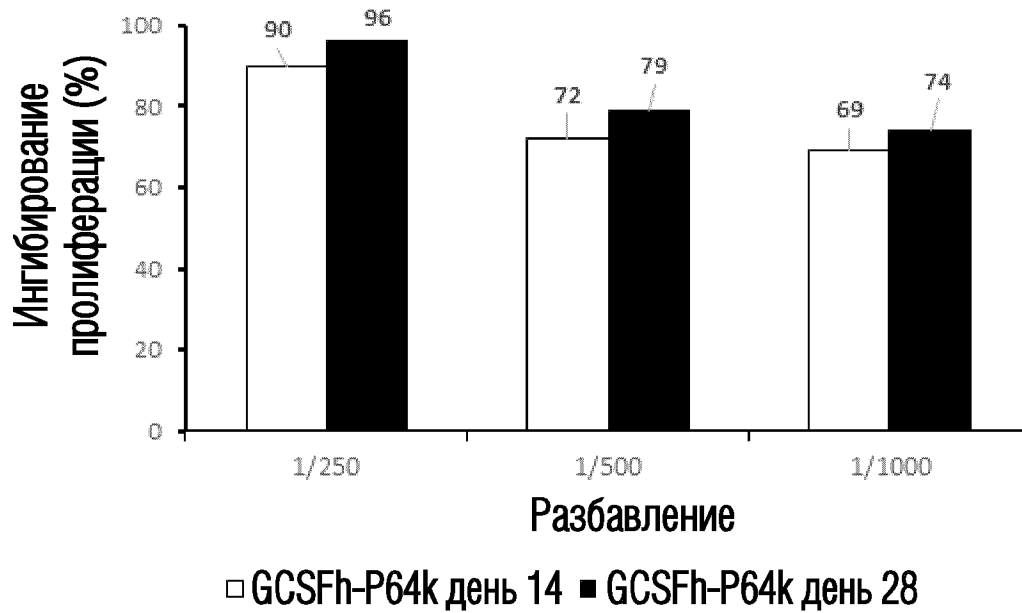
ФИГ. 4В



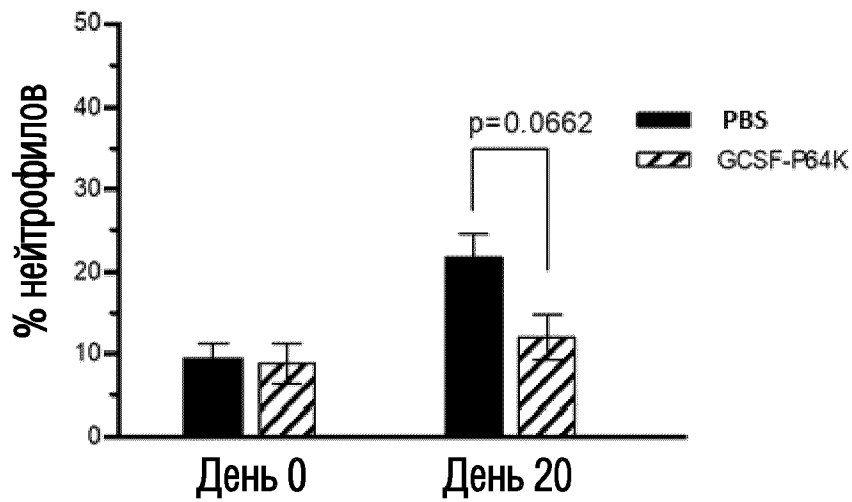
ФИГ. 5



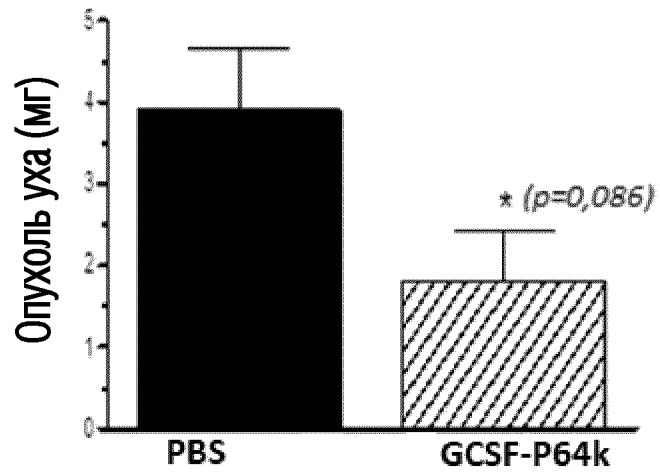
ФИГ. 6



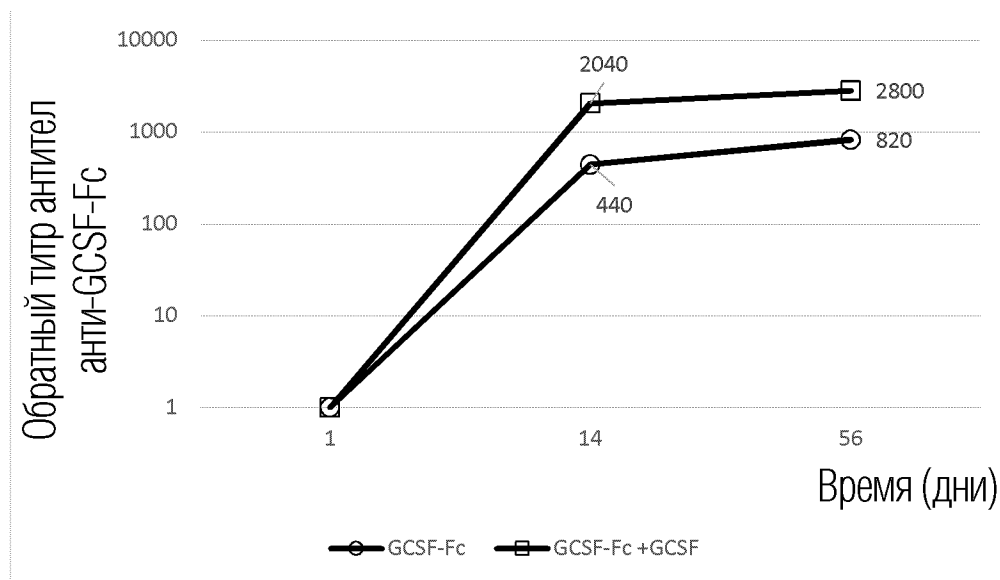
ФИГ. 7А



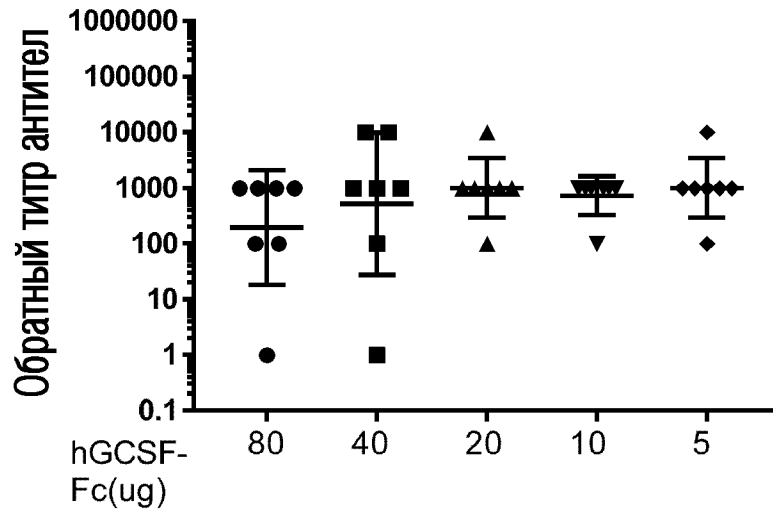
ФИГ. 7В



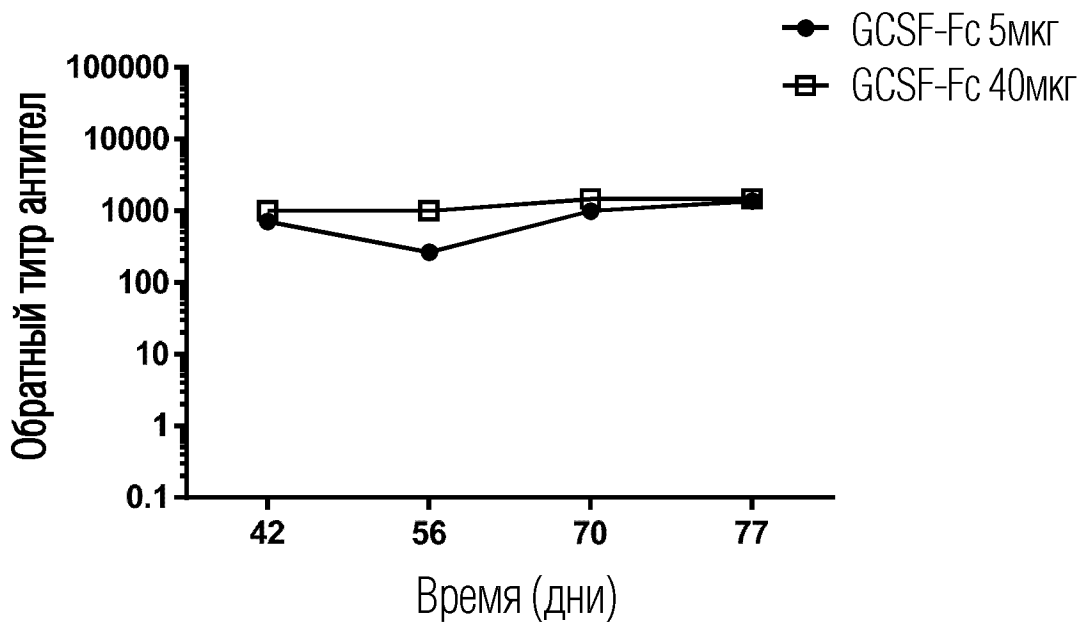
ФИГ. 8



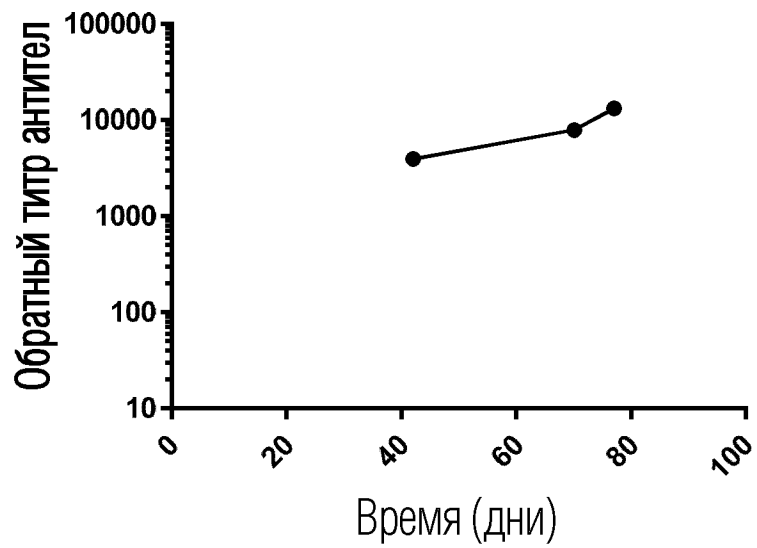
ФИГ. 9А



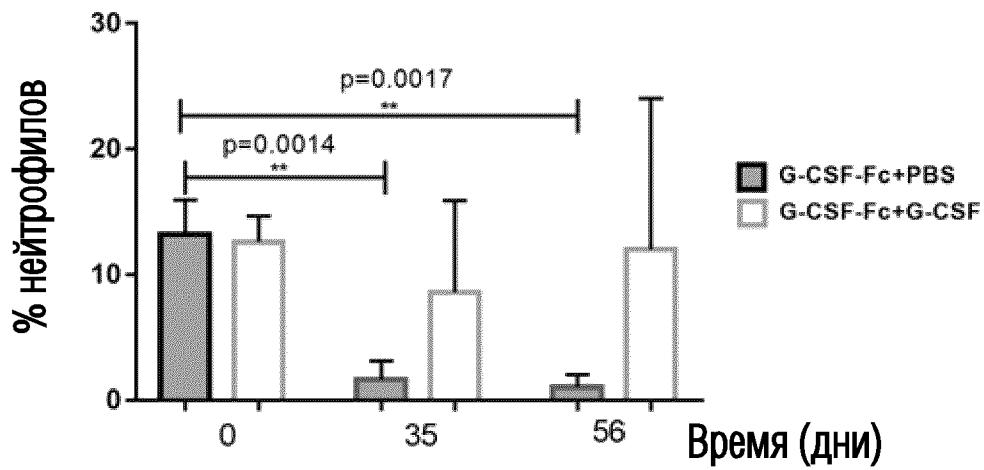
ФИГ. 9В



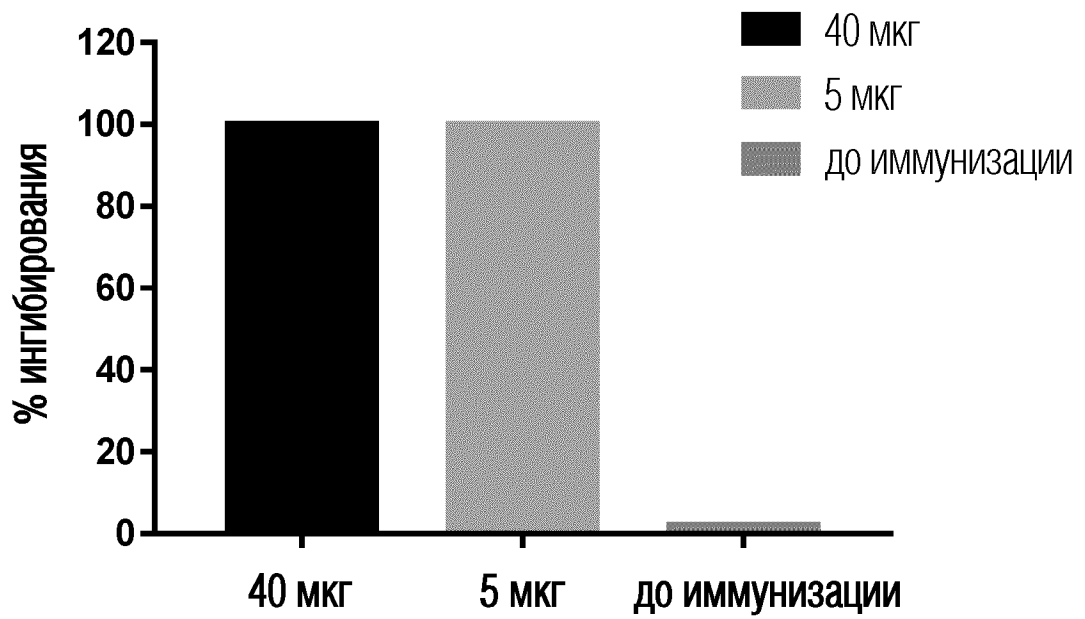
ФИГ. 10



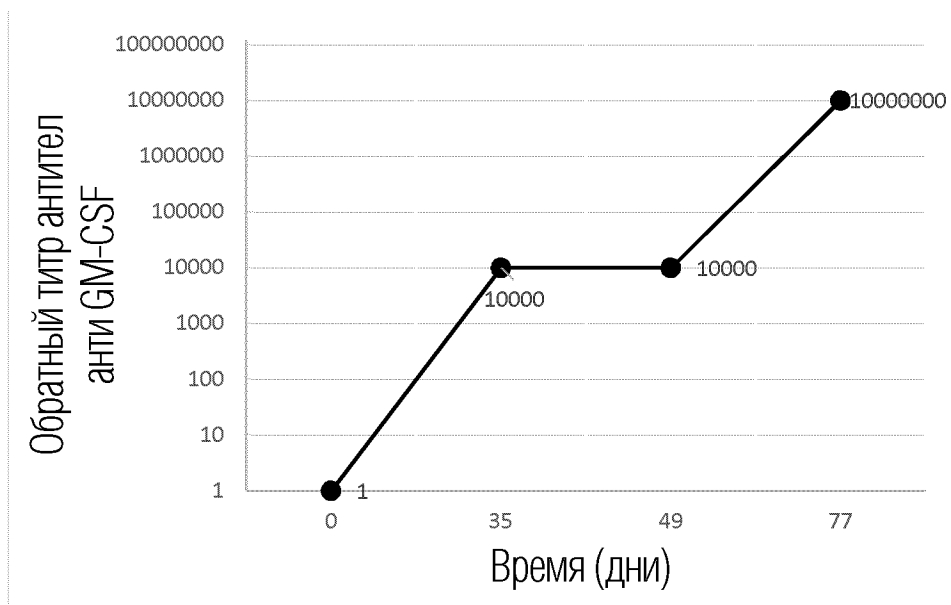
ФИГ. 11



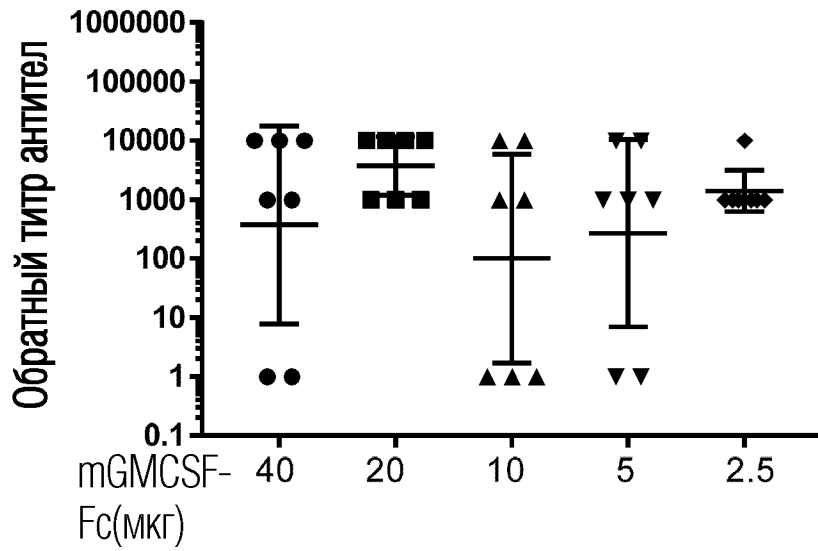
ФИГ. 12



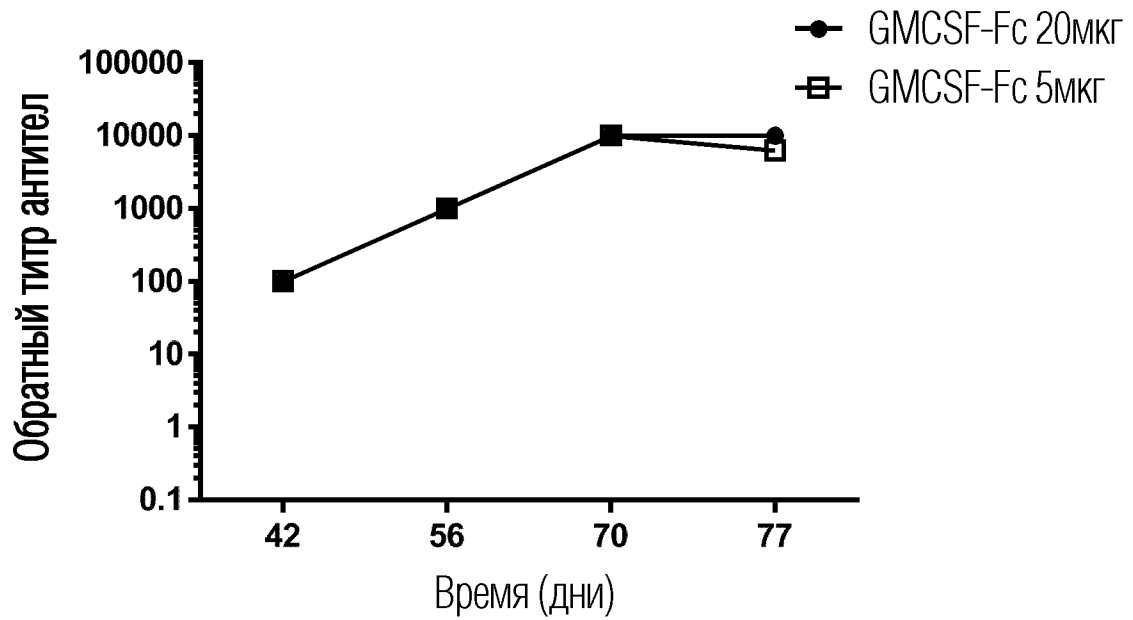
ФИГ. 13



ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 15

