

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035402**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.08</p> <p>(21) Номер заявки
201891161</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2016.11.11</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/195</i> (2006.01)
<i>A61K 31/4015</i> (2006.01)
<i>A61K 31/765</i> (2006.01)
<i>A61K 9/00</i> (2006.01)
<i>A61P 27/02</i> (2006.01)
<i>A61P 27/10</i> (2006.01)
<i>A61P 27/12</i> (2006.01)
<i>G02C 7/04</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ, ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ КАТАРАКТ И ПРЕСБИОПИИ

- | | |
|--|--|
| <p>(31) 62/254,863</p> <p>(32) 2015.11.13</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2018.10.31</p> <p>(86) PCT/US2016/061490</p> <p>(87) WO 2017/083619 2017.05.18</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МАССАЧУСЕТТС (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Мутхукумар Муругаппан (US)</p> <p>(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Карпенко О.Ю. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2014152818
WO-A2-0191775
WO-A2-2012059882
WO-A1-2012167081
WO-A1-2014171842
WANG SHUANGYONG ET AL.: "Treatment with mPEG-SPA improves the survival of corneal grafts in rats by immune camouflage", BIOMATERIALS, vol. 43, 20 December 2014 (2014-12-20), pages 13-22, XP029226308, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.12.001, abstract, page 14, column 1, paragraph 2, page 18, column 1, paragraph 1 - page 2, paragraph 1
WO-A1-2011075430
EP-A1-1437143
WO-A1-2010007626</p> |
|--|--|

- (57) В изобретении описаны способы подавления или обращения прогрессирования формирования катаракты или пресбиопии глаза путем введения бифункциональной молекулы, содержащей замещенный или незамещенный амин, или сукцинимид, или карбоновую кислоту, или изоцианат, или изотиоцианат, или сульфонилхлорид, или альдегид, или карбодиимид, или ацилазид, или ангидрид, или фторбензол, или карбонат, или сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, или сложный имидоэфир, или эпоксид, или сложный фторфениловый эфир, ковалентно связанные с молекулярным ответвлением. И пресбиопия, и катаракты вызваны агрегацией растворимых белков хрусталика, называемых кристаллинами.

B1**035402****035402 B1**

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США 62/254863, поданной 13 ноября 2015 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к композициям и способам подавления или обращения прогрессирующего возрастного изменения в хрусталике глаза.

Предшествующий уровень техники изобретения

Хрусталик глаза представляет собой прозрачную структуру, которая подвешена непосредственно за радужной оболочкой и фокусирует лучи света на сетчатке. Хрусталик содержит как растворимые, так и нерастворимые белки; вместе они составляют 35% от влажной массы хрусталика. В молодом здоровом хрусталике растворимые белки, обычно называемые кристаллинами, составляют 90% белков хрусталика. Во время процесса старения кристаллины хрусталика образуют нерастворимые агрегаты, что, по меньшей мере частично, лежит в основе снижения деформируемости ядра хрусталика, что является признаком пресбиопии, утраты способности глаза изменять фокус, чтобы видеть близкие объекты. Предполагается, что образование нерастворимых агрегатов кристаллинов хрусталика при пресбиопии является ранней стадией формирования возрастного катаракта.

Катаракты определяются затуманенностью или помутнением в хрусталике глаза. Катаракты формируются по мере того, как человек стареет, поскольку кристаллины, присутствующие в хрусталике, превращаются в агрегаты, приводя к повышенной непрозрачности хрусталика. В частности, в ядре хрусталика человека происходит прогрессирующее с возрастом уменьшение концентрации растворимого шаперона, α -кристаллина, поскольку он включается в высокомолекулярные агрегаты и становится нерастворимым белком. Наличие агрегатов негативно сказывается на здоровье и функции хрусталика, и оставшиеся без лечения катаракты могут привести к значительной потере зрения или даже слепоте. В настоящее время наиболее частым лечением катаракта является хирургическое вмешательство.

Кристаллины представляют собой структурные белки, наиболее высоко экспрессируемые в клетках-волокнах хрусталика глаза позвоночного. Кристаллины делятся на два подсемейства: α -кристаллины (αA и αB), которые являются членами суперсемейства малых белков теплового шока, также функционирующих в качестве структурных белков и молекулярных шаперонов; и эволюционно связанное суперсемейство β - и γ -кристаллинов, которые функционируют прежде всего в качестве структурных белков в хрусталике и способствуют свойствам прозрачности и преломляющим свойствам структуры хрусталика. Помимо их роли в развитии катаракты, αA -кристаллин и αB -кристаллин участвуют в развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Александра, болезнь Крейцфельда-Якоба, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

В патентной заявке США 2008/0227700 описана дезагрегация белков, используя в качестве средства терапевтического лечения пептиды, обладающие шаперонными активностями. В частности, αB пептиды использовали для дезагрегации рН-индуцированных агрегатов β -кристаллина, которую измеряют по рассеянию света. Одной из задач является обеспечение непрерывной поставки альфа-кристаллинов в хрусталик. Необходимы альтернативные способы, пригодные для дезагрегации кристаллинов для подавления и/или обращения катаракта и пресбиопии.

Краткое раскрытие изобретения

В одном аспекте офтальмическая композиция содержит бифункциональную молекулу, при этом бифункциональная молекула содержит замещенный или незамещенный амин, сукцинимид, карбоновую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, сульфонилхлорид, альдегид, карбодимид, ацилазид, ангидрид, фторбензол, карбонат, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, сложный имидоэфир, эпоксид или сложный фторфениловый эфир; ковалентно связанные с молекулярным ответвлением, при этом молекулярное ответвление представляет собой полиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 оксиэтиленовых групп; алкоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 алкоксиэтиленовых групп, или арилоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 арилоксиэтиленовых групп.

В другом аспекте способ подавления или обращения прогрессирующего формирования катаракты, пресбиопии или возрастной дегенерации кристаллина хрусталика глаза предусматривает приведение глаза в контакт с эффективным подавляющим катаракту количеством офтальмической композиции, содержащей бифункциональную молекулу, при этом бифункциональная молекула содержит замещенный или незамещенный амин, сукцинимид, карбоновую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, сульфонилхлорид, альдегид, карбодимид, ацилазид, ангидрид, фторбензол, карбонат, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, сложный имидоэфир, эпоксид или сложный фторфениловый эфир; ковалентно связанные с молекулярным ответвлением, при этом молекулярное ответвление представляет собой полиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 оксиэтиленовых групп, алкоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 алкоксиэтиленовых групп, или арилоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 1 до 3 арилоксиэтиленовых групп.

В другом аспекте офтальмическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере вторую бифункциональную молекулу, содержащую замещенный или незамещенный амин, сукцинимид, карбо-

новую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, сульфонилхлорид, альдегид, карбодиимид, ацилазид, ангидрид, фторбензол, карбонат, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, сложный имидоэфир, эпоксид или сложный фторфениловый эфир; ковалентно связанные со вторым молекулярным ответвлением, при этом второе молекулярное ответвление представляет собой линейный или разветвленный полиэтиленгликоль, имеющий от 4 до 200 оксиэтиленовых, алкоксиэтиленовых или арилоксиэтиленовых групп, поли(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA); поли(2-гидроксиэтил)метакрилат (HEMA); поли(2-оксазилин), поли(m-фосфохолин), полилизин или полиглутаминовую кислоту, при этом второе молекулярное ответвление имеет молекулярную массу от 150 до 8000.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены варианты осуществления функциональных групп для бифункциональных молекул, раскрытых в данном документе. В каждой структуре R представляет собой молекулярное ответвление;

на фиг. 2 - измеренная коррелятивная функция g_2-1 , построенная на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) для угла рассеяния, составляющего 30° , для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека;

на фиг. 3 - анализ CONTIN массы разных периодов релаксации для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека;

на фиг. 4 - результаты анализа данных белка γ D-кристаллина человека, используя теорию динамического рассеяния света;

на фиг. 5 - измеренная коррелятивная функция g_2-1 , построенная на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) для угла рассеяния, составляющего 30° , для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₄;

на фиг. 6 - результаты анализа CONTIN массы разных периодов релаксации для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₄;

на фиг. 7 - результаты анализа данных белка γ D-кристаллина, модифицированного посредством CA(PEG)₄, используя теорию динамического рассеяния света;

на фиг. 8 - измеренная коррелятивная функция g_2-1 , построенная на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) для угла рассеяния, составляющего 30° , для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₁;

на фиг. 9 - результаты анализа CONTIN массы разных периодов релаксации для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₁;

на фиг. 10 - результаты анализа данных для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₁, используя теорию динамического рассеяния света;

на фиг. 11 - измеренная коррелятивная функция g_2-1 , построенная на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) для угла рассеяния, составляющего 30° , для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₂;

на фиг. 12 - результаты анализа CONTIN массы разных периодов релаксации для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₂;

на фиг. 13 - результаты анализа данных для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₂, используя теорию динамического рассеяния света;

на фиг. 14 - измеренная коррелятивная функция g_2-1 , построенная на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) для угла рассеяния, составляющего 30° , для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₃;

на фиг. 15 - результаты анализа CONTIN массы разных периодов релаксации для немодифицированного белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₃;

на фиг. 16 - результаты анализа данных для белка γ D-кристаллина человека, модифицированного посредством CA(PEG)₃, используя теорию динамического рассеяния света.

Специалисты в данной области должны понять и оценить вышеописанные и другие признаки из следующего подробного описания, чертежей и прилагаемой формулы изобретения.

Подробное раскрытие изобретения

В документе раскрыты способы дезагрегации/предотвращения образования агрегата кристаллина, предусматривающие приведение агрегата кристаллина в контакт с композицией, содержащей бифункциональную молекулу, в количестве, достаточном для дезагрегации и/или предотвращения образования агрегата кристаллина. Специалист в данной области техники должен признать, что, хотя бифункциональные молекулы, раскрытые в данном документе, в целом описываются как средства, маскирующие заряд γ -кристаллина, также ожидается, что они в том числе дезагрегируют/предотвращают агрегацию белка β -кристаллина. Дополнительно раскрыты способы подавления или обращения прогрессирования формирования катаракты глаза, которые предусматривают приведение глаза в контакт с эффективным подавляющим катаракту количеством офтальмической композиции, содержащей бифункциональные молекулы согласно настоящему изобретению. Также раскрыты способы подавления или обращения прогрессирования пресбиопии глаза, которые предусматривают приведение глаза в контакт с эффективным

подавляющим пресбиопию количеством офтальмической композиции, содержащей бифункциональные молекулы согласно настоящему изобретению.

Для изучения агрегатов, образованных γ -кристаллинами в растворе, автор настоящего изобретения использовал такие методы, как динамическое рассеяние света. И β - и γ -кристаллины представляют собой высокостабильные структурные белки, содержащие четыре мотива "греческого ключа" в двух доменах. В то время как β -кристаллины образуют димеры, а также гетеро- и гомоолигомеры, γ -кристаллины являются мономерами в глазу. Кроме того, тогда как β -кристаллины в растворе проявляют силу отталкивания, γ -кристаллины проявляют притягивающее взаимодействие, обусловленное неспецифическими взаимодействиями белков или воды. Также было выдвинуто предположение, что образование агрегатов γ -кристаллина в растворе вызывают тиоловые модификации.

Семейство γ -кристаллинов человека включает пять членов: γ A-D кристаллины и γ -S кристаллин. γ A-D кристаллины экспрессируются на ранних этапах развития и обнаруживаются в первую очередь в ядре хрусталика; наиболее преобладающими являются γ C и γ D-кристаллин. Было показано, что разворачивание и рефолдинг γ -D кристаллина *in vitro* приводит к повышенной агрегации белка вследствие потери стабильности повторно свернутого белка.

Не связывая себя теорией, считается, что агрегация γ -кристаллина является как электростатическим, так и гидрофобным явлением, при этом доминируют электростатические силы. Добавление белков теплового шока α A- и α B-кристаллина прерывает агрегацию γ -кристаллина. Маскирующее заряд γ -кристаллина средство, которое может разорвать электростатические взаимодействия, может заместить шаперонную активность α -кристаллина и предотвратить/уменьшить размер агрегата γ -кристаллина.

Введение бифункциональных молекул (например, маскирующих заряд γ -кристаллина средств) можно применять для лечения заболеваний и/или состояний, возникающих вследствие агрегации γ -кристаллинов, таких как катаракты и пресбиопия. В рамках настоящего изобретения катаракта представляет собой помутнение хрусталика глаза, вызванное взаимодействиями измененного белка в хрусталике. Взаимодействия белка включают неправильную укладку белков, а также межбелковые взаимодействия, такие как агрегация. Пресбиопия представляет собой поражение зрения с возрастом или вследствие старости. Симптомы пресбиопии включают снижение способности к фокусировке на близких объектах, переутомление глаз, затруднение чтения мелкого шрифта, усталость при чтении или взгляде на включенный экран, трудность видеть ясно вблизи, меньший контраст при чтении шрифта, необходимость в более ярком и более прямом свете для чтения, необходимость удерживать читаемый материал дальше, чтобы четко его видеть, и головные боли, особенно головные боли при использовании зрения вблизи. Индивиду, страдающие пресбиопией, могут иметь нормальное зрение, но способность фокусироваться на близких объектах по меньшей мере частично теряется со временем, и такие индивиды начинают нуждаться в очках для выполнения задач, требующих зрения вблизи, таких как чтение. Пресбиопия в большей или меньшей степени поражает почти всех индивидов в возрасте старше 40 лет.

Способ подавления прогрессирования формирования катаракты глаза предусматривает, что глаз уже может содержать одну или более развивающихся или полностью развившихся катаракт перед приведением его в контакт с бифункциональными молекулами. Соответственно, способ можно применять для подавления формирования дополнительных катаракт в глазу или для подавления формирования зрелых катаракт из развивающихся катаракт, уже присутствующих в глазу. Альтернативно, в глазу может не быть никаких развивающихся или полностью развившихся катаракт перед приведением его в контакт с бифункциональными молекулами.

Способ обращения прогрессирования формирования катаракты глаза предусматривает достижение, по меньшей мере, от частичного до полного обращения катаракт в глазу посредством приведения в контакт глаза с бифункциональной молекулой согласно настоящему изобретению.

Аналогичным образом, способ подавления прогрессирования пресбиопии глаза предусматривает, что индивид уже может испытывать один или более симптомов пресбиопии перед приведением глаза в контакт с бифункциональной молекулой. Соответственно, способ можно применять для уменьшения прогрессирования испытываемого симптома (симптомов) или для подавления формирования дополнительных симптомов пресбиопии. Альтернативно, глаз может не иметь никаких симптомов пресбиопии перед приведением его в контакт с бифункциональной молекулой.

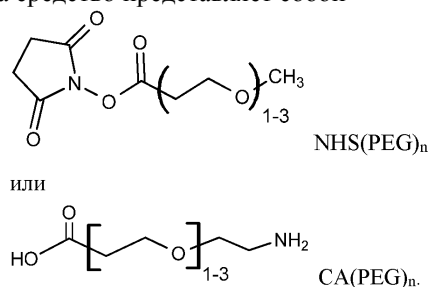
Способ обращения прогрессирования пресбиопии глаза предусматривает, что, по меньшей мере, частичное или полное обращение симптомов пресбиопии в глазу достигают за счет приведения глаза в контакт с бифункциональной молекулой согласно настоящему изобретению.

В рамках настоящего изобретения маскирующее заряд γ -кристаллина средство представляет собой молекулу, подходящую для противодействия электростатическим межбелковым взаимодействиям, таким как электростатические межбелковые взаимодействия γ -кристаллина, которые приводят к агрегации γ -кристаллина. В одном варианте осуществления маскирующее средство не является полипептидом. Маскирующие заряд γ -кристаллина средства предотвращают образование агрегатов γ -кристаллина и/или уменьшают размер ранее образованных агрегатов.

В конкретном варианте осуществления маскирующее заряд γ -кристаллина средство представляет собой бифункциональную молекулу, содержащую функциональную группу, ковалентно связанную с молекулярным ответвлением. Бифункциональная молекула взаимодействует с зарядами на молекулах γ -кристаллина, таких как положительно заряженные остатки лизина и аргинина и отрицательно заряженные остатки глутамата и аспартата. Молекулярное ответвление является гидрофильным, водорастворимым соединением, которое обеспечивает промежуток между молекулами γ -кристаллина, предотвращая агрегацию. Не желая связывать себя теорией, считается, что бифункциональная молекула взаимодействует с белком и эффективно помещает молекулярное ответвление на белок, а функциональная группа может быть вытеснена во время реакции. Молекулярное ответвление, которое может взаимодействовать с кристаллинами через ковалентные, гидрофобные или ионные взаимодействия, предотвращает агрегацию молекул γ -кристаллина. Не желая связывать себя теорией, считается, что бифункциональные молекулы, описанные в данном документе, также могут выступать в качестве ингибиторов взаимодействия β -кристаллина.

Иллюстративные функциональные группы (которыми могут быть, например, замещаемые группы или реакционноспособные группы) в качестве примера включают замещенный или незамещенный амин, сукцинимид, карбоновую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, сульфонилхлорид, альдегид, карбодиимид, ацилазид, ангидрид, фторбензол, карбонат, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, сложный имидоэфир, эпоксид или сложный фторфениловый эфир. На фиг. 1 представлены варианты осуществления функциональных групп, в которых группа R представляет собой молекулярное ответвление. Не желая связывать себя теорией, когда бифункциональная молекула содержит COOH, вода уходит, когда она реагирует с аминогруппой белка. Не желая связывать себя теорией, когда бифункциональная молекула содержит N-гидроксисукцинимид, вода не высвобождается. В реакции NH_2 вода уходит, когда NH_2 реагирует с группой COOH на белке.

Иллюстративные молекулярные ответвления включают линейные или разветвленные полиэтиленгликоли, имеющие от одной до трех оксиэтиленовых групп, модифицированные полиэтиленгликоли, такие как алкокси- и арилоксиполиэтиленгликоли, имеющие от одной до трех оксиэтиленовых, алкоксиэтиленовых или арилоксиэтиленовых групп. В конкретном варианте осуществления бифункциональное маскирующее заряд γ -кристаллина средство представляет собой



В варианте осуществления офтальмическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере вторую бифункциональную молекулу, при этом по меньшей мере вторая бифункциональная молекула содержит замещенный или незамещенный амин, сукцинимид, карбоновую кислоту, изоцианат, изотиоцианат, сульфонилхлорид, альдегид, карбодиимид, ацилазид, ангидрид, фторбензол, карбонат, сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, сложный имидоэфир, эпоксид или сложный фторфениловый эфир, ковалентно связанные со вторым молекулярным ответвлением, при этом второе молекулярное ответвление представляет собой полиэтиленгликоль, алкоксиполиэтиленгликоль или арилоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 4 до 200 оксиэтиленовых, алкоксиэтиленовых или арилоксиэтиленовых групп; поли(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA); поли(2-гидроксиэтил)метакрилат (HEMA); поли(2-оксазилин), поли(m-фосфохолин), полилизин или полиглутаминовую кислоту, при этом второе молекулярное ответвление имеет молекулярную массу от 150 до 8000.

Бифункциональная молекула и по меньшей мере вторая бифункциональная молекула могут присутствовать в любом массовом соотношении, например, от 1:99 до 99:1.

В одном варианте осуществления бифункциональные молекулы, описанные в документе, также полезны при лечении заболеваний, связанных с укладкой белка, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона. В конкретном варианте осуществления при лечении заболеваний, связанных с укладкой белка, бифункциональные молекулы вводят в виде пероральных композиций.

Преимущество маскирующих заряд γ -кристаллина средств, описанных в данном документе, состоит в том, что они, как ожидается, эффективны при наличии посттрансляционных модификаций γ -кристаллинов, включая, например, трансамидирование, окисление, модифицированные и дисфункциональные коннексины, и высоких концентраций неорганических и органических ионов, таких как Ca^{+2} .

Бифункциональные молекулы приводят в контакт с глазом для подавления прогрессирования катаракт и/или уменьшения существующих катаракт или для подавления и/или уменьшения симптомов пресбиопии. В рамках настоящего изобретения термин "приведение глаза в контакт" охватывает способы

непосредственного внесения бифункциональных молекул в глаз. В описанном выше способе можно применять подходящие средства, известные специалистам в данной области, для приведения глаза в контакт с бифункциональными молекулами. Примеры таких способов включают без ограничения введение соединения в глаз посредством инъекции, закапывания или распыления в глаз, внесение с помощью офтальмического устройства, введение посредством ионофореза или иное местное применение на глазу.

В рамках изобретения термин "эффективное подавляющее катаракту количество" означает количество, которое будет подавлять прогрессирующее или формирование катаракт глаза или подавлять прогрессирующее или формирование зрелых катаракт из развивающихся катаракт, уже присутствующих в глазу. Эффективное подавляющее катаракту количество маскирующего заряд γ -кристаллина средства будет зависеть от различных факторов, известных специалистам в данной области техники. Такие факторы включают без ограничения размер глаза, число и прогрессирующее любых полностью развившихся или развивающихся катаракт, уже присутствующих в глазу, и способ введения. Эффективное подавляющее катаракту количество будет также зависеть от того, нужно ли фармацевтическую композицию вводить однократно или ее нужно вводить периодически, на протяжении периода времени. Периодом времени может быть любое количество дней, недель, месяцев или лет. В одном варианте осуществления эффективное подавляющее катаракту количество маскирующего заряд γ -кристаллина средства, в частности бифункциональных молекул, описанных в данном документе, составляет от приблизительно 0,001 г до приблизительно 0,1 г. Более конкретно, эффективное подавляющее катаракту количество может составлять от приблизительно 0,01 г до приблизительно 0,05 г. Иллюстративные количества бифункциональных молекул в офтальмических композициях составляют от 0,00005 до 50 мас.% или выше, например более конкретно от 0,01 до 10 мас.% и наиболее конкретно от 1 до 3 мас.%.

В рамках настоящего изобретения термин "эффективное подавляющее пресбиопию количество" означает количество, которое будет уменьшать симптом пресбиопии глаза или подавлять прогрессирующее дополнительных симптомов пресбиопии в глазу. Эффективное подавляющее пресбиопию количество маскирующего заряд γ -кристаллина средства будет зависеть от различных факторов, известных специалистам в данной области техники. Такие факторы включают без ограничения размер глаза, количество и тип симптомов, уже имеющихся у индивида, и способ введения. Эффективное подавляющее катаракту количество будет также зависеть от того, нужно ли фармацевтическую композицию вводить однократно или ее нужно вводить периодически, на протяжении периода времени. Периодом времени может быть любое количество дней, недель, месяцев или лет. В одном варианте осуществления эффективное подавляющее пресбиопию количество маскирующего заряд γ -кристаллина средства, в частности бифункциональных молекул, описанных в данном документе, составляет от приблизительно 0,001 г до приблизительно 0,1 г. В частности, эффективное подавляющее пресбиопию количество может составлять от приблизительно 0,01 г до приблизительно 0,05 г. Иллюстративные количества бифункциональных молекул в офтальмических композициях составляют от 0,00005 до 50 мас.% или выше, например более конкретно от 0,01 до 10 мас.% и наиболее конкретно от 1 до 3 мас.%.

В рамках настоящего изобретения термин "офтальмическая композиция" относится к фармацевтически приемлемой готовой форме, устройству доставки, механизму или системе, подходящей для введения в глаз. Термин "офтальмические композиции" включает без ограничения растворы, суспензии, гели, мази, спреи, депо-устройства или любой другой тип готовой формы, устройства или механизма, подходящий для краткосрочной или долгосрочной доставки в глаз маскирующих заряд γ -кристаллина средств, например бифункциональных молекул. В отличие, например, от пероральных готовых форм, офтальмические композиции имеют специфические технические характеристики, связанные с их применением на глазах, включая применение фармацевтически приемлемых офтальмических наполнителей, которые не вызывают различных реакций, таких как, например, раздражение конъюнктивы и роговицы, закрытие век, выработка слез и болевые реакции. Конкретные офтальмические композиции преимущественно имеют форму офтальмических растворов или суспензий (т.е. глазных капель), офтальмических мазей или офтальмических гелей, содержащих маскирующие заряд γ -кристаллина средства, например бифункциональные молекулы. В зависимости от конкретной выбранной формы композиции могут содержать различные добавки, такие как буферные средства, изотонирующие средства, солюбилизаторы, консерванты, повышающие вязкость средства, хелатирующие средства, антиоксиданты, антибиотики, сахара и регуляторы pH.

Примеры консервантов включают без ограничения хлорбутанол, дегидроацетат натрия, хлорид бензалкония, хлориды пиридиния, фенетиловые спирты, сложные эфиры парагидроксибензойной кислоты, бензетония хлорид, гидрофильные дигалогенированные сополимеры этиленоксида и диметилэтиленмина, их смеси и тому подобное. Повышающие вязкость средства могут быть выбраны, например, из метилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, поливинилового спирта, карбоксиметилцеллюлозы, хондроитинсульфата и их солей. Подходящие солюбилизаторы включают без ограничения полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло, полиэтиленгликоль, полисорбат 80 и полиоксиэтиленмоностеарат. Типичные хелатирующие средства включают без ограничения эдетат натрия, лимонную кислоту, соли диэтилентриаминпентауксусной кислоты,

диэтилентриаминпентаметилефосфоновой кислоты и стабилизирующие средства, такие как эдетат натрия и гидросульфит натрия.

Иллюстративные буферы включают без ограничения боратные буферы, фосфатные буферы, карбонатные буферы, ацетатные буферы и т.п. Концентрация буфера в офтальмических композициях может варьировать от приблизительно 1 мМ до приблизительно 150 мМ или более в зависимости от конкретного выбранного буфера.

В рамках настоящего изобретения термин "наполнитель" предполагает включение носителя, разбавителя или вспомогательного средства, подходящего для офтальмического применения. "Вспомогательное средство" относится к ингредиенту, который обеспечивает одно или более из объема, придает удовлетворительные технологические характеристики, помогает контролировать скорость растворения и каким-либо иным образом придает композициям дополнительные желательные характеристики. В частности, вспомогательные средства выбирают так, чтобы офтальмическая композиция не вызывала выработку слез, которые будут захватывать активный ингредиент. Приемлемые вспомогательные средства хорошо известны специалисту в данной области, который будет знать, как их выбирать в зависимости от желаемой готовой формы.

В одном варианте осуществления маскирующее заряд γ -кристаллина средство вводят в форме офтальмического устройства, такого как контактная линза или окклюдер слезной точки. Подходящие офтальмические устройства включают биосовместимые устройства с коррекционным, косметическим или терапевтическим свойством.

В одном варианте осуществления маскирующее заряд γ -кристаллина средство может быть приклеено, заключено внутрь или связано с контактной линзой, необязательно в виде композиции с контролируемым высвобождением. Контактная линза может быть изготовлена с использованием известных материалов, например, без ограничения, гидрогелей, силикон-гидрогелей, силиконовых эластомеров и газопроницаемых материалов, таких как полиметилметакрилат (PMMA), полимеры сложных эфиров метакриловой кислоты, сополимеры олигосилоксаналкил(мет)акрилатных мономеров/метакриловой кислоты и т.п. Конкретные примеры материалов для содержащих воду мягких глазных линз включают материалы, описанные в патенте США № 5817726, полимеры 2-гидроксиэтилметакрилата, которые описаны в патенте США № 5905125, материалы для глазных линз, которые описаны в европейской патентной заявке № 781777, гидрогелевую линзу, которая предварительно покрыта липидным слоем, как описано в патенте США № 5942558; все они включены в данный документ благодаря их идеям относительно контактных линз. Можно применять обычно используемые контактные линзы, такие как жесткие, или ригидные, линзы роговичного типа, и гелевые, гидрогелевые, или линзы мягкого типа, которые производят из вышеуказанных известных материалов.

В производстве контактных линз часто различают две основные категории контактных линз: из обычных и силикон-гидрогелей. Обычные гидрогели начинались как поли(гидроксиэтилметакрилат) (поли-ГЭМА) и превратились в полиГЭМА-сополимеры с другими гидрофильными фрагментами, такими как *n*-винилпирролидон (nVP), акриламид, диметилакриламид и метакрилированные фосфорилхолины. Также можно использовать линзы из поливинилового спирта.

Силикон-гидрогели (SiH) обычно состоят из сополимеров метакрилированных или мет(акриламидных) силиконовых мономеров, преполимеров или макромеров с типичными традиционными мономерами гидрогеля. Примеры силиконовых мономеров включают без ограничения тризамещенный, тетразамещенный, заканчивающийся алкилом, метакрилированный полидиметилсилоксан (ПДМС) и блок-сополимеры силиконовых и гидрофильных мономеров. Широко известны триблок-сополимеры АВА, где группа А представляет собой гидрофильный блок, а группа В представляет собой силиконовый мономерный блок. Помимо метакрилатов, в число других реакционноспособных групп входят винил, акриламид или любая другая реакционноспособная группа, способная к цепной реакции полимеризации. Сшивание и полимеризацию также можно достичь путем ступенчатой и других способов полимеризации с использованием мономеров по меньшей мере с бифункциональностью. Примером ступенчатой полимеризации является реакция гидроксильной группы с группой карбоновой кислоты в двух аминокислотах или из терефталевой кислоты и этиленгликоля.

Плазменные способы нанесения покрытия обычно применяют на силиконовых гидрогелях, включая плазменное окисление и плазменное нанесение покрытий.

Композиция замедленного высвобождения маскирующего заряд γ -кристаллина средства может быть получена, например, посредством включения, связывания или приклеивания композиции маскирующего заряд γ -кристаллина средства к контактной линзе в соответствии с известными способами изготовления контактных линз с лекарственными средствами замедленного высвобождения, которые описаны в патентах США № 5658592; 6027745; WO 2003/003073; US 2005-0079197, включенных в данный документ благодаря их идеям относительно контактных линз и замедленного высвобождения, или посредством других подходящих средств. В частности, без ограничения, контактная линза может быть изготовлена посредством приклеивания маскирующего заряд γ -кристаллина средства к части мелкоизмельченного или гелевого средства с замедленным высвобождением, такого как поливинилпирролидон, гиалуро-

нат натрия и т.п. Кроме того, замедленного высвобождения можно достичь путем образования резервуара для композиции маскирующего заряд γ -кристаллина средства, например посредством изготовления контактной линзы из элемента, который образует переднюю поверхность линзы, и элемента, который образует заднюю поверхность линзы.

В одном варианте осуществления маскирующее заряд средство может быть введено во внутриглазную жидкость или в стекловидное тело в виде инъекции с контролируемым высвобождением.

В одном варианте осуществления маскирующее заряд γ -кристаллина средство вводят в окклюдер слезной точки. В рамках настоящего изобретения термин окклюдер слезной точки относится к устройству с размером и формой, подходящими для введения в нижний или верхний слезные каналы глаза соответственно через нижнюю или верхнюю слезные точки.

В одном варианте осуществления маскирующее заряд γ -кристаллина средство вводят посредством ионофореза. Ионофорез представляет собой методику, предусматривающую применение небольшого электрического заряда для доставки лекарства или другого химического вещества через кожу.

В одном варианте осуществления офтальмическую композицию вводят с использованием ультразвукового пункционного датчика.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными далее неограничивающими примерами.

Примеры

Способы.

Последовательности ДНК γ D- и γ S-кристаллина находятся в плаزمиде pQe1, которые были предоставлены King Labs в Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, MA). Последовательности белка γ -кристаллина содержат $6 \times$ N-терминальную гистидиновую метку (His-метка) для очистки. Плазмиды были трансформированы в линию компетентных клеток для клонирования с целью создания дополнительной плазмидной ДНК. В последующем плазмиды были трансформированы в линию компетентных клеток для экспрессии с целью синтеза белка (TAM 1 клеток E.coli (Active Motif, Карлсбад, Калифорния)).

Плазмидная ДНК γ -кристаллина была химически трансформирована в M15pRep клеток E.coli для синтеза белка. 1 л культур выращивали для очистки белка. Белок γ -кристаллин очищали посредством аффинной хроматографии на Ni. N-терминальная His-метка, содержащаяся на белках γ -кристаллина, предпочтительно связывается с Ni колонкой. Связанный белок можно элюировать градиентом имидазола, который конкурентно связывается с Ni, высвобождая очищенный белок. Кратко (как и раньше), процедура очистки состоит в следующем: белок загружали в колонку и промывали сначала 20 mM (0% B), затем 35 mM (10% B), затем 60 mM (20% B) имидазола. Затем белок элюировали при 150 mM (57% B) имидазола. Чистоту подтверждали посредством SDS PAGE гель-электрофореза и жидкостной экспресс-хроматографии белков (FPLC).

Протокол химической модификации.

(1) Для партии очищенного белка проводили замену буфера на PBS, pH 6,8, используя колонку для обессоливания HiTrap™.

(2) Перед добавлением CA(PEG)_n измеряли концентрацию (A₂₈₀).

(3) К 3-5 мл партии указанного выше белка добавляли 100 мг CA(PEG)_n.

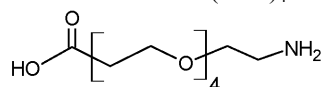
(4) Смесь помещали на встряхиватель при 4 C при 250 об/мин на ночь.

Пример 1. Динамическое рассеяние света немодифицированного белка γ D-кристаллина.

Сначала раствор немодифицированного белка γ D-кристаллина с концентрацией 0,1 мг/мл исследовали посредством DLS. Измеренная коррелятивная функция g₂-1 построена на графике в зависимости от времени задержки (времени запаздывания) и приведена для угла рассеяния, составляющего 30 на фиг. 2. Анализ CONTIN массы разных периодов релаксации приведен на фиг. 3 для углов рассеяния, варьирующих от 30 до 60. Должно быть понятно, что в растворе есть две популяции: одна соответствует агрегатам, а другая соответствует неагрегированному белку. Из результатов анализа этих данных с использованием теории динамического рассеяния света, как показано на фиг. 4, видно, что соответствующий гидродинамический радиус вращения составлял 64 и 1,2 нм соответственно.

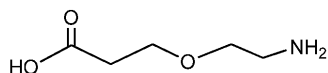
Пример 2. Динамическое рассеяние света белком γ D-кристаллина, модифицированным CA(PEG)₄.

Соответствующие результаты, как и в примере 1 для модификаций CA(PEG)₄ приведены на фиг. 5-7, причем результатом было отсутствие агрегата и размер неагрегированного белка, составлявший 2 нм. Концентрация составляла 0,9 мг/мл белка и 33 мг/мл CA(PEG)₄. CA(PEG)₄ представляет собой



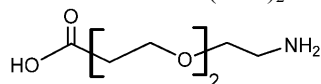
Пример 3. Динамическое рассеяние света белком γ D-кристаллина, модифицированным CA(PEG)₁.

Соответствующие результаты, как и в примере 1 для модификаций CA(PEG)₁ приведены на фиг. 8-10, причем результатом было отсутствие агрегата и размер неагрегированного белка, составлявший 2 нм. Концентрация составляла 0,9 мг/мл белка и 33 мг/мл CA(PEG)₁. CA(PEG)₁ представляет собой



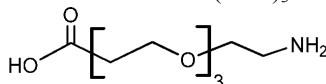
Пример 4. Динамическое рассеяние света белком γ D-кристаллина, модифицированным СА(РЕG)₂.

Соответствующие результаты, как и в примере 1 для модификаций СА(РЕG)₂ приведены на фиг. 11-13, причем результатом было отсутствие агрегата и размер неагрегированного белка, составлявший 2 нм. Концентрация составляла 0,4 мг/мл белка и 15 мг/мл СА(РЕG)₂. СА(РЕG)₂ представляет собой



Пример 5. Динамическое рассеяние света белком γ D-кристаллина, модифицированным СА(РЕG)₃.

Соответствующие результаты, как и в примере 1 для модификаций СА(РЕG)₃ приведены на фиг. 14-16, причем результатом было отсутствие агрегата и размер неагрегированного белка, составлявший 2 нм. Концентрация составляла 0,3 мг/мл белка и 11 мг/мл СА(РЕG)₃. СА(РЕG)₃ представляет собой



Заключение: все СА(РЕG)₁₋₄ являются эффективными средствами, полностью предотвращающими агрегацию белка γ D-кристаллин, что определено с помощью динамического рассеяния света.

Термин "замещенный" в рамках настоящего изобретения означает, что любой один или более атомов водорода на указанном атоме или группе заменен заместителем при условии, что нормальная валентность указанного атома не будет превышена. Иллюстративные заместители включают независимо одну или более алкильных групп, фенильных групп, циклоалкильных групп, галогенов, галогенированных алкильных групп и других и/или их комбинации.

В рамках настоящего изобретения "алкильная группа", отдельно или как часть более крупного фрагмента (алкиламина, алкокси и тому подобное), предпочтительно представляет собой неразветвленную или разветвленную насыщенную алифатическую группу с атомами углерода в количестве от 1 до приблизительно 12, например метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, гексил, гептил или октил, или насыщенную циклоалифатическую группу с атомами углерода в количестве от 3 до приблизительно 12. Алкильные группы необязательно могут быть независимо замещены, например группами, выбранными из C₁-C₁₂алкила, C₆-C₁₄арила, алкокси, амина, сложноэфирных, таких как -COO(R), ацетатных, таких как -O-CO-(R), эфирных, таких как -C-O(R) и -O(C₁-C₁₂алкил), -COOH, галогенов (предпочтительно F, Cl, Br или I), фторированного или перфторированного C₁-C₁₂алкила, -OH, -S(R), -SiO(R₂), -Si(R₃) и т.п., где каждый R независимо представляет собой C₁-C₁₂алкил, C₃-C₁₀циклоалкил или C₆-C₁₄арильную группу.

Термин "циклоалкил" в рамках настоящего изобретения означает насыщенные циклические углеводороды, т.е. соединения, где все атомы кольца являются атомами углерода. Примеры циклоалкила включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклогептил.

В рамках изобретения "арил", отдельно или как часть более крупного фрагмента (например, диариламина), представляет собой карбоциклическую ароматическую группу, предпочтительно содержащую 6-22 атома углерода. Примеры включают без ограничения карбоциклические группы, такие как фенил, нафтил, бифенил и фенантрин, и необязательно могут быть независимо замещены, например, группами, выбранными из C₁-C₁₂алкила, C₆-C₁₄арила, алкокси, амина, сложноэфирных, таких как -COO(R), ацетатных, таких как -O-CO-(R), эфирных, таких как -C-O(R) и -O(C₁-C₁₂алкил), -COOH, галогенов (предпочтительно F, Cl, Br или I), фторированного или перфторированного C₁-C₁₂алкила, -OH, -S(R) и -Si(R₃) и т.п., где каждый R независимо представляет собой C₁-C₁₂алкил, C₃-C₁₀циклоалкил или C₆-C₁₄арильную группу.

Термины "алкокси" в рамках настоящего изобретения означает группу "алкил-О-", где алкил определен выше. Примеры алкоксигруппы включают метокси- или этоксигруппы.

В рамках настоящего изобретения термин амин включает NH₂, а также алкиламины, арилалкиламины и ариламины, т.е. вторичные или третичные алкильные, арильные или арилалкиламиногруппы, где алкильные группы и арильные группы являются такими, как определено выше. Точка присоединения алкиламина, ариламина или арилалкиламина находится на азоте. Примеры включают метиламин, этиламин, пропиламин, изопропиламин, диметиламин, диэтиламин, дипропиламин, этилпропиламин, этилгексиламин, циклогексиламин, фенэтиламин, фенилизопропиламин и т.п. Алкиламины, арилалкиламины и ариламины не ограничены и могут представлять собой, например, C₁-C₂₀алкиламины, C₆-C₂₂арилалкиламины, C₆-C₂₂ариламины.

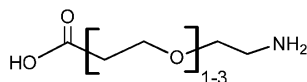
Термины в форме единственного числа не означают ограничение количества, а скорее означают наличие по меньшей мере одного указанного элемента. Термин "или" означает "и/или". Термины "имеющий в своем составе", "имеющий", "включающий" и "содержащий" должны толковаться как открытые термины (т.е. означающие "включающие, но без ограничения"). Все диапазоны, раскрытые в данном документе, являются включающими и комбинируемыми.

Варианты осуществления, описанные в данном документе, включают наилучшие способы, извест-

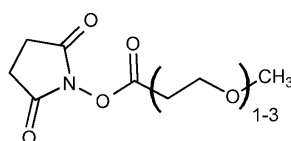
ные авторам изобретения. При прочтении вышеприведенного описания специалистам в данной области техники будут очевидны различные видоизменения таких вариантов осуществления. Предполагается, что квалифицированный специалист будет использовать такие видоизменения, если это необходимо, и предполагается, что описанные способы будут реализованы иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, все изменения и эквиваленты предмета изобретения, перечисленные в прилагаемой формуле изобретения, включены в объем, разрешенном применимым законодательством. Более того, охвачена любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариантах, если в данном документе не указано иное или иным образом явно не следует из контекста.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Офтальмическая композиция, содержащая бифункциональную молекулу, которая представляет собой



или



2. Офтальмическая композиция по п.1, дополнительно содержащая по меньшей мере вторую бифункциональную молекулу, при этом по меньшей мере вторая бифункциональная молекула содержит замещенный или незамещенный амин, или сукцинимид, или карбоновую кислоту, или изоцианат, или изотиоцианат, или сульфонилхлорид, или альдегид, или карбодимид, или ацилазид, или ангидрид, или фторбензол, или карбонат, или сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, или сложный имидоэфир, или эпоксид, или сложный фторфениловый эфир, ковалентно связанные со вторым молекулярным ответвлением, при этом второе молекулярное ответвление представляет собой полиэтиленгликоль, или алкоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 4 до 200 оксиэтиленовых, или алкоксиэтиленовых, или арилоксиэтиленовых групп; или поли(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA); или поли(2-гидроксиэтил)метакрилат (HEMA); или поли(2-оксазиллин), или поли(m-фосфохолин), или полилизин или полиглутаминовую кислоту, при этом второе молекулярное ответвление имеет молекулярную массу от 150 до 8000.

3. Офтальмическая композиция по п.1, при этом офтальмическая композиция представляет собой глазные капли.

4. Офтальмическая композиция по п.1, при этом офтальмическая композиция имеет вид офтальмического раствора, или офтальмической суспензии, или глазной мази, или спрея, или офтальмического геля.

5. Офтальмическая композиция по п.4, при этом офтальмическая композиция дополнительно содержит буферное средство, или изотонирующее средство, или солиubilизатор, или консервант, или повышающее вязкость средство, или хелатирующее средство, или антиоксидант, или антибиотик, или сахар, или регулятор pH или их комбинацию.

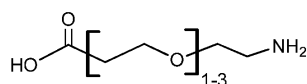
6. Офтальмическая композиция по п.1, при этом офтальмическая композиция содержится в офтальмическом устройстве.

7. Офтальмическая композиция по п.6, при этом офтальмическое устройство имеет форму контактной линзы или окклюдера слезной точки.

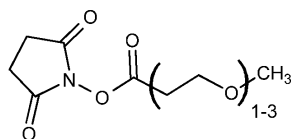
8. Офтальмическая композиция по п.1, при этом офтальмическая композиция представляет собой композицию с замедленным высвобождением.

9. Офтальмическая композиция по п.2, при этом офтальмическая композиция представляет собой композицию с замедленным высвобождением.

10. Способ подавления или обратного развития формирования катаракты, пресбиопии или возрастной дегенерации хрусталика глаза, предусматривающий приведение глаза в контакт с эффективным подавляющим катаракту количеством офтальмической композиции, содержащей бифункциональную молекулу, которая представляет собой



или



11. Способ по п.10, в котором офтальмическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере вторую бифункциональную молекулу, при этом по меньшей мере вторая бифункциональная молекула содержит замещенный или незамещенный амин, или сукцинимид, или карбоновую кислоту, или изоцианат, или изотиоцианат, или сульфонилхлорид, или альдегид, или карбодиимид, или ацилазид, или ангидрид, или фторбензол, или карбонат, или сложный N-гидроксисукцинимидный эфир, или сложный имидозэфир, или эпоксид, или сложный фторфениловый эфир, ковалентно связанные со вторым молекулярным ответвлением, при этом второе молекулярное ответвление представляет собой полиэтиленгликоль, или алкоксиполиэтиленгликоль, или алкоксиполиэтиленгликоль, имеющий от 4 до 200 оксиэтиленовых, или арилоксиэтиленовых групп; или поли(2-гидроксипропил)метакриламид (HPMA); или поли(2-гидроксиэтил)метакрилат (HEMA); или поли(2-оксазилин), или поли(m-фосфохолин), или полилизин, или полиглутаминовую кислоту, при этом второе молекулярное ответвление имеет молекулярную массу от 150 до 8000.

12. Способ по п.10, в котором офтальмическая композиция представляет собой глазные капли.

13. Способ по п.10, в котором офтальмическая композиция имеет вид офтальмического раствора, офтальмической суспензии, глазной мази, спрея или офтальмического геля.

14. Способ по п.13, в котором офтальмическая композиция дополнительно содержит буферное средство, или изотонирующее средство, или солюбилизатор, или консервант, или повышающее вязкость средство, или хелатирующее средство, или антиоксидант, или антибиотик, или сахар, или регулятор pH или их комбинацию.

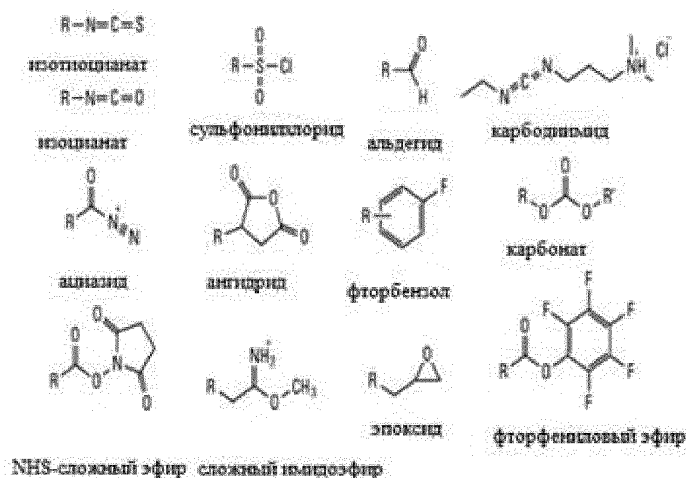
15. Способ по п.10, в котором офтальмическая композиция содержится в офтальмическом устройстве.

16. Способ по п.15, в котором офтальмическая устройство имеет форму контактной линзы или окклюдера слезной точки.

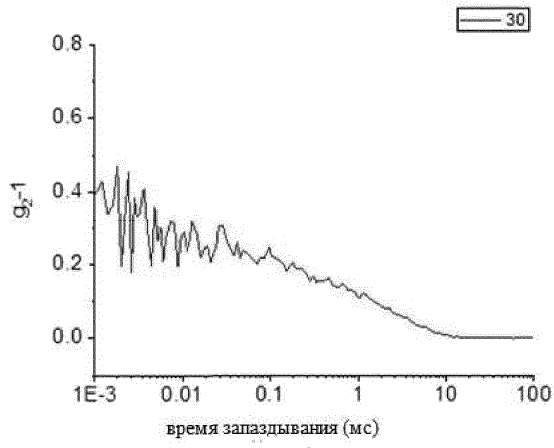
17. Способ по п.10, в котором офтальмическая композиция представляет собой композицию с замедленным высвобождением.

18. Способ по п.11, в котором офтальмическая композиция представляет собой композицию с замедленным высвобождением.

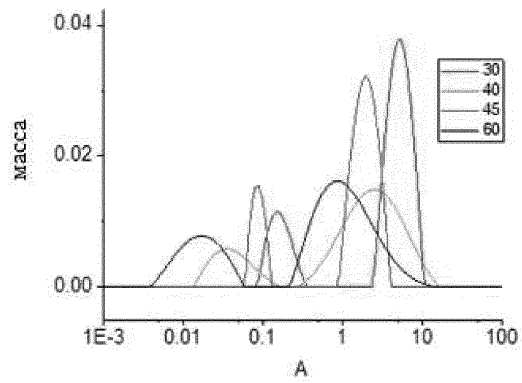
19. Способ по п.10, в котором офтальмическую композицию вводят посредством закапывания, или распыления, или инъекции, или ионофореза, или с использованием ультразвукового пункционного датчика.



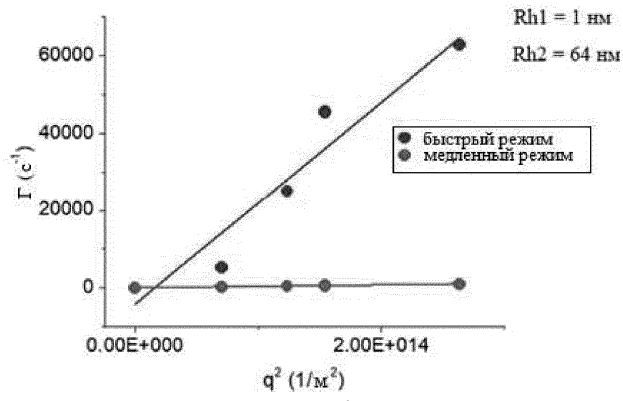
Фиг. 1



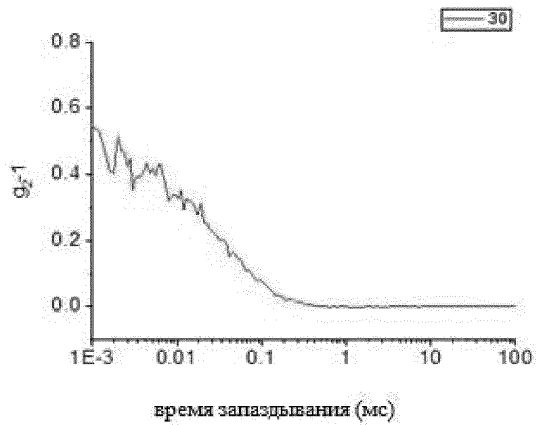
Фиг. 2



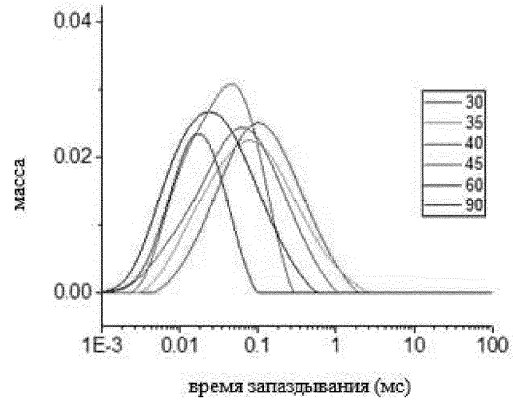
Фиг. 3



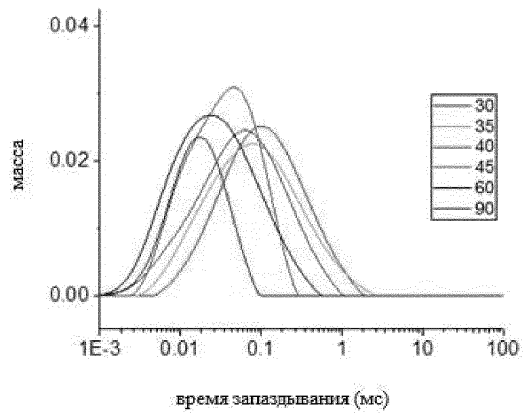
Фиг. 4



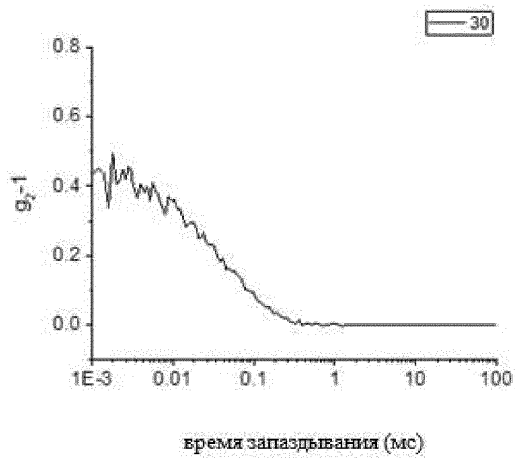
Фиг. 5



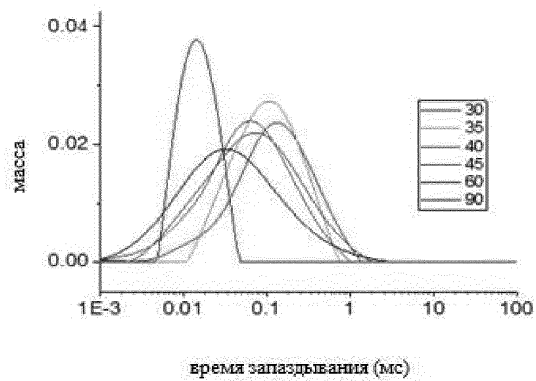
Фиг. 6



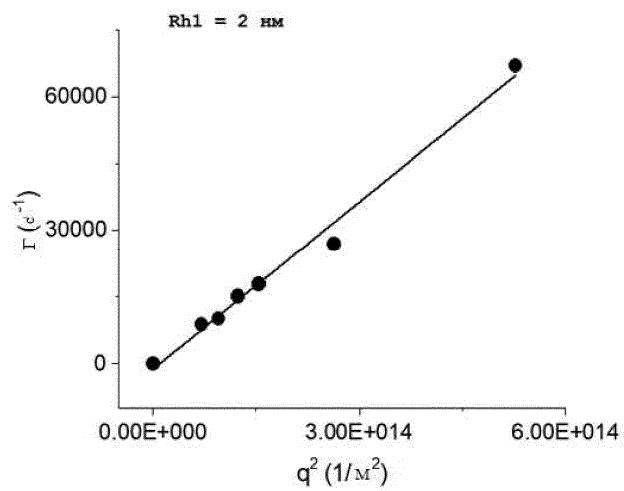
Фиг. 7



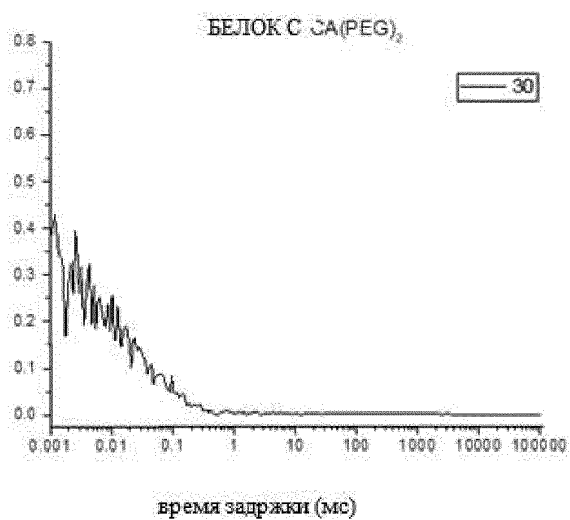
Фиг. 8



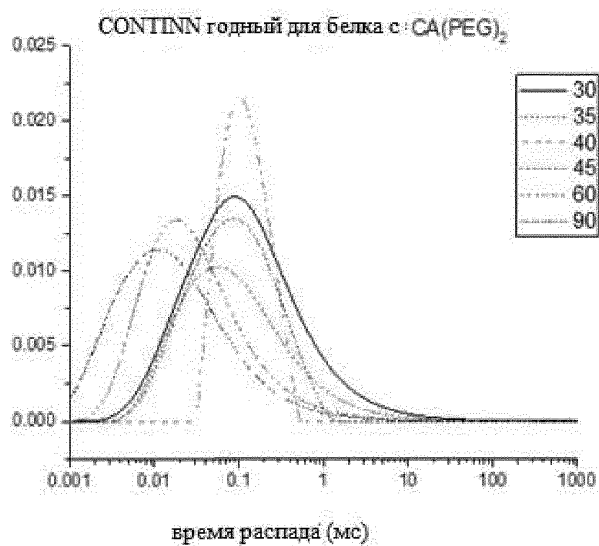
Фиг. 9



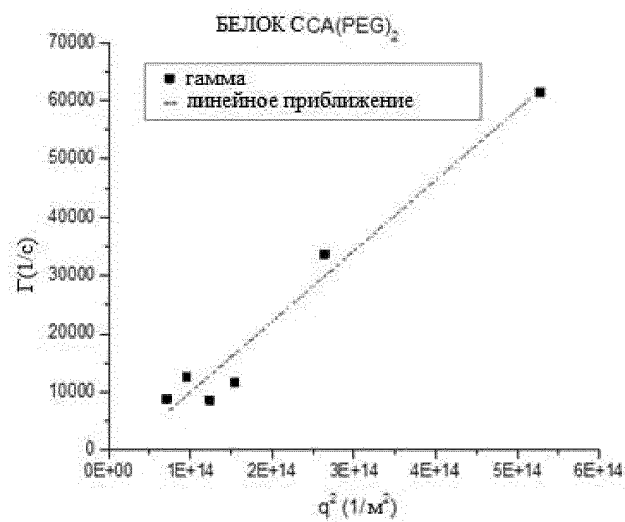
Фиг. 10



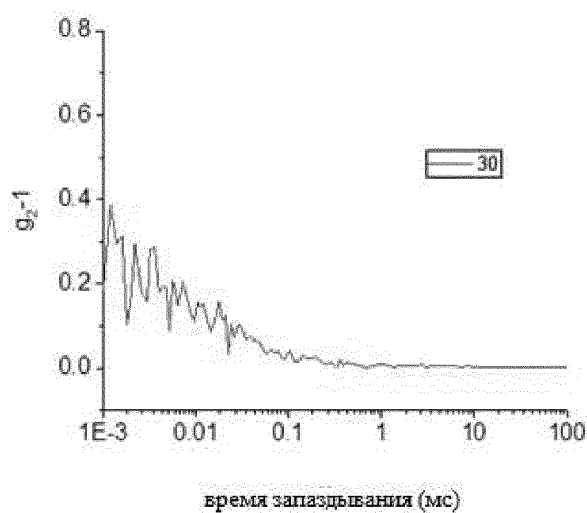
Фиг. 11



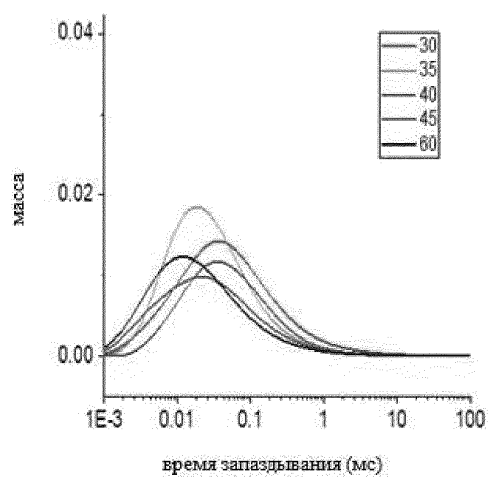
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

