



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 29 406 T2** 2006.03.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 032 401 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 29 406.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/BE98/00183**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 956 724.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/027937**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **10.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.03.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 31/655** (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9700949 **26.11.1997** **BE**

(73) Patentinhaber:

H-PHAR, Gosselies, BE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

(72) Erfinder:

GOLDMAN, Michel, B-1180 Bruxelles, BE;

MARGERIE, Hélène, B-1301 Bièrges, BE;

ROBBERECHT, Adelin, Patrick, B-1170 Bruxelles,

BE; TASSIGNON, Pierre, Jean, B-1170 Bruxelles,

BE; VANDEVELDE, Michel, B-1000 Bruxelles, BE

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER ZELLULÄREN ZYTOKINPRODUKTION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

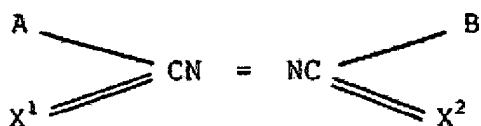
Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

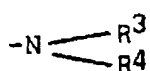
[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur In-vitro-Inhibierung der Produktion von Cytokinen durch Zellen, insbesondere tierische oder menschliche, und ihrer Sekretion.

[0002] Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur In-vitro-Inhibierung der Produktion von Cytokinen durch Zellen zu entwickeln, das diese Zellen nicht gefährdet. Vorteilhafterweise lässt sich durch dieses Verfahren bei diesen Zellen die Produktion und Sekretion von Substanzen hemmen, die das Auftreten von immun-allergischen Phänomenen begünstigen.

[0003] Erfindungsgemäß wurde dieses Problem durch ein Verfahren, wie zu Beginn beschrieben, gelöst, umfassend eine Applikation mindestens eines der Azoderivate der Formel



wobei A eine Carboxylgruppe oder einen Rest



darstellt, B eine Carboxylgruppe oder einen Rest



darstellt, R^1 , R^2 , R^3 und R^4 gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Hydroxygruppe darstellen, R^1 und R^2 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, und R^3 und R^4 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, X^1 und X^2 gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Sauerstoffatom oder einen Rest NR^5 darstellen, wobei R^5 ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Nitrogruppe darstellt und wobei, wenn zwei Reste NR^5 gleichzeitig vorhanden sind, jeder Rest R^5 gleich oder verschieden vom anderen sein kann, sowie ihrer Salze, Ester und Isomere auf diese Zellen.

[0004] Mehrere dieser Azoderivate sind Verbindungen, die insbesondere für ihre antivirale Aktivität, insbesondere gegen Viren der Gruppe der Retroviren, insbesondere das AIDS-Virus (siehe WO-A-9116054 und WO-A-9107876, sowie US-A-5585367), bekannt sind.

[0005] Insbesondere im Hinblick auf 1,1'-Azobisdemethylformamid, das auch als Diamid bezeichnet wird, haben sich zahlreiche Forscher mit dem Phänomen der Aktivierung des intrazellulären Transkriptionsfaktors NF-kappa-B befasst und haben gezeigt, dass das Diamid die Rolle bestimmter Enzyme in der Aktivierungskaskade dieses Faktors blockiert (S. Singh et al., Proteintyrosine ..., The Journal of Biological Chemistry, 270(18), 1995; Brennan et al., Inhibition of NF-kappa-B ..., Biochemical Society Transactions, 24(1), 1996; Brennan et al., The effects of thiol ..., Biochemical Society Transactions, 21(4), 1993).

[0006] Andere Autoren haben gezeigt, dass das Diamid in bestimmten Konzentrationen bei bestimmten Zelllinien eine Apoptose auslöst.

[0007] Wieder andere Autoren haben eine Wirkung des Diamids auf bestimmte Membranrezeptoren gezeigt.

[0008] Keine dieser Studien zeigt allerdings eine inhibitorische Wirkung des Diamids auf die Produktion von Cytokinen durch die beobachteten Zellen. Es kann sogar angeführt werden, dass C. Mendes et al. in Oxidants augment endotoxin – induced activation of alveolar macrophages, SHOGK, Bd. 6, Nr. 3, S. 157–163, 1996, einen nicht signifikanten Anstieg der Produktion des Tumor-Nekrose-Faktors bei der Dosis von 1 mmol feststellen, d.h. eine Wirkung, die der der erfindungsgemäß reproduzierbar auf verschiedene Cytokine festgestellten entgegengesetzt ist.

[0009] Es ist zudem bekannt, dass die erfindungsgemäßen Azoderivate als solche eine extrem schwache Ei-

gentoxizität gegenüber dem menschlichen Körper oder gesunden behandelten Zellen aufweisen.

[0010] Nach einer Ausführungsform der Erfindung umfasst das Verfahren eine In-vitro-Inhibierung der Produktion und Sekretion von Interleukinen durch die Zellen. In der Gruppe von Interleukinen können insbesondere die Interleukine IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-15 genannt werden, und insbesondere wird die Inhibition von IL-2 und IL-5 betrachtet.

[0011] Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst das Verfahren eine Inhibition der Produktion und Sekretion von γ -Interferon (γ -IFN) durch die Zellen. Nach wieder einer anderen Ausführungsform umfasst das Verfahren eine Inhibition der Produktion und Sekretion eines Tumor-Nekrose-Faktors α (α -TNF).

[0012] Nach einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung stellen R_1 bis R_5 in der allgemeinen vorstehend angegebenen Formel jeweils einen aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest dar, der 1–6 Kohlenstoffatome umfasst. Die gegebenenfalls nach der allgemeinen Formel gebildeten Heterocyclen können, neben einem Stickstoffatom, mindestens ein weiteres Heteroatom, beispielsweise Sauerstoff enthalten. Der Heterocyclenrest ist beispielsweise 5- bis 8-gliedrig, vorzugsweise ist er 6-gliedrig. Das erfindungsgemäße Azoderivat kann aus der Gruppe gewählt sein, umfassend Azobisformamidin-Derivate, wie 1,1'-Azobisformamidin, 1,1'-Azobisnitroformamidin, 2,2'-Azobismethylformamidin, 1,1'-Azobisfluorformamidin, 1-Monochlorazobisformamidin und Azobis-[chlorformamidin], Azobisformamid-Derivate, wie 1,1'-Azobisformamid und Dimethylazobisformamid, 1,1'-(Azodicarbonyl)-dipiperidin, 1,1'-(Azodicarbonyl)-dimorpholin, Azodihydroxamsäure und ihre Salze und Azodicarbonsäure und ihre Salze.

[0013] Vorteilhafterweise umfasst das Verfahren eine Applikation des Azoderivats auf die Zellen in einer Dosis, die nicht zu ihrer Apoptose führt. Vorzugsweise kann von einer mikromolaren Konzentration von etwa 0,4 bis etwa 200, vorzugsweise von 2 bis 20, zweckmäßigerweise von 2 bis 10 ausgegangen werden.

[0014] Unter diesem Gesichtspunkt kann 1,1'-Azobisdimethylformamid, auch als Diamid bezeichnet, unter bestimmten Umständen den Nachteil aufweisen, bei bestimmten zu hohen Konzentrationen eine zelluläre Apoptose hervorzurufen, wobei es eine relativ kurze Halbwertszeit von nur einigen Minuten aufweist.

[0015] Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird die Applikation von mindestens einem der angegebenen Azoderivate auf isolierte Zellen von Makroorganismen oder auf Zellen von Mikroorganismen durchgeführt, die beispielsweise aus Zellkulturen stammen. Die behandelten Zellen können auch Zellen eines Organs oder mehrzelligen Gewebes sein, das aus einem menschlichen oder tierischen Körper entnommen wurde, wie beispielsweise Zellen einer Blut- oder Lymphprobe.

[0016] Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird die Applikation von mindestens einem der angegebenen Azoderivate beispielsweise auf isolierte menschliche Cytokine produzierende Blutzellen durchgeführt. Diese Zellen können insgesamt und bereits beim Feststellen von globalen Wirkungen auf die verschiedenen Lymphozyten-Typen, Antigen-präsentierenden Zellen sowie auf Makrophagen in Co-Kulturen extrahiert werden. Ein weitergehender Schritt der Erforschung kann darin bestehen, die Produktion der Cytokine durch stark aufgereinigte Zelllinien, beispielsweise CD4-Lymphozyten, zu messen.

[0017] Die Behandlung der betreffenden Zelllinien kann auch durch Verabreichung von Azoderivaten an lebende Organismen, einschließlich des Menschen, und Messen der verschiedenen Gruppen von Cytokinen in den biologischen Flüssigkeiten, die aus dem menschlichen oder tierischen Körper extrahiert wurden, vor, während und/oder nach der Behandlung, wie auch dem Messen der möglichen Produktion der betreffenden Lymphokinen nach Extraktion der in diesen Flüssigkeiten enthaltenen Zellen erfolgen.

[0018] Auch eine Behandlung von Transplantaten oder Zellgeweben vor ihrer Transplantation in einen menschlichen oder tierischen Körper durch ein erfindungsgemäßes Azoderivat kann in Erwägung gezogen werden.

[0019] Auch die Verwendung von Medikamenten auf der Basis von erfindungsgemäßen Azoderivaten zur Behandlung von Patienten gegen das Abstoßen von Transplantaten kann vorgesehen sein.

[0020] Die Cytokine werden im Organismus durch verschiedene Zellreservoirs produziert.

[0021] Es ist beispielsweise bekannt, dass sich die Lymphozyten auf die spezifische Produktion von Cytokinen spezialisiert haben und dass je nach Typ von produzierten Cytokinen die CD4-Lymphozyten Th1 und Th2

unterschieden werden.

[0022] Cytokine werden auch von den CD8-Lymphozyten (IL-4 und IL-5), aber auch von den Mastozyten und Eosinophilen und im Stadium der Einnistung in den Uterus durch die ektodermalen Zellen des Trophoblasten produziert.

[0023] Diese Produktionen von Cytokinen ausgehend von diesen verschiedenen Zellreservoirien sind am Auftreten von verschiedenen entzündlichen und allergischen Prozessen im weiteren Sinn sowie am Phänomen der Transplantat-Abstossung beteiligt. Unter anderem können auf nicht erschöpfende Weise die folgenden Krankheiten aufgeführt werden: Asthma, atopische Dermatitis, allergische saisonale Rhinitis, Psoriasis, Pemphigus, Thyroiditis, Myasthenie, rheumatoide Polyarthritis, Ig-A-Nephropathie, Sklerodermie, Lupus erythematoses, Insulin-abhängiger Diabetes, multiple Sklerose, entzündliche Krankheiten des Verdauungstrakts, Morbus Crohn, Hypereosinophilie, eosinophiles Syndrom sowie jedes Leiden auf Grund einer durch IL-5 vermittelten Zelloptose.

[0024] Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auf die Zellen allein oder im Gemisch mit anderen erfindungsgemäßen Substanzen oder auch im Gemisch mit anderen Substanzen mit einer anderen Wirkung auf die Zellen appliziert werden. Die Applikation des oder der Wirkstoffe als solcher oder in Form eines Präparats, das mindestens eines der Azoderivate der zuvor angegebenen Formel und einen Träger oder ein entsprechendes Vehikel umfasst, kann vorgesehen sein.

[0025] Bestimmte erfindungsgemäße Verbindungen weisen mindestens ein asymmetrisches C-Atom auf, und folglich sind sämtliche Isomere, einschließlich der Diastereoisomere und der Rotationsisomere oder der Enantiomere, als Teil der Erfindung mit umfasst. Die Erfindung umfasst die D- und die L-Isomere in reiner Form oder im Gemisch, einschließlich racemischer Gemische.

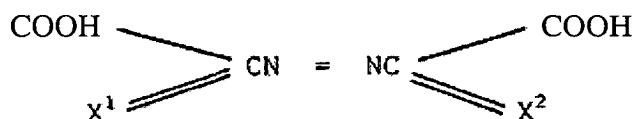
[0026] Bestimmte Verbindungen vom Typ einer Säure, beispielsweise die Carbonsäuren, können beispielsweise mit Metallen oder mit verträglichen Aminen Salze oder mit kompatiblen Alkoholen Ester bilden.

[0027] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von mindestens einem der Derivate der zuvor angegebenen Formel sowie ihrer Salze oder Isomere zur Herstellung von Medikamenten zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe menschlicher oder tierischer Leiden auf Grund einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen. Insbesondere kann die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und/oder Prävention von Autoimmunkrankheiten und/oder entzündlichen Krankheiten unter Beteiligung der T-Lymphozyten, von entzündlichen allergischen Krankheiten oder auch der Allograft- und/oder Xenograft-Abstossung von Organen und der Graft-versus-host-Krankheit nach zellulärem Allograft vorgesehen sein. Vorteilhafterweise ist diese Verwendung demnach zur Herstellung von Medikamenten vorgesehen, die zur Verwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe von Leiden, wie diejenigen, die zuvor genannt wurden, bestimmt sind.

[0028] Das so hergestellte erfindungsgemäße Medikament kann auf jedem geeigneten Weg verabreicht werden, unter anderem oral, sublingual, rektal oder vaginal, durch Injektion oder Perfusion, lokal, transkutan oder transmukosal. Das Medikament enthält eine therapeutisch wirksame Menge des oder der zuvor angegebenen Azoderivate. Die Dosierung schwankt von Individuum zu Individuum als Funktion ihrer eigenen immunologischen Merkmale, die zum Teil genetisch festgelegt sind. Das Medikament kann in jeder beliebigen galenischen geeigneten Form dargereicht werden, beispielsweise in Kapselform, Pillenform, Tablettenform, Drageeform, Pulverform, Injektionsformen, in Form von Cremes, Salben, Systemen, die zur transdermalen Verteilung bekannt sind und in Form von Inhalationsprodukten.

[0029] Die pharmazeutischen Formulierungen und Arzneimittel können pharmazeutisch verträgliche, gebräuchliche Exzipienten sowie gegebenenfalls die in der Pharmazie gebräuchlichen Hilfsstoffe enthalten. Diese Exzipienten und Hilfsstoffe umfassen insbesondere kompatible inerte Füllstoffe, Bindemittel, Sprungmittel, Puffer, Konservierungsstoffe, Antioxidantien, Gleitmittel, Geschmacksstoffe, Verdickungsmittel, Färbungsmittel, Emulgatoren etc..

[0030] Angesichts ihrer ersten Applikation auf therapeutischem Gebiet betrifft ein Gegenstand der Erfindung auch die Azoderivate der zuvor angegebenen allgemeinen Formel, wobei mindestens einer der Reste A und B eine Carboxylgruppe darstellt, sowie ihre Salze, Ester und pharmazeutisch verträglichen Isomere zur Applikation als therapeutisch wirksame Substanzen. Insbesondere werden als Derivate dieses Typs die Azodicarbonsäuren der nachstehenden Formel

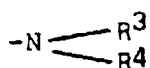


und ihre Salze, Ester und Isomere betrachtet.

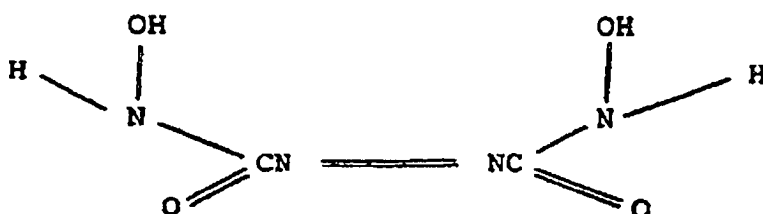
[0031] Ebenso betrifft ein weiterer Gegenstand der Erfindung Azoderivate der allgemeinen vorstehend angegebenen Formel, wobei der Rest A den Rest



darstellt, wobei einer der Reste R^1 und R^2 eine Hydroxygruppe darstellt und der andere ein Wasserstoffatom darstellt, und wobei der Rest B gleichzeitig den Rest

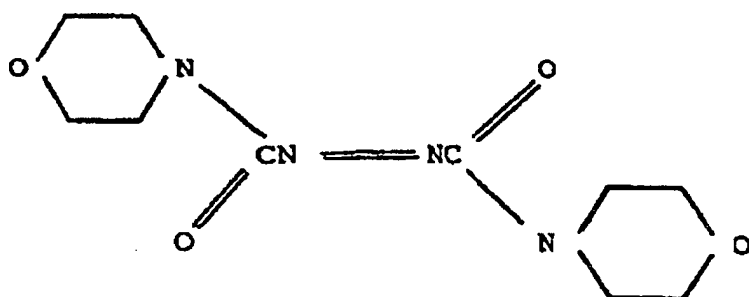


darstellen kann, wobei einer der Reste R^3 und R^4 eine Hydroxygruppe und der andere ein Wasserstoffatom darstellen kann, sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze, Ester und Isomere zur Applikation als therapeutische Wirkstoffe. Insbesondere werden die Azodihydroxamsäure der nachstehenden Formel



und ihre Salze und Isomere betrachtet.

[0032] Gleichermaßen betrifft schließlich ein weiterer Gegenstand der Erfindung 1,1'-(Azodicarbonyl)-dimorpholin der Formel



sowie seine Salze, Ester und Isomere zur Applikation als therapeutische Wirkstoffe.

[0033] Alle diese Substanzen, die erstmalig eine Applikation auf therapeutischem Gebiet besitzen, sind insbesondere zur Anwendung bei der Behandlung oder Prophylaxe menschlicher oder tierischer Leiden auf Grund einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen bestimmt.

[0034] Die Erfindung betrifft außerdem Produkte, die mindestens eines der Azoderivate der zuvor angegebenen Formel und ihrer Isomere und mindestens ein Cytokin enthalten, als Kombinationsprodukt zur gleichzeitigen getrennten oder zeitlich versetzten Verwendung bei der Therapie oder Prophylaxe menschlicher oder tierischer Leiden auf Grund einer pathologischen zellulären Produktion von mindestens einem Cytokin, das sich von dem mindestens einen Cytokin unterscheidet, das in dem Kombinationsprodukt enthalten ist, oder bei der Therapie oder Prophylaxe menschlicher Leiden, die als Sekundärwirkung eine zelluläre pathologische Produktion von mindestens einem Cytokin aufweisen, das sich von dem mindestens einen in dem Kombinationsprodukt enthaltenen Cytokin unterscheidet.

[0035] Weitere Formen und Ausführungsformen der Erfindung sind in den beigefügten Ansprüchen angegeben.

[0036] Die Erfindung wird nun mit Hilfe der zur Erläuterung und nicht zur Einschränkung angegebenen Beispiele ausführlicher erklärt.

[0037] Die in diesen Beispielen beschriebenen Experimente wurden im Laboratoire d'Immunologie Experimentale de l'Université Libre de Bruxelles durchgeführt, mit Ausnahme des Experiments von Beispiel 7, das in den Laboratorien der Fa. UCB S.A. durchgeführt wurde.

Beispiel 1

Auswirkung von ADA auf die IL-5-Produktion

[0038] Mononukleäre periphere Blutzellen (PMBC) von 5 gesunden menschlichen Spendern werden auf die übliche Weise ausgehend von 50 ml ihres Blutes isoliert und werden anschließend durch Dichtegradienten-Zentrifugation (Lymphoprep) gereinigt. Die Zellen (5×10^6 Zellen/ml) werden durch 0,3 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA) aktiviert und 72 h bei 37°C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an ADA (20, 10, 5, 1, 0,2, und 0,04 µg/ml) kultiviert. Das Kulturmedium besteht aus RPMI 1640, angereichert mit 10% fötalem Kälberserum und Glutamin, und enthält Mercaptoethanol. Die ADA-Lösungen werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, wobei die Arbeitskonzentration an DMSO während der Experimente 0,1% beträgt. Letztere werden auf Platten mit 96 Vertiefungen (200 µl/Vertiefung) durchgeführt, und nach Zentrifugation der Platten bei 1500 U/min während 10 min werden die Überstände geerntet und auf ihren Gehalt an IL-5 durch immuno-enzymatische ELISA-Anwendung analysiert. Die Ergebnisse dieses Experiments gehen aus der nachfolgend angegebenen Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1

Gehalt an IL-5 in % des Kontrollversuchs

Konzentration an ADA (µg/ml)	0	0,04	0,2	1	5	10	20
Spender 1	100	83	54	48	44	29	9
Spender 2	100	50	42	29	2	2	2
Spender 3	100	58	63	57	23	28	26
Spender 4	100	46	57	37	31	14	5
Spender 5	100	55	58	49	34	31	7
Durchschnitt	100	58	55	44	27	21	10

[0039] Diese Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich mit nicht behandelten Zellen die PBMC der 5 getesteten Spender in Gegenwart von ADA weniger IL-5 produzierten. Im Durchschnitt ist die Produktion von IL-5 für 20 µg/ml ADA zu 90%, für 10 µg/ml zu 80% und für 0,2 µg/ml zu 45% gehemmt.

[0040] Es muss festgestellt werden, dass dieses das erste Mal ist, dass eine Wirkung von ADA völlig überraschend bei derartig geringen Konzentrationen nachgewiesen wurde.

[0041] In Abwesenheit von Mercaptoethanol wurden vergleichbare Tests mit relativ ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Beispiel 2

Wirkung von ADA auf die Produktion von γ-Interferon

[0042] Ausgehend von den gleichen Zellkulturen wie die in Beispiel 1 verwendeten Zellen wurde die Gegenwart von γ-Interferon nach Behandlung mit den angegebenen ADA-Konzentrationen überprüft. Hier wurde für 4 von 5 Spendern ebenfalls eine Inhibierung festgestellt, wie aus der nachstehenden Tabelle 2 hervorgeht.

Tabelle 2

Gehalt an γ -Interferon in % des Kontrollversuchs

Konzentration an ADA ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,04	0,2	1	5	10	20
Spender 1	100	62	112	87	68	23	21
Spender 2	100	53	111	98	128	169	86
Spender 3	100	99	70	49	62	43	40
Spender 4	100	82	-	-	57	-	25
Spender 5	100	38	-	-	25	-	16
Durchschnitt	100	67	98	78	68	78	38

[0043] In diesen beiden Beispielen hängt die verminderte Produktion von Cytokinen von der eingesetzten Menge an ADA ab (Wirkung ist dosisabhängig), und sie wird für die ADA-Konzentrationen beobachtet, die keine cytotoxischen Wirkungen hervorrufen.

Beispiel 3

Wirkung von ADA auf die Produktion von IL-2, IL-5 und γ -Interferon durch gereinigte T-Lymphozyten.

[0044] PBMC von 3 gesunden Spendern werden durch Dichtegradienten-Zentrifugation (Lymphoprep) gereinigt. Die T-Lymphozyten werden aus 15×10^6 PMBC, inkubiert während 20–30 min in einem Wasserbad bei 37°C mit 0,8 ml eines Gemisches von LymphoKwik® (One Lambda, Inc., CA, USA), erhalten. Dieses ist ein Gemisch von Komplement und spezifischen Antikörpern für die Antigen-Einheiten der Membran der Zellen, die die nicht erwünschten Zellen lysieren (Lymphozyten B, Monozyten, ...). Die Zellen werden zentrifugiert und anschließend zweimal gewaschen. Durch FACS-Analyse wird festgestellt, dass die so hergestellten Kulturen von T-Lymphozyten mehr als 85% CD3 + Zellen enthalten.

[0045] Diese Kulturen werden einer Behandlung mit verschiedenen ADA-Konzentrationen unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 nachstehend angegeben.

Tabelle 3

Konzentration an ADA ($\mu\text{g/ml}$)	0	1	5	10	20
in % bezüglich Kontrolle					
IL-2 (Durchschnitt von 2 Spendern)	100	68	27	9	3
IL-5 (Durchschnitt von 2 Spendern)	100	67	60	40	16
γ -IFN (Durchschnitt von 3 Spendern)	100	82	34	14	4

Beispiel 4

Wirkung von ADA auf die Produktion von IL-2, IL-5 und γ -Interferon durch gereinigte T-Lymphozyten CD4

[0046] Die gereinigten (90% Reinheit) und durch PMA (Phorbolmyristylacetat) + Anti-CD28-Antikörper von gesunden Spendern stimulierten T-Lymphozyten CD4 werden einer Behandlung mit verschiedenen ADA-Konzentrationen unterzogen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 nachstehend angegeben.

Tabelle 4

Konzentration an ADA ($\mu\text{g/ml}$)	0	1	5	10	20
In % bezüglich Kontrolle					
IL-2 (Durchschnitt von 2 Spendern)	100	82	30	18	10
IL-5 (1 Spender)	100	69	45	43	38
γ -IFN (Durchschnitt von 2 Spendern)	100	73	36	15	12
TNF- α (5 Spender)	100	90	48	32	14

[0047] In den Beispielen 3 und 4 werden die Ergebnisse in % unter Berücksichtigung des Mediums ohne ADA als 100% ausgedrückt. Die Konzentrationen, die 100% entsprechen, betragen 90.000 pg/ml IL-2, 1100 pg/ml IL-5, 1900 pg/ml γ -IFN und 2870 pg/ml TNF- α . Die Ergebnisse sind der Durchschnitt unabhängiger ELISA-Messungen.

[0048] Für diese Spender wird festgestellt, dass die Produktion von IL-5, γ -Interferon und TNF- α bei der Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ ADA gehemmt ist. Niedrigere Konzentrationen hemmen bereits die Sekretion von IL-2 durch die Lymphozyten.

[0049] Aus diesen Experimenten geht hervor, dass ADA überraschend auf die Produktion und Sekretion von Cytokinen bei Konzentrationen wirkt, die sehr weit unterhalb derjenigen liegen, die notwendig sind, damit diese Substanz eine Wirkung gegen die Proliferation von HIV-Retroviren in Zellen und gegen die Proliferation von Krebszellen aufweist, was es erlaubt, seinen Einsatz auf therapeutischem Gebiet, auf dem bisher seine Applikation nicht erwartet wurde, ohne Toxizitätsproblem in Erwägung zu ziehen.

Beispiel 5

Wirkung von ADA auf die Produktion von Cytokinen in vivo

[0050] Eine einzige i.p. Injektion von Azodicarbonamid (ADA) in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht oder von einem entsprechenden Träger wurde an BALB/C-Mäuse (Harlan/Zeist, Niederlande) einen Tag vor der i.p. Impfung mit 25 μg Hamster-145-2C11-mAb, ein Anti-Maus-CD₃-mAb-Antikörper, der eine massive Aktivierung polyklonalen T-Zellen in vivo auslöst, die zu einer systemischen Freisetzung von Cytokinen führt, durchgeführt. Seren werden 2, 4, 8 und 24 h nach der Anti-CD₃-Behandlung gesammelt, und die Niveaus an Cytokinen (IL-2, IL-4) werden durch einen ELISA-Test (Genzyme) bestimmt.

[0051] In den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) sind Graphiken dargestellt, wobei die Ordinate die Menge an IL-2 und IL-4 im Serum als Durchschnitt von 5 getesteten Tieren zeigt. Die Abszisse gibt die Zeitpunkte der Blutabnahmen an. Die leeren Balken entsprechen den Ergebnissen, die mit dem Träger erhalten wurden, und die grauen Balken entsprechen denjenigen, die mit einer ADA-Vorbehandlung erhalten wurden.

[0052] Aus diesem Test und den erläuternden [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) geht eindeutig hervor, dass die Behandlung mit ADA eine signifikante Reduktion der Freisetzung der Interleukine IL-2 und IL-4 nach Injektion von 145-2C11 mAb in Mäusen hervorruft.

Beispiel 6

Wirkung von ADA auf die Abstoßung von allogenen Transplantaten

[0053] Haut-Transplantate, die für ihre Abhängigkeit gegenüber T-Zellen bekannt sind, werden aus den Schwänzen weiblicher C57BL/6.CH-2^{bm12}-Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) hergestellt. Sie werden auf die Flanken einer C57BL/6-Maus (Harlan, Zeist, Niederlande) transplantiert. Um das Loch wird ein Verband aufgebracht. Dieser Verband wird nach 10 Tagen abgenommen, und die Transplantate werden jeden Tag kontrolliert. Die Versuchsmäuse erhielten täglich eine i.p. Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht ADA, und die Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge des entsprechenden Trägers, bis eine akute Abstoßung festgestellt wurde.

[0054] Auf der Graphik der [Fig. 3](#) ist auf der Ordinate das Überleben des Hauttransplantats in % und auf der Abszisse die Anzahl der Tage nach der Transplantation angegeben.

[0055] Es kann festgestellt werden, dass die Abstoßung des Haut-Allotransplantats bei den Mäusen, die mit ADA behandelt wurden (schwarze Dreiecke), bezogen auf die Kontrolle (schwarze Kreise) signifikant verzögert war, was bestätigt, dass ADA auch in vivo suppressorische Wirkungen auf die T-Zellen ausübt.

Beispiel 7

[0056] 200 ml Blut auf Heparin werden gesunden männlichen und weiblichen Freiwilligen entnommen. Mononukleäre Zellen werden durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation isoliert und in einem Medium, bestehend aus RPMI 1640, angereichert mit 5% autologem Serum von 1 mM Glutamin, 1001 IU/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 10 µg/ml Phytohämagglutinin (pha), 10 µg/ml Phorbolmyristylacetat (pma), und Testverbindungen wie in jedem einzelnen Experiment angegeben, bei einer Zelldichte von 2.000.000/ml suspendiert. Die Zellen werden in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen bei 250 µg pro Vertiefung ausgesät, und man lässt sie 48 h bei 37°C inkubieren. Anschließend werden die Überstände geerntet, und die Konzentrationen an IL-2 und IL-5 werden durch Standard-ELISA unter Verwendung der Biotin-Streptavidin-Technik quantifiziert. Als Variante wurde das pha durch 0,1 µg/ml monoklonale Antikörper gegen menschliche CD3 ersetzt, derart, dass eine spezifischere Aktivierung von T-Zellen erhalten wird.

Tabelle 5

Test- verbindungen	Anzahl von Tests	Inhibierung von IL-2 (%)		Inhibierung von IL-5 (%)	
		10 µM	32 µM	10 µM	32 µM
A	9	3	28	12	29
B	6	0,2	11	17	39
C	5	6	9	37	51

- A = Diamid
 B = 1,1'-(Azodicarbonyl)-dipiperidin
 C = 1,1'-(Azodicarbonyl)-dimorpholin

Beispiel 8

Wirkung von ADA auf die In-vivo-Produktion von γ -Interferon

[0057] Brown-Norway-Ratten werden mit Ovalbumin aktiv sensibilisiert, 21 Tage später werden die Ratten durch ein Aerosol mit einer Ovalbumin-Lösung von 5% in 0,9% NaCl behandelt. 24 h später wird die bronchiale Reaktivität auf Metacholin an den anästhesierten Ratten gemessen. Sofort am Ende der Messung der bronchialen Reaktivität werden diesen Ratten Splenozyten entnommen und zur Bestimmung der γ -IFN-Produktion durch diese Zellen kultiviert.

[0058] ADA wird 24 h nach Beginn der Sensibilisierungsphase gegenüber Ovalbumin und täglich während der gesamten Dauer des Tests mit Ausnahme an dem Tag der Messungen verabreicht. ADA wird oral zweimal täglich in Suspension in 1% Methylcellulose in einer Dosis von 500 mg/kg und 1000 mg/kg Körpergewicht verabreicht.

[0059] Die Ergebnisse sind in [Fig. 4](#) zusammengefasst. Auf der Ordinate sind die Mengen an γ -IFN in pg/mg Protein angegeben. Auf der Abszisse entsprechen die leeren Balken A–F den folgenden Experimenten:

- A – keine Stimulierung gegenüber Ovalbumin, keine aktive Substanz
- B – keine Stimulierung gegenüber Ovalbumin, ADA bei 500 mg/kg p.o.
- C – keine Stimulierung gegenüber Ovalbumin, ADA bei 1000 mg/kg p.o.
- D – Stimulierung gegenüber Ovalbumin, keine aktive Substanz
- E – Stimulierung gegenüber Ovalbumin, ADA bei 500 mg/kg p.o.
- F – Stimulierung gegenüber Ovalbumin, ADA bei 1000 mg/kg p.o.

[0060] Aus diesem Test geht eindeutig hervor, dass ADA auf die γ -IFN-Produktion durch die Splenozyten von Ratten, die behandelt wurden, um eine starke bronchiale Reaktivität zu zeigen, eine inhibitorische Wirkung hervorruft.

Beispiel 9

Kapseln zur oralen Verabreichung

[0061] Zusammensetzung einer Kapsel:

500 mg ADA
 10 mg Glycerinmonostearat
 10 mg ausgefälltes Siliciumdioxid
 5 mg Magnesiumstearat

[0062] Diese Zusammensetzung wird auf die übliche Weise in Gelatinekapseln eingebracht. Beispielsweise kann eine Verabreichung von Kapseln in zunehmender Dosis (max. 100 mg/kg/Tag) an Patienten, die ein Nierentransplantat oder ein anderes Allotransplantat (Herz, Lunge, Leber, etc., ...) erhalten, in den der Transplantation vorausgehenden 72 h oder später vorgesehen sein, um die akute Abstoßungsphase zu reduzieren oder zu unterdrücken. Eine häufige Kontrolle der IL-2-Produktion durch die Patienten wird empfohlen. Die Kapseln werden allein oder zusammen mit Cyclosporin und Corticosteroiden oder mit jeder anderen geeigneten immunsuppressiven Behandlung verabreicht.

Beispiel 10

Überzogene Tabletten

[0063] Tabletten, die 250 mg Azobisformamidin enthalten, werden auf die übliche Weise mit Hilfe der folgenden Exzipientien hergestellt: Hydroxypropylmethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Titandioxid, Polyethylenglycol 400, schwarzes Eisenoxid.

[0064] Diese Tabletten können verabreicht werden, um die Produktion von IgE auf Grund der Verminderung von IL-5 bei den allergischen Phänomenen (beispielsweise saisonale allergische Rhinitis) angemessen zu reduzieren. Diese Behandlung wird eingeführt, um eine Remission und ihre Beibehaltung zu erhalten.

Beispiel 11

Form zur Injektion

[0065] Eine injizierbare Form wird auf der Grundlage von 1 g Dimethylazobisformamid und pyrogenfreiem destilliertem Wasser mit NaCl-Zusatz durchgeführt.

[0066] Diese Formen sind beispielsweise zur Verabreichung in den Phasen der akuten Anstiege der Autoantikörper-Produktion (Autoimmun-Krankheiten, Lupus erythematodes, autoimmune Diabetes, autoimmune Thyroiditis, etc., ...) ausgelegt, immer unter Berücksichtigung, dass sich die Verbesserung gewöhnlich mit einer Verzögerung von 6 bis 8 Wochen feststellen lässt.

Beispiel 12

Creme oder Salbe

[0067] Eine Creme oder eine Salbe wird mit 1,1'-Azobis-[chlorformamidin] (Chloroazodin) und als Exzipiens insbesondere Glycerin, Paraffinöl, Vaseline hergestellt.

[0068] Diese Creme kann lokal als Immunmodulator bei Sklerodermie aufgebracht werden.

Beispiel 13

[0069] Es können auch transdermale Methylazobisformamid-Verteilungssysteme vorgesehen sein.

[0070] Diese Systeme können so aufgebracht werden, dass eine anhaltende Reduktion der Lymphokine erhalten wird, die in Patienten zirkulieren, die an schwer zu kontrollierendem Asthma leiden.

[0071] Diese Behandlung kann mit der Verwendung von herkömmlichen Behandlungen kombiniert werden.

Beispiel 14

Tabletten zur oralen Verabreichung

[0072] Zusammensetzung einer Tablette:

100 mg ADA

10 mg Glycerinmonostearat

10 mg ausgefälltes Siliciumdioxid

5 mg Magnesiumstearat

[0073] Diese Zusammensetzung wird auf die übliche Weise in eine Komprimiervorrichtung eingebracht.

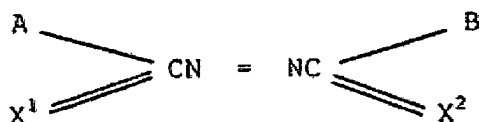
[0074] Im Rahmen einer Behandlung, beispielsweise von Krebs, kann eine Verabreichung von IL-2 an den Patienten vorgesehen sein. Der sehr hohe Gehalt an IL-2 im Körper des so behandelten Patienten hat die Wirkung der Stimulierung einer Überproduktion dieses Letztgenannten gegenüber anderen Cytokinen, und insbesondere von IL-5, durch die Zellen, was Sekundärwirkungen nach sich zieht, wie Pemphigus, Thyroiditis, rheumatoide Polyarthrit, Morbus Crohn, Sklerodermie, Hypereosinophilie, etc. ..

[0075] Folglich kann zusammen mit der Verabreichung von IL-2 die regelmäßige Einnahme von ADA-Tabletten vorgesehen sein, um diesen Sekundärwirkungen entgegen zu wirken.

[0076] Die Verabreichung von IL-2 und ADA kann gleichzeitig, getrennt oder zeitlich versetzt erfolgen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur In-vitro-Inhibierung der Produktion von Cytokinen durch Zellen, insbesondere tierische oder menschliche, und ihrer Sekretion, umfassend eine Applikation mindestens eines der Azoderivate der Formel



wobei A eine Carboxylgruppe oder einen Rest -NR¹R² darstellt, B eine Carboxylgruppe oder einen Rest -NR³R⁴ darstellt, R¹, R², R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Hydroxygruppe darstellen, R¹ und R² miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, und R³ und R⁴ miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, X¹ und X² gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Sauerstoffatom oder einen Rest NR⁵ darstellen, wobei R⁵ ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Nitrogruppe darstellt und wobei, wenn zwei Reste NR⁵ gleichzeitig vorhanden sind, jeder Rest R⁵ gleich oder verschieden vom anderen sein kann, sowie ihrer Salze, Ester und Isomere auf diese Zellen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Inhibierung der Produktion und der Sekretion von Interleukinen umfasst.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Inhibierung der Produktion und der Sekretion eines Cytokins, ausgewählt aus γ -Interferon und dem Tumor-Nekrose-Faktor α , umfasst.

4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ bis R⁵ jeweils einen aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen darstellen.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Azoderivat aus Azobisformamidinderivaten wie 1,1'-Azobisformamidin, 1,1'-Azobisnitroformamidin, 2,2'-Azobismethylformamidin, 1,1'-Azobisfluorformamidin, 1-Monochlorazobisformamidin und Azobis(chlorformamidin), Azobisformamidderivaten wie 1,1'-Azobisformamid und Dimethylazobisformamid, 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin, 1,1'-(Azodicarbonyl)dimorpholin, Azodihydroxamsäure und ihren Salzen und Azodicarbonsäure und ihren Salzen, ausgewählt ist.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Applikation des Azoderivats auf die Zellen in einer Dosis umfasst, die nicht deren Apoptose induziert.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Applikation des Azoderivats auf die Zellen in einer Konzentration von 0,4 bis 200 Mikromol umfasst.

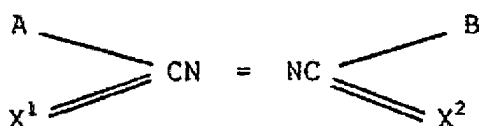
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Applikation des Azoderivats auf die Zellen in einer Konzentration von 2 bis 20 Mikromol, vorzugsweise von 2 bis 10 Mikromol, umfasst.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es die Applikation einer Zusammensetzung, enthaltend mindestens eines der Azoderivate und einen geeigneten Träger, umfasst.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die Applikation auf isolierte Zellen von Makroorganismen oder Zellen von Mikroorganismen umfasst.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es die Applikation auf Zellen eines Organs oder multizellulären Gewebes, das aus einem menschlichen oder tierischen Körper entnommen ist, umfasst.

12. Verwendung mindestens eines der Azoderivate der Formel



wobei A eine Carboxylgruppe oder einen Rest -NR¹R² darstellt, B eine Carboxylgruppe oder einen Rest -NR³R⁴ darstellt, R¹, R², R³ und R⁴ gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder

eine Hydroxygruppe darstellen, R^1 und R^2 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, und R^3 und R^4 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, X^1 und X^2 gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Sauerstoffatom oder einen Rest NR^5 darstellen, wobei R^5 ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Nitrogruppe darstellt und wobei, wenn zwei Reste NR^5 gleichzeitig vorhanden sind, jeder Rest R^5 gleich oder verschieden vom anderen sein kann, sowie ihrer Salze, Ester und Isomere, zur Herstellung von Medikamenten zum Einsatz in der Behandlung oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen infolge einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen, mit Ausnahme viraler Erkrankungen.

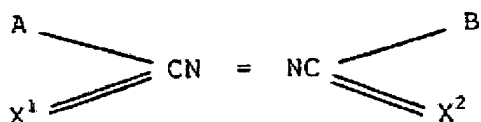
13. Verwendung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das so hergestellte Medikament eine therapeutisch wirksame Menge mindestens eines der Azoderivate oder ihrer Salze, Ester und Isomere sowie einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

14. Azoderivate der Formel des Anspruchs 1, wobei mindestens einer der Reste A und B eine Carboxylgruppe darstellt, sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze, Ester und Isomere zur Applikation als therapeutische Wirkstoffe zum Einsatz in der Behandlung oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen infolge einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen.

15. Azoderivate der Formel des Anspruchs 1, wobei der Rest A den Rest $-NR^1R^2$ darstellt, einer der Reste R^1 und R^2 eine Hydroxygruppe und der andere ein Wasserstoffatom darstellt und wobei der Rest B gleichzeitig den Rest $-NR^3R^4$ darstellen kann, einer der Reste R^3 und R^4 eine Hydroxygruppe und der andere ein Wasserstoffatom darstellen kann, sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze, Ester und Isomere zur Applikation als therapeutische Wirkstoffe zum Einsatz in der Behandlung oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen infolge einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen.

16. Azoderivate der Formel des Anspruchs 1, wobei X^1 und X^2 ein Sauerstoffatom darstellen und $-NR^1R^2$ sowie $-NR^3R^4$ jeweils einen 6-gliedrigen Heterocyclus, der zusätzlich ein Sauerstoffatom in Position 4 enthält, darstellen, sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze, Ester und Isomere, zur Applikation als therapeutische Wirkstoffe zum Einsatz in der Behandlung oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen infolge einer pathologischen zellulären Produktion von Cytokinen.

17. Präparat, enthaltend mindestens eines der Azoderivate der Formel



wobei A eine Carboxylgruppe oder einen Rest $-NR^1R^2$ darstellt, B eine Carboxylgruppe oder einen Rest $-NR^3R^4$ darstellt, R^1 , R^2 , R^3 und R^4 gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Hydroxygruppe darstellen, R^1 und R^2 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, und R^3 und R^4 miteinander verbunden sein können, um mit ihrem benachbarten Stickstoffatom einen heterocyclischen Ring zu bilden, X^1 und X^2 gleich oder verschieden sind und jeweils unabhängig ein Sauerstoffatom oder einen Rest NR^5 darstellen, wobei R^5 ein Wasserstoff- oder Halogenatom, einen gegebenenfalls substituierten aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffrest oder eine Nitrogruppe darstellt und wobei, wenn zwei Reste NR^5 gleichzeitig vorhanden sind, jeder Rest R^5 gleich oder verschieden vom anderen sein kann, sowie ihre Salze, Ester oder Isomere, dadurch gekennzeichnet, dass es zudem mindestens ein Cytokin umfasst, als Kombinationspräparat für eine gleichzeitige, getrennte oder zeitlich versetzte Verwendung in der Therapie oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen infolge einer pathologischen zellulären Produktion mindestens eines Cytokins, das sich von dem mindestens einen, in dem Kombinationspräparat enthaltenen Cytokin unterscheidet, oder in der Therapie oder der Prophylaxe von menschlichen oder tierischen Erkrankungen, die als Nebeneffekt eine pathologische zelluläre Produktion mindestens eines Cytokins, das sich von dem mindestens einen in dem Kombinationspräparat enthaltenen Cytokin unterscheidet, aufweisen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

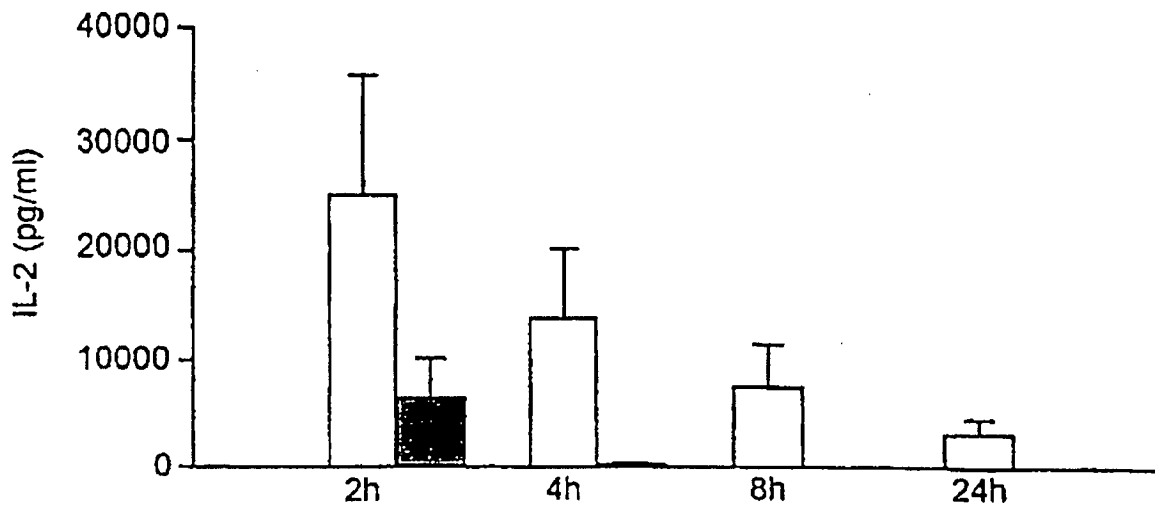


Fig. 1.

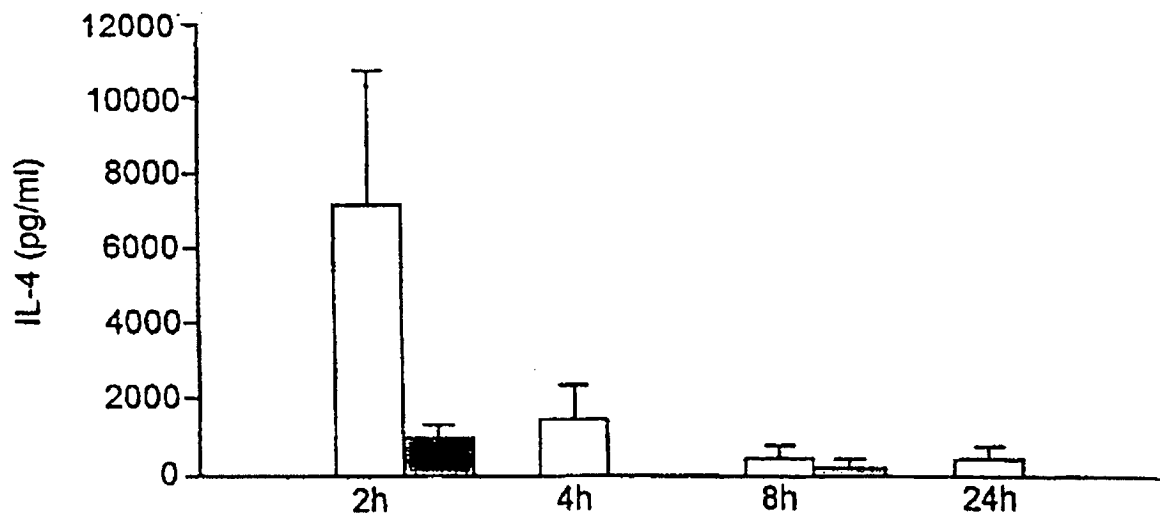


Fig. 2.

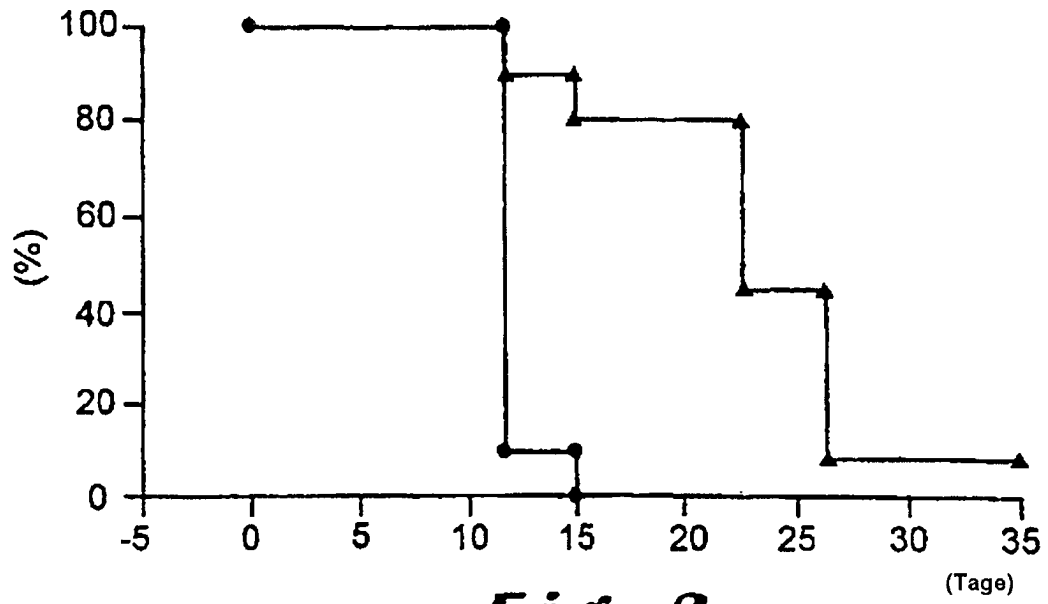


Fig. 3

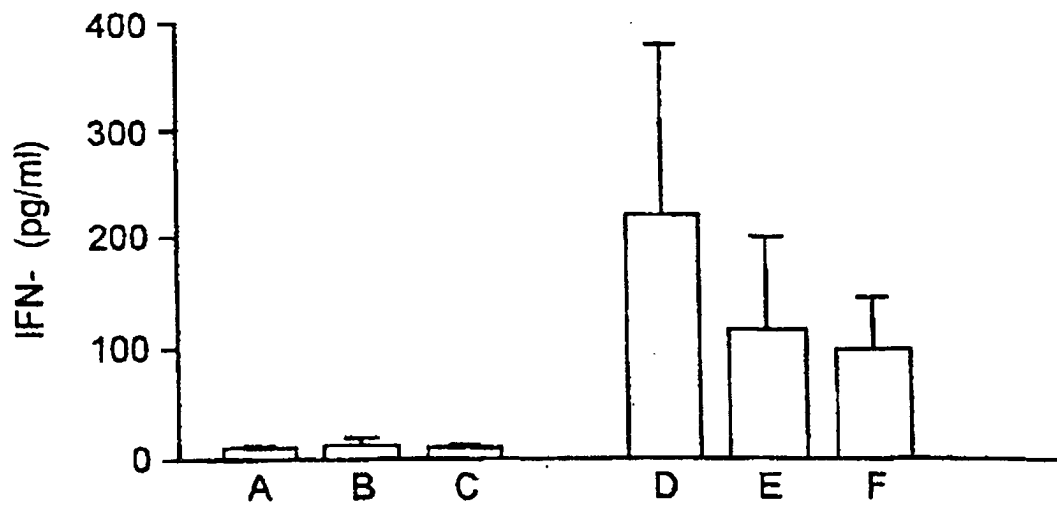


Fig. 4