



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102018000009384
Data Deposito	11/10/2018
Data Pubblicazione	11/04/2020

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	Q	19	08
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	9	06
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	36
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	32
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	14
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	38	18
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	8	37
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	8	04
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	8	73
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	8	81

Titolo

Peptide for cosmetic application

TITOLO

Peptide per applicazioni cosmetiche

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un peptide per applicazioni cosmetiche. In particolare, la presente invenzione riguarda il peptide avente Seq. ID No. 1 in grado di ridurre l'invecchiamento cutaneo e il foto-invecchiamento. Più in particolare, la presente invenzione riguarda anche una composizione cosmetica costituita dal peptide con Seq. ID n. 1 e almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile.

SFONDO DELL'INVENZIONE

Il fattore di crescita nervosa (NGF) è un fattore neurotrofico e neuropeptide principalmente coinvolto nella regolazione della crescita, del mantenimento, della proliferazione e della sopravvivenza di alcuni neuroni bersaglio.

L'NGF è stato scoperto dalla Prof.ssa Rita Levi-Montalcini, presso lo Zoology Institute della Washington University of St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966), e la sua scoperta ha rappresentato un notevole progresso nello studio dei meccanismi di crescita e differenziazione della cellula nervosa, in quanto l'NGF è in grado di influenzare lo sviluppo e la conservazione delle funzioni biologiche dei neuroni e la loro rigenerazione. Per la scoperta di questa molecola, e per averne caratterizzato la funzione biologica sia nel sistema nervoso periferico che centrale, nel 1986 la Prof.ssa R. Levi-Montalcini ha ricevuto il Premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia.

Numerosi studi in vitro e in vivo hanno dimostrato l'importanza fisiopatologica del NGF nella prevenzione dei danni neuronali di natura chirurgica, chimica, meccanica e ischemica, rendendolo il candidato ideale per il trattamento di diverse condizioni del sistema nervoso centrale e periferico (Hefti F., J. Neurobiol., 25: 1418, 1994; Fricker J., Lancet, 349:480, 1997). Infatti, da molti anni fa sono stati effettuati studi clinici su pazienti affetti da morbo di Parkinson e morbo di Alzheimer, mediante somministrazione intracerebrale di NGF murino (vedi, ad esempio, Olson L. et al., J. Neural Trans...: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). I risultati di questi studi hanno confermato le osservazioni fatte in modelli animali e hanno mostrato l'assenza di possibili effetti collaterali a seguito della somministrazione di NGF murino. Questa caratteristica è stata

successivamente confermata per l'NGF ricombinante umano (Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994).

Questi eventi sono mediati da NGF come risultato del legame con i suoi due recettori cellula-superficie, TrkA e p75. La co-espressione dei due geni per il
5 recettore p75 e il recettore Trk NGF può potenzialmente portare ad una maggiore reattività all'NGF, e suggerisce ulteriori livelli di regolazione per la famiglia dei fattori neurotrofini (Chao MV, Hempstead BL., "p75 e Trk: un sistema a due recettori", Trends Neurosci. 1995;18:321-6). I neuroni sensoriali dell'embrione di pulcino mostrano due diverse classi di recettori della neurotrofina, p75 e Trk, con
10 costanti di dissociazione rispettivamente di 10^{-9} M e 10^{-11} M, il che implica che per mediare le azioni biologiche delle neurotrofine è richiesta soltanto una bassa occupazione del recettore a maggiore affinità (Meakin SO, Shooter EM, "The nerve growth factor family of receptors", Trends Neurosci. 1992;15:323-31).

TrkA è un recettore con attività tirosina chinasi che forma un sito di legame ad alta
15 affinità per NGF.

p75 è una proteina transmembrana senza dominio catalitico citoplasmatico identificabile appartenente alla superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF) che forma un sito di legame a bassa affinità per NGF.

Le pubblicazioni di brevetto internazionali WO200404026329A1,
20 WO201111116090, WO2011049758A1 e WO2005019266A2 si riferiscono a peptidi o anticorpi che interagiscono o si legano al fattore di crescita dei nervi umani (NGF) e neutralizzano la funzione dell'NGF e al loro utilizzo nella prevenzione e/o trattamento di varie malattie e disturbi in cui l'attività dell'NGF è dannosa, comprese le scottature solari e la vitiligine.

Contrariamente a quanto suggerito dalle pubblicazioni brevettuali sopra citate, la
25 pubblicazione internazionale WO2013065065078A2 ha rivelato che la somministrazione topica sulla pelle di preparati contenenti NGF è efficace per ottenere un'intensificazione del colore della pelle, cioè un aumento della pigmentazione, nel caso di pelle sana, non affetta da discromatosi, nonché un
30 miglioramento delle condizioni dermatologiche che coinvolgono acromia o ipocromia cutanee, come nel caso della vitiligine.

Il frammento peptidico contenente la sequenza 1-14 del NGF umano (NGF1-14) è conosciuto nell'arte come NGF mimetico, come descritto in alcuni riferimenti di

letteratura (P. Di Pietro et al., "Immobilization of Neurotrophin Peptides on Gold Nanoparticles by Direct and Lipid-Mediated Interaction: A New Multipotential Therapeutic Nanoplatfrom for CNS Disorders", ACS Omega (2017), 2(8), 4071-4079 e C. Satriano et al., "Neurotrophin-micking peptides at the biointerface with gold respond to copper ion stimuli", Physical Chemistry Chemical Physics (2016), 18(44), 30595-30604).

D'altra parte, è stato dimostrato che l'NGF1-14 interagisce solo con il recettore TrkA, in particolare con l'attivazione della cascata PI3/Akt e della fosforilazione CREB, senza essere in grado di interagire con il recettore p75 e di indurre la fosforilazione ERK1/2 (A. Travaglia et al., " A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells ", ACS Chem Neurosci. 2015 19 agosto; 6(8):1379-92). Infine, WO99/39728 ha descritto che p75 promuove l'apoptosi di cheratinociti e melanociti quando attivato da solo, mentre invece promuove la sopravvivenza cellulare quando attivato insieme ai recettori della famiglia Trk.

RIEPILOGO DELL'INVENZIONE

Partendo dalle conoscenze derivate dallo stato dell'arte, a volte contraddittorie, la Richiedente ha studiato il potenziale utilizzo dell'NGF1-14 per applicazioni cosmetiche.

NGF1-14 è rappresentato dalla seguente sequenza:

Seq. ID No. 1 : SSSHPIFHRGHRGEFSV

Nel corso di un'ampia sperimentazione, la Richiedente ha sorprendentemente scoperto che l'NGF1-14 è stato in grado di promuovere la produzione di pro-collagene I ed elastina, nonché di attivare i melanociti per la produzione di melanina. Questa scoperta ha suggerito l'uso di NGF1-14 in una composizione cosmetica per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

Inoltre, la Richiedente ha trovato che il peptide NGF1-14 conservava tutti gli effetti del rh-NGF auspicabili per un uso dermatologico.

Un ulteriore vantaggio riscontrato dalla ricorrente è che l'NGF1-14, contrariamente all'intera proteina, può essere facilmente sintetizzato con approcci convenzionali di sintesi peptidica e conservato in condizioni blande e per periodi prolungati.

Questi vantaggi hanno portato ad una significativa riduzione dei costi di produzione e hanno reso l'NGF1-14 molto appropriato e attraente per un uso cosmetico.

Il richiedente ha inoltre rilevato che alcune modifiche nel numero e nel tipo di aminoacidi dell'NGF1-14 possono essere apportate senza alterare sostanzialmente l'attività dell'NGF1-14.

Di conseguenza, un primo oggetto della presente invenzione si riferisce ad un peptide comprendente la sequenza ID No. 1, o una sequenza con almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, e più preferibilmente almeno il 95% di identità con la sequenza ID No. 1, e un suo derivato o sale, per l'uso nel trattamento e nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

Inoltre, un secondo oggetto della presente invenzione si riferisce ad una composizione cosmetica costituita da un peptide comprendente la sequenza ID No. 1, o una sequenza avente almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, e più preferibilmente almeno il 95% di identità con la sequenza ID No. 1, e un suo derivato o sale, e almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile da utilizzare nel trattamento e nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

Un terzo oggetto della presente invenzione riguarda un metodo non terapeutico per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento in una persona che ne ha bisogno, comprendente l'applicazione topica di una composizione cosmetica comprendente un peptide comprendente la sequenza ID No. 1, o una sequenza che abbia almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, e più preferibilmente almeno il 95% di identità con la sequenza ID No. 1, e un suo derivato o sale, e almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile.

Vantaggiosamente, il metodo non terapeutico della presente invenzione comprende un pretrattamento cutaneo con sonoforesi a bassa frequenza (LFS).

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1 mostra il grafico dell'attività di NGF1-14 a varie concentrazioni insieme al composto di riferimento Negermin™ (Figura 1A) e la curva EC50 (Figura 1B), come descritto nell'esempio 1.

La figura 2 mostra lo schema di trattamento dell'area cutanea interessata dall'esperimento descritto nell'esempio 2.

La Figura 3 mostra i livelli di NGF1-14 sull'epidermide (Figura 3A) e sul derma (Figura 3B) misurati dopo il trattamento descritto nell'esempio 2.

5 La figura 4 mostra i livelli di fosforilazione del recettore TrkA rilevati dopo il trattamento descritto nell'esempio 2.

La Figura 5 mostra i livelli di pro-collagene I (Figura 5A) ed Elastina (Figura 5B) nel derma dei ratti, misurati dopo la prova di singola somministrazione descritta nell'esempio 3.

10 La Figura 6 mostra i livelli di pro-collagene I (Figura 6A) ed Elastina (Figura 6B) nel derma dei ratti, misurati dopo la prova di somministrazione bisettimanale descritta nell'esempio 3.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

15 Un primo oggetto della presente invenzione riguarda un peptide comprendente la sequenza ID No. 1 per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto invecchiamento.

La sequenza ID No. 1 secondo la presente invenzione è rappresentata dalla sequenza SSSHPIFHRGHRGEFSV.

20 Le abbreviazioni delle sequenze di aminoacidi qui utilizzate sono conformi alla nomenclatura IUPAC-IUB riportata nella seguente tabella A.

Tabella A

Alanina	Ala	A	Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N	Acido aspartico	Asp	D
Cisteina	Cys	C	Acido glutammico	Colla	E
Glutamina	Gln	Q	Glicina	Gly	G
Istidina	Il suo	H	Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L	Lisina	Lys	K
Metionina	Incontrato	M	Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P	Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T	Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y	Valina	Val	V

I peptidi secondo l'invenzione possono avere almeno l'85%, almeno il 90% e almeno il 95% di identità con la sequenza ID No. 1 quando sono allineati in modo ottimale. L'allineamento ottimale delle sequenze può essere condotto con vari metodi noti e con l'implementazione computerizzata di algoritmi noti (ad esempio

5 BLAST, TFASTA, BESTFIT, come nel pacchetto software Genetics Software Package del Wisconsin, Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). Può essere usato anche l'algoritmo BLAST (Altschul et al., Mol. Biol. (1990), 215, 403-410) il cui software è ottenibile presso il National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/.

10 Per "identità di sequenza percentuale" rispetto ad una sequenza di peptidi si intende la percentuale di residui identici in due sequenze. L'identità della sequenza percentuale (%SI) è calcolata con la seguente formula:

$$\%SI = (nt-nd) \times 100 / nt$$

dove nt è il numero di residui nella sequenza di base e nd è il numero totale di

15 residui non identici nella sequenza confrontata se allineati in modo che il numero massimo di amminoacidi sia identico. Di conseguenza, una sequenza SSSHPIFHRGDFD~~F~~SV avrà un'identità di sequenza di circa il 92,8% con la sequenza ID No. 1 (nd=1 e nt=14).

I peptidi secondo l'invenzione possono avere la stessa lunghezza della sequenza

20 ID No. 1 o una lunghezza fino a 16 amminoacidi.

La variazione della sequenza di amminoacidi nei peptidi che comprendono le sequenze ID No. 1 della presente invenzione comprende la sostituzione conservativa di amminoacidi che non influenzano l'attività peptidica. Le sostituzioni in grado di mantenere l'attività peptidica sono selezionate in base (a) all'efficacia

25 nel mantenere la struttura portante del peptide nell'area di sostituzione, come strutture tridimensionali a foglio o elicoidali, (b) all'efficacia nel mantenere la carica elettrica o l'idrofobicità della molecola nell'area obiettivo, o (c) all'efficacia nel mantenere l'ingombro della catena laterale.

Esempi di sostituzione conservativa appartengono al gruppo degli amminoacidi

30 basici (arginina, lisina e istidina), degli amminoacidi acidi (acido glutammico e aspartico), degli amminoacidi polari (glutamina e asparagina), degli amminoacidi idrofobi (leucina, isoleucina, valina e metionina), degli amminoacidi aromatici

(fenilalanina, triptofano e tirosina) e dei piccoli aminoacidi (glicina, alanina, serina e treonina).

Le sostituzioni di aminoacidi che generalmente non alterano l'attività specifica sono note nell'arte della presente invenzione.

- 5 Le alterazioni più comuni sono Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, e le alterazioni opposte. Un altro esempio di sostituzione conservativa è riportato nella seguente Tabella C.

TABELLA C

Amminoacido di partenza	Possibile sostituzione	Sostituzione preferita
Ala (A)	V; L; I	V
Arg (R)	K; Q; N	K
Asn (N)	Q; H; D, K; R	Q
Asp (D)	E; N	E
Cys (C)	S; A	S
Gln (Q)	N; E	N
Glu (E)	D; Q	D
Gly (G)	A	A
His (H)	N; Q; K; R	R
Ile (I)	L; V; M; A; F;	L
Leu (L)	I; V; M; A; F	I
Lys (K)	R; Q; N	R
Met (M)	L; F; I	L
Phe (F)	L; V; I; A; Y	Y
Pro (P)	A	A
Ser (S)	T	T
Thr (Thr)	S	S
Trp (W)	Y; F	Y
Tyr (Y)	Trp; F; T; S	F
Val (V)	I; L; M; F; A;	L

A seconda della sua lunghezza, il peptide della presente invenzione può essere sintetizzato con un metodo ben noto nell'arte, ad esempio, da un sintetizzatore peptidico automatico, o prodotto da una tecnologia di ingegneria genetica. Ad esempio, un gene di fusione che codifica una proteina di fusione che include un partner di fusione e il peptide della presente invenzione viene preparato dall'ingegneria genetica e poi trasformato in una cellula ospite per esprimere la proteina di fusione. Successivamente, il peptide della presente invenzione viene scisso e isolato dalla proteina di fusione utilizzando una proteasi o un composto in modo da produrre il peptide desiderato. A tal fine, tra i polinucleotidi che codificano il partner di fusione e il peptide della presente invenzione può essere inserita una sequenza di DNA che codifica i residui di aminoacidi che possono essere scissi da una proteasi come il fattore Xa o l'enterochinasi, o un composto come la CNBr o l'idrossilammina.

La composizione cosmetica della presente invenzione comprende un peptide comprendente la sequenza ID No. 1 e almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile.

La composizione cosmetica della presente invenzione può comprendere una quantità di peptide, o un suo derivato e/o sale, compresa tra lo 0,00000001% e il 20% in peso, preferibilmente dallo 0,000001 % al 15% in peso, preferibilmente dallo 0,0001% al 10% in peso, ed ancor più preferibilmente dallo 0,0001% al 5% in peso.

La composizione cosmetica della presente invenzione può contenere una varietà di altri componenti opzionali adatti a rendere tali composizioni cosmeticamente o esteticamente più accettabili o a fornire loro ulteriori benefici d'uso. Tali ingredienti opzionali convenzionali sono ben noti all'esperto del ramo. Questi includono tutti gli ingredienti cosmeticamente accettabili come quelli trovati nel CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7a edizione, a cura di Wenninger e McEwen, (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 1997). Per "cosmeticamente accettabile" si intende un materiale (ad esempio, composto o composizione) che è adatto all'uso a contatto con la pelle, i capelli o altri substrati idonei, come definito qui di seguito.

Tra gli ingredienti cosmeticamente accettabili utili nella presente invenzione sono compresi i veicoli cosmeticamente accettabili, i solventi volatili e non volatili,

l'acqua e altri ingredienti aggiuntivi, quali tensioattivi, conservanti, assorbenti, chelanti, lubrificanti, idratanti, idrorepellenti, antiossidanti, assorbenti UV, antirritanti, vitamine, metalli in tracce, agenti antimicrobici, profumi, coloranti e ingredienti coloranti, e/o agenti strutturanti.

5 Per "veicolo cosmeticamente accettabile", come qui utilizzato, si intende uno o più riempitivi, diluenti, additivi e simili solidi o liquidi compatibili, che sono cosmeticamente accettabili come sopra definito. Il termine "compatibile", così come qui utilizzato, significa che i componenti delle composizioni di questa invenzione possono essere combinati con gli attivi primari della presente
10 invenzione, e tra loro, in modo tale che non vi sia alcuna interazione che riduca sostanzialmente l'efficacia della composizione in situazioni d'uso ordinario.

Il tipo di veicolo utilizzato nella presente invenzione dipende dal tipo di prodotto desiderato. Le composizioni utili nella presente invenzione possono essere una grande varietà di forme di prodotto. Queste includono, ma non sono limitate a,
15 lozioni, creme, gel, stick, spray, unguenti, paste, mousse e trucchi (ad esempio, trucco solido, semisolido o liquido, compresi i fondo-tinta).

Queste forme di prodotto possono comprendere diversi tipi di veicoli, tra cui, ma non solo, soluzioni, aerosol, emulsioni (incluse olio-in-acqua e acqua-in-olio), gel, solidi e liposomi.

20 Le composizioni della presente invenzione possono comprendere acqua, in quantità diverse a seconda della forma della composizione. La quantità di acqua, se presente, può variare da meno dell'1% a più del 99% in peso rispetto al peso della composizione totale. Le composizioni acquose della presente invenzione sono particolarmente formulate come lozioni acquose o come emulsioni acquose
25 o come emulsioni acqua-in-olio o olio-in-acqua o come emulsioni multiple (emulsione tripla olio-in-acqua-in-olio o acqua-in-olio-in-acqua). Tali emulsioni sono conosciute e descritte, ad esempio, da C. FOX in " Cosmetics and Toiletries " - November 1986 - Vol. 101 - pages 101 - 112.

Le composizioni solide, le composizioni spray e le creme acqua-in-olio sono
30 generalmente costituite da quantità d'acqua inferiori al 10%, preferibilmente inferiori al 5% in peso totale della composizione. Le composizioni roll-on, composizioni acquose e deodoranti sono generalmente costituite da una quantità d'acqua che va dal 15% circa al 99% circa, preferibilmente dal 30% circa al 90%

circa, ancora più preferibilmente dal 50% circa all'80% circa, in peso rispetto al peso totale della composizione.

Le composizioni della presente invenzione possono comprendere uno o più solventi volatili. Se presente, il solvente volatile o miscela di solventi sarà
5 generalmente ad un livello compreso tra il 10% e il 90% circa, preferibilmente tra il 25% e il 75% circa, ancora più preferibilmente tra il 35% e il 65% circa, in peso rispetto al peso totale della composizione. I solventi qui utilizzati sono preferibilmente solventi organici volatili.

Come qui utilizzato, il termine "volatile" si riferisce a sostanze con una quantità
10 significativa di tensione di vapore in condizioni ambientali, così come sono intese dagli esperti del campo.

I solventi volatili da utilizzare nel presente documento avranno preferibilmente una tensione di vapore di circa 2kPa o più, preferibilmente di circa 6kPa o più, a 25°C.

I solventi volatili da utilizzare avranno preferibilmente un punto di ebollizione in
15 atmosfera normale (1 atm) inferiore a circa 150°C, più preferibilmente inferiore a circa 100°C, ancora più preferibilmente inferiore a circa 90°C, e ancora più preferibilmente inferiore a circa 80°C.

Preferibilmente, i solventi volatili da utilizzare nel presente documento saranno relativamente inodori e sicuri per l'uso sulla pelle umana. I solventi volatili idonei
20 includono, ma non sono limitati agli alcoli C1-C4, ai siliconi volatili e alle loro miscele. I solventi volatili preferiti sono gli alcoli C1-C4 e le loro miscele. Etanolo è il solvente preferito per il presente uso.

Le composizioni della presente invenzione possono comprendere anche uno o più solventi non volatili. Se presente, il solvente non volatile o la miscela di solventi
25 sarà generalmente ad un livello compreso tra l'1% circa e il 20% circa, preferibilmente dal 2% circa al 10% circa, ancora più preferibilmente dal 3% circa al 5% circa, in peso rispetto al peso totale della composizione. I solventi non volatili idonei includono, ma non sono limitati a, benzil benzoato, alcool cetearilico, alcool cetilico, dietilftalato, isopropilmiristato, dimeticone, caprililmeticone e loro
30 miscele.

Diversi altri ingredienti aggiuntivi possono essere presenti nelle composizioni della presente invenzione. Questi includono, ma non sono limitati a, polimeri idrofili selezionati da polietilenglicoli (PEG), polivinilpirrolidoni (PVP),

idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) e polossameri; stabilizzanti UV come il benzofenone-3; antiossidanti come l'acetato di tocoferile; conservanti come fenossietanolo, alcool benzilico, metilparaben, propilparaben; agenti di regolazione del pH come acido lattico, acido citrico, citrato di sodio, acido succinico, acido fosforico, idrossido di sodio, carbonato di sodio; deodoranti e antimicrobici, come farnesolo, zinco fenolsolfonato e etilesilglicerina; umettanti come tribehenina, glicerina; agenti condizionanti della pelle come l'allantoina; agenti refrigeranti come trimetil isopropil butanamide e mentolo; ingredienti per il trattamento dei capelli come pantenolo, pantetina, pantotina, pantenil etere etilico e loro combinazioni; propellenti come propano, isopropano, butano e isobutene; sali in generale, come acetato di potassio e cloruro di sodio e loro miscele; profumi e coloranti.

Se presenti, questi ingredienti aggiuntivi saranno preferibilmente presenti a un livello inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5% in peso rispetto al peso totale della composizione.

I peptidi della presente invenzione sono in grado di promuovere la produzione di pro-collagene I ed elastina, nonché di attivare i melanociti per la produzione di melanina. Di conseguenza, la composizione cosmetica della presente invenzione è particolarmente utile per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

L'invenzione sarà ulteriormente descritta nei seguenti esempi, che non limitano la portata dell'invenzione descritta nelle rivendicazioni.

ESEMPIO 1

Attività in vitro

Il trattamento NGF della linea cellulare del feocromocitoma di ratto (PC12) si traduce nell'espressione proteica e di mRNA c-fos (J. Milbrandt, "Nerve growth factor rapidly induces c-fos mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells", Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(13):4789-93).

Partendo dal lavoro di Milbrandt, la Richiedente ha monitorato l'attivazione del recettore NFG utilizzando un clone (B9) stabilmente trasfettato con il promotore c-fos umano alla guida di un gene reporter luciferasi (PC12-Luci). Questo clone è stato utilizzato per impostare un saggio funzionale e quantitativo per la caratterizzazione dell'attività di NGF1-14.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in cellule PC12-Luci, che esprimono a livello endogeno i recettori NGF, TrkA e p75. Le cellule sono state mantenute nel seguente mezzo di coltura completo che comprende:

- Miscela DMEM-F12 (DMEM-F12 Glutamax; Life Technologies, GIBCO 10565-018)
- 5% di siero bovino fetale (FBS, Sigma Aldrich, F7524)
- 10% di siero di cavallo (HS, Sigma Aldrich, H1138)
- 1% di penicillina-streptomicina (Life Technologies, GIBCO 15140-122)

Per il passaggio, le cellule sono state lavate delicatamente con PBS e poi incubate con tripsina per 5 minuti a temperatura ambiente o 37°C. È stato aggiunto un mezzo di supporto e le cellule sono state risospese (6-8 volte).

Gli esperimenti sono stati eseguiti in sestuplicato, in piastra nera a 96 pozzetti precedentemente rivestiti con 50µg/ml di collagene di tipo I.

Le cellule PC-12-Luci sono state seminate a 25000/pozzetto in 100 µl di terreno di crescita completo. 24 ore dopo, il mezzo cellulare è stato accuratamente rimosso. Le cellule sono state poi incubate con cinque concentrazioni (range 30ng/ml-300µg/ml, diluizioni seriali 1:10) di NGF1-14 in tampone standard Tyrode con 0,1% di BSA (50 µl/pozzetto) per 4 ore a 37°C. Il composto di riferimento Negermin™ (di MimeTech Srl) è stato aggiunto a 30µg/ml, come riferimento. La soluzione madre di NGF1-14 è stata risospesa in acqua sterile, aliquotati e conservati a -20°C. La soluzione madre del composto Negermin™ è stata risospesa in tampone di formulazione e conservata a -20°C.

Dopo l'incubazione, il livello basale di luminescenza è stato monitorato per 30 secondi, utilizzando il lettore multimodale EnSpire (PerkinElmer). Quindi, una miscela di Triton-Luciferina è stata aggiunta alle cellule (50 µl/pozzetto), in un rapporto 1:1, portando alla lisi cellulare. Il segnale di luminescenza ottenuto è stato monitorato per altri 60 secondi.

Le soluzioni e i tamponi di cui sopra avevano la seguente composizione:

- Tampone di formulazione: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2,
- Tampone tiroideo: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES in acqua a pH 7,4; filtrato sterile e conservato a 4°C,

- Sieroalbumina bovina (BSA), esente da acidi grassi (Sigma, A8806); soluzione madre: 10% in tampone Tyrode; aliquotato e conservato a -20°C,
- Soluzione madre per lisi Triton: 25 mM TRIS, 25 mM NaH₂PO₄, 2 mM DTT, 10% Glicerolo, 2% TRITON X-100; aliquotati e conservati a -20°C,
- Soluzione madre Luciferin: 20 mM Tricine, 2,67 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 µM Coenzima A, 470 µM Luciferin, 530 µM ATP; aliquotati e conservati a -80°C.

Tutti i valori di luminescenza sono stati normalizzati rispetto al livello basale di luminescenza. Il valore di risposta è stato calcolato come media della luminescenza della cinetica registrata.

I dati sono stati ulteriormente analizzati (ad esempio il calcolo delle curve dose-risposta e dei valori EC₅₀) e i grafici sono stati tracciati utilizzando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). I risultati sono illustrati in Fig. 1, che mostra il grafico dell'attività di NGF1-14 a varie concentrazioni insieme al composto di riferimento Negermin™ (Figura 1A) e la curva EC₅₀ (Figura 1B). I risultati hanno mostrato che NGF1-14 aumenta il livello di luminescenza basale in modo dose-dipendente (Ec₅₀=290,95 ng/ml).

In conclusione, questi risultati hanno dimostrato che l'NGF1-14 possiede un'attività funzionale, mostrando una potenza in vitro superiore al composto standard di riferimento Negermin™, ma inferiore al rhNGF (Ec₅₀ rhNGF 1,4 ng/ml). La potenza ridotta è coerente con l'uso cosmetico proposto.

ESEMPIO 2

Studio preclinico

Sono stati condotti esperimenti di distribuzione per valutare la capacità della preparazione del gel NGF1-14 di penetrare nello strato corneale e raggiungere il derma, anche utilizzando strategie di tipo sonoforesi per facilitare la penetrazione cutanea.

Nastri adesivi e ultrasuoni sono stati applicati sulla zona dorsale rasata di ratti adulti femmina Sprague Dawley (SD) (10-12 mesi).

La sonoforesi a bassa frequenza (LFS) è stata applicata utilizzando un processore ad ultrasuoni Sonics Ultrasonic Processor Model VCX 400 che opera ad una frequenza di 20 KHz (spostamento della punta di circa 2 cm, in modalità continua) per 6 o 10 minuti, secondo le comuni pratiche cliniche, in quanto è noto che un

uso prolungato della sonoforesi aumenta la permeazione cutanea ma provoca anche un notevole danno termico, che non è adatto all'uso (Rif. International Journal of Health Sciences & Research 477 Vol.5; Numero: 5; Maggio 2015: A Review on Ultrasound Parameters and Methods of Application in Transdermal Drug Delivery).

Il veicolo di controllo e la preparazione del gel NGF1-14 sono stati somministrati sulla porzione di pelle pretrattata con LFS (S) o su pelle rasata / nastro adesivo (NS).

Le composizioni del veicolo di controllo e della preparazione del gel NGF1-14 sono riportate nella seguente tabella 1.

TABELLA 1

	Veicolo di controllo	NGF1-14
Idrogel a base di ialuronato di sodio	Circa il 90-95%.	Circa il 90-95%.
Alcool polivinilico (Sigma Aldrich Mowiol® 40-88)	5-10%	5-10%
Parabeni stabilizzanti (Sigma Aldrich)	Meno dell'1%.	Meno dell'1%.
NGF1-14	-	0.1%

L'idrogel a base di ialuronato di sodio è stato preparato sciogliendo in acqua lo ialuronato di sodio con peso molecolare compreso tra 50 e 150 KDa (prodotto da Contipro).

Il trattamento è stato ripetuto dopo due ore e i ratti sono stati sacrificati per sezionare i campioni di pelle 2 ore dopo la seconda applicazione di gel/ NGF mimetico.

Uno schema di trattamento è mostrato in Figura 2, dove N e G indicano l'area trattata senza LFS con NGF1-14 e veicolo Gel, rispettivamente, e NS e GS indicano l'area trattata con LFS con NGF1-14 e veicolo Gel, rispettivamente. NL e GL indicano le aree cutanee adiacenti e non sovrapposte alle aree LFS.

L'epidermide e il derma delle aree cutanee sonicate (S) e non sonicate (NS) sono stati separati con un bisturi, lavati con PBS e tagliati in due parti. Il primo è stato conservato in un tubo sterile a -80°C per essere lavorato per l'estrazione totale delle proteine e l'analisi biochimica.

Una porzione di pelle è stata immersa in PFA 4% per essere trattata per una successiva valutazione istologica e immunoistochimica.

L'estratto proteico dell'epidermide e del derma è stato utilizzato per valutare l'effetto dell'applicazione di LFS sulla capacità del preparato gel NGF1-14 di penetrare nello strato corneo e raggiungere il derma.

La quantificazione di NGF 1-14 è stata determinata mediante HPLC-UV, su una colonna C4 di fase inversa, eluizione con tampone fosfato (pH 7,4) e acetonitrile. Il metodo HPLC-UV è stato convalidato per linearità, ripetibilità e riproducibilità e recupero.

I risultati sono riportati nelle figure 3A e 3B. Rispetto al trattamento con il veicolo, è stato riscontrato un aumento significativo di NGF1-14 nell'epidermide e nel derma dopo l'LFS.

L'efficacia dell'applicazione di NGF mimetico/LFS è stata confermata dall'analisi dei livelli di espressione e dell'attivazione del recettore trofico di sopravvivenza dell'NGF TrkA.

L'effetto di NGF(1-14) sulla fosforilazione di TrkA è stato testato da analisi Western Blot di estratti proteici da colture cellulari PC12 trattate con il peptide, utilizzando anticorpi contro P-TrkA, secondo la comune pratica di laboratorio.

Come mostrato in Figura 4, in tutti i campioni di derma sottoposti ad applicazione di NGF1-14, con o senza LFS rispetto ai relativi controlli del veicolo, sono stati riscontrati livelli di fosforilazione aumentati di TrkA.

ESEMPIO 3

Invecchiamento della pelle e foto-invecchiamento

Poiché le proteine della matrice extracellulare collagene ed elastina sono coinvolte nella riparazione delle ferite, nell'invecchiamento cutaneo e nel foto-invecchiamento, è stato analizzato anche l'effetto dell'applicazione topica di NGF1-14 sui livelli di queste due proteine.

Pro-Collagene I ed Elastina sono stati misurati utilizzando kit commerciali Elisa, prima in una prova di somministrazione singola, seguito da una prova di somministrazione bisettimanale.

I risultati della prova di somministrazione singola sono riassunti nella figura 5. Una tendenza simile è stata osservata analizzando le due proteine: è stato rilevato un aumento sia del pro-collagene I (A) che dell'elastina (B) nel derma dei ratti trattati

con NGF1-14 allo 0,1% di dose, dopo la sonicazione. L'effetto è stato meno apprezzabile senza applicare gli ultrasuoni. È stato rilevato un leggero aumento dell'Elastina, mentre il valore del Collagene I era paragonabile al valore di controllo positivo, all'interno dell'errore sperimentale.

5 Prova di somministrazione singola e bisettimanale

L'azione protettiva di NGF1-14 alla dose dello 0,1% (P 0,1%) è stata valutata sulla pelle adulta esposta a livelli suberitematosi di UV-B (MED=60 mJ/cm² due volte al giorno) dapprima in una prova di somministrazione (un giorno) poi per tre settimane prima del trattamento. Questa procedura sperimentale è anche
10 denominata modello Photo-AGing (PAG) in quanto induce cambiamenti strutturali e molecolari che si verificano nell'invecchiamento.

Il trattamento topico con P 0.1% o veicolo gel è stato applicato per due settimane sulla pelle dorsale rasata di ratti PAG e non PAG. L'esposizione agli UV-B (MED=60 mJ/cm² uno al giorno) è stata eseguita anche durante l'ultima settimana
15 di trattamento.

I ratti sono stati sacrificati e la pelle è stata sezionata con un bisturi, lavata con PBS e tagliata in due parti. La prima è stata conservata in un tubo sterile a -80°C per essere lavorata per l'estrazione totale delle proteine e l'analisi biochimica. La seconda è stata immersa in PFA 4% ed elaborata per una valutazione istologica e
20 immunoistochimica.

In accordo con lo studio di somministrazione singola, il foto-invecchiamento ha indotto una diminuzione del pro-collagene I nel derma (Figura 6A), e nell'espressione di Elastina rilevata (Figura 6B).

L'applicazione di P 0.1% ha portato ad un aumento del pro-collagene I sia nel derma no-PAG che in quello PAG, anche se l'effetto è stato più pronunciato nella
25 pelle sana (Fig 6A). I cambiamenti sono stati meno significativi nella concentrazione di elastina.

ESEMPIO 4

Azione abbronzante

30 È stato valutato l'effetto dell'applicazione topica di NGF1-14 sull'attivazione dei melanociti per produrre melanina.

Secondo protocolli già stabiliti, le colture cellulari primarie di melanociti umani normali sono state seminate in piastre di Petri e coltivate per una settimana, con e

senza la presenza di NGF 1-14 a varie concentrazioni. Il contenuto di melanina è stato misurato con il saggio immunoenzimatico ELISA. Un aumento è stato osservato in culture arricchite con il peptide.

ESEMPIO 5

Test di irritazione cutanea

I test di irritazione cutanea sono stati eseguiti applicando protocolli di analisi su misura per applicazioni cosmetiche dermatologiche, in particolare il dosaggio colorimetrico MTT Colorimetrico e il dosaggio LDH Release.

Il saggio colorimetrico MTT misura l'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, che è attivo solo nelle cellule viventi e reagisce con MTT (di colore giallo) formando un sale di colore blu, la cui densità ottica (ODn), proporzionale al numero di cellule vive, viene quantificata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

Il saggio LDH Release misura la quantità di lattato deidrogenasi, un enzima citoplasmatico, nel terreno di coltura, il cui rilascio significa perdita di integrità della membrana cellulare. La quantità è quantificata spettrofotometricamente per mezzo di un reagente specifico ad una lunghezza d'onda di 490 nm.

Le prove sono state eseguite in triplicato con due campioni (1 e 2) di formulazione gel NGF1-14 alla dose dello 0,3%, tre volte superiore a quella attiva (0,1%), su tessuto EpiDerm™ (MatTek Corporation, Bratislava, Slovacchia) in EPI-100-ASY Assay Medium. Come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione Triton X-100 all'1%. Come controllo negativo è stata utilizzata la matrice gel senza peptide. I controlli positivi e negativi sono stati eseguiti in duplicato. I campioni sono stati contattati durante la notte per 18 ore.

I risultati dei test sono riassunti nelle seguenti tabelle 2 (MTT) e 3 (LDH).

TABELLA 2

	Valore medio (OD) $\pm$ SD	Valore normalizzato $\pm$ SD
Controllo negativo	2,0 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 3,1
Controllo positivo	0,7 $\pm$ 0,0	33,3 $\pm$ 2,0
Campione 1	1,8 $\pm$ 0,0	91,6 $\pm$ 1,8
Campione 2	1,9 $\pm$ 0,1	99,3 $\pm$ 3,8

TABELLA 3

	Valore medio (OD) $\pm$ SD	Valore normalizzato $\pm$ SD
Controllo negativo	0,13 $\pm$ 0,00	1,0 $\pm$ 0,0
Controllo positivo	1,04 $\pm$ 0,04	8,0 $\pm$ 0,3
Campione 1	0,24 $\pm$ 0,04	1,9 $\pm$ 0,3
Campione 2	0,14 $\pm$ 0,05	1,1 $\pm$ 0,4

Nel saggio MTT, un campione è considerato "non irritante" quando la vitalità è superiore al 70% rispetto al controllo negativo. Nel saggio LDH, un campione è considerato "non irritante" quando il valore di rilascio di LDH è inferiore a cinque volte il valore registrato per il controllo negativo. Entrambi i campioni 1 e 2 sono stati quindi considerati "non irritanti".

ESEMPIO 6

Test di sensibilizzazione della pelle

Il test di sensibilizzazione cutanea è stato eseguito applicando il test IL-18 Release con Elisa Kit.

Il saggio IL-18 Release misura la quantità di interleuchina 18 (IL-18) nel terreno di coltura. IL-18 è una citochina pro-infiammatoria che ha un ruolo chiave nell'indurre la sensibilizzazione allergica da contatto. La quantità è determinata con il metodo ELISA diretto, cioè lo sviluppo del colore è stato direttamente proporzionale alla quantità di citochine nel terreno di coltura.

Le prove sono state eseguite in triplicato con due campioni (1 e 2) di formulazione gel NGF1-14 alla dose dello 0,3%, tre volte superiore a quella attiva (0,1%), su tessuto EpiDerm™ (MatTek Corporation, Bratislava, Slovacchia) in EPI-100-ASY Assay Medium. Come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione allo 0,15% di DNCB (2,4-DiNitroCloroBenzene). Come controllo negativo è stata utilizzata la matrice gel senza peptide. I controlli positivi e negativi sono stati eseguiti in duplicato. I campioni sono stati contattati durante la notte per 18 ore.

I risultati dei test sono riassunti nella seguente tabella 4.

TABELLA 4

	Valore medio (pg/ml) $\pm$ SD	Valore normalizzato $\pm$ SD
Controllo negativo	27.0 $\pm$ 3.8	1.0 $\pm$ 0.1
Controllo positivo	252.3 $\pm$ 16.4	9.3 $\pm$ 0.6
Campione 1	38.3 $\pm$ 5.6	1.4 $\pm$ 0.2
Campione 2	45.6 $\pm$ 8.2	1.7 $\pm$ 0.3

Nel saggio IL-18 Release, un campione è considerato "non sensibilizzante" quando il valore di rilascio IL-18 è inferiore a due volte il valore registrato per il controllo negativo. Entrambi i campioni 1 e 2 sono stati quindi considerati "non sensibilizzanti".

ESEMPIO 7

Caratterizzazione di NGF1-14 pKa e Log P e D

La pKa sperimentale e i coefficienti di ripartizione e distribuzione (log P e log D) sono stati determinati utilizzando un titolatore potenziometrico automatico Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK) dotato di un elettrodo pH di riferimento a doppia giunzione Ag/AgCl, uno spettrometro Sirius D-PAS e un dispositivo di rilevamento della torbidità. L'elettrodo pH è stato calibrato titolometricamente nell'intervallo di pH 1,8-12,2. È stato utilizzato un agitatore meccanico ad asta e una sonda di temperatura ha monitorato la temperatura durante il corso della titolazione. Gli esperimenti di titolazione sono stati condotti in una soluzione di 0,15 M KCl (acqua ISA) in atmosfera di argon ad una temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Tutti i test sono stati eseguiti utilizzando come reagenti di titolazione 0,5 M KOH e 0,5 M HCl, per i test del coefficiente di ripartizione è stato utilizzato come solvente di ripartizione ottanolo saturo in acqua ISA (5% di acqua ISA). Il pKa è determinato con metodo potenziometrico mediante titolazione pH-metrica. La polvere (circa 0,5 mg) è stata sciolta in 1,5 ml di acqua ISA e la titolazione è stata eseguita in triplicato nell'intervallo di pH 2,0 - 12,0. Log P viene eseguito in triplicato sciogliendo la polvere (circa 0,7 mg) in 1 ml di acqua ISA seguita da una titolazione metrica del pH in tre diverse percentuali di ottanolo (generalmente 50%, 60%, 70%). La pKa prevista e il log P calcolato per il modello strumentale è stato eseguito utilizzando ACD/Percepta.

I risultati sono illustrati nella seguente tabella 5. Il valore Log P deve essere considerato un valore relativo in quanto i peptidi non sono mai molecole neutre.

TABELLA 5

Acido pKa	4,42 $\pm$ 0,05 (n=50)
Base pKa	7,41 $\pm$ 0,07 (n=50)
Base pKa	6,43 $\pm$ 0,06 (n=50)
Log P (a/o)	-8,50
Log D (7,4)	-7,90

5

La presente invenzione è stata divulgata con particolare riferimento ad alcune sue specifiche realizzazioni, ma si deve comprendere che le modifiche e i cambiamenti possono essere effettuati da persone esperte nell'arte senza discostarsi dal campo di applicazione dell'invenzione come definito nelle rivendicazioni allegate.

10

RIVENDICAZIONI

1. Peptide comprendente la sequenza ID No. 1, o una sequenza che abbia almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, e più preferibilmente almeno il 95% di identità di sequenza con la sequenza ID No. 1, e un suo derivato o sale, per uso nel trattamento e nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

2. Il peptide per uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto peptide ha una lunghezza fino a 16 aminoacidi, preferibilmente fino a 15 aminoacidi, e più preferibilmente di 14 aminoacidi.

3. Il peptide per uso secondo la rivendicazione 2, in cui detto peptide consiste nella sequenza ID No. 1, o una sequenza che abbia almeno l'85%, preferibilmente almeno il 90%, e preferibilmente almeno il 95% di identità di sequenza con la sequenza ID No. 1, e un suo derivato o sale.

4. Il peptide per uso secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni da 1 a 3, in cui detto derivato comprende un N e/o un C terminale di detto peptide che è chimicamente modificato o protetto con un composto organico.

5. Il peptide per uso secondo la rivendicazione 4, in cui detto composto organico è selezionato dal gruppo che consiste di gruppi fosforil, glicosil, acil, alchil, carbossil, idrossil, biotinil, ubiquitinil, e ammido.

6. Una composizione cosmetica che comprende un peptide come definito in una qualsiasi delle precedenti dichiarazioni da 1 a 5 e almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile per uso nel trattamento e nella prevenzione dell'invecchiamento cutaneo e del foto-invecchiamento.

7. La composizione cosmetica per uso secondo la rivendicazione 6, in cui detta composizione comprende una quantità di detto peptide, o un suo derivato e/o sale, compresa tra lo 0,00000001% e il 20% in peso, preferibilmente dallo 0,000001 %

al 15% in peso, più preferibilmente dallo 0,0001% al 10% in peso, e ancora di più preferibilmente dallo 0,0001% al 5% in peso.

8. La composizione cosmetica per uso secondo la rivendicazione 6, in cui detto
almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile è selezionato dal gruppo che
consiste di veicoli cosmeticamente accettabili, solventi volatili e non volatili, acqua,
tensioattivi, conservanti, assorbenti, chelanti, lubrificanti, idratanti, idrorepellenti,
antiossidanti, assorbitori UV, antirritanti, vitamine, metalli in tracce, agenti
antimicrobici, profumi, coloranti e ingredienti colorati e/o agenti strutturanti.

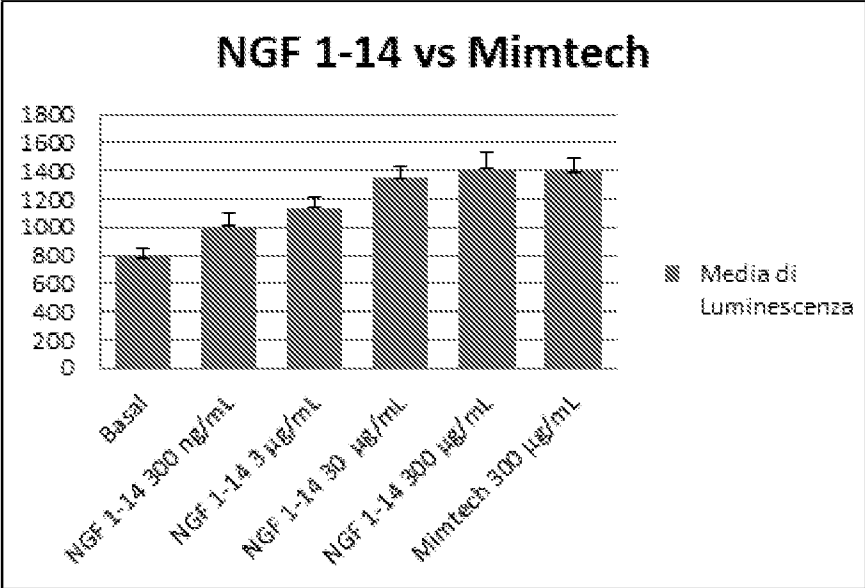
9. La composizione cosmetica per uso secondo la rivendicazione 8, in cui detti
veicoli cosmeticamente accettabili includono soluzioni, aerosol, emulsioni acqua-
in-olio, emulsioni olio-in-acqua, gel, solidi e liposomi.

10. La composizione cosmetica per uso secondo la rivendicazione 8, in cui detta
composizione cosmetica si presenta sotto forma di lozioni, creme, gel, stick, spray,
unguenti, paste, mousse e trucchi.

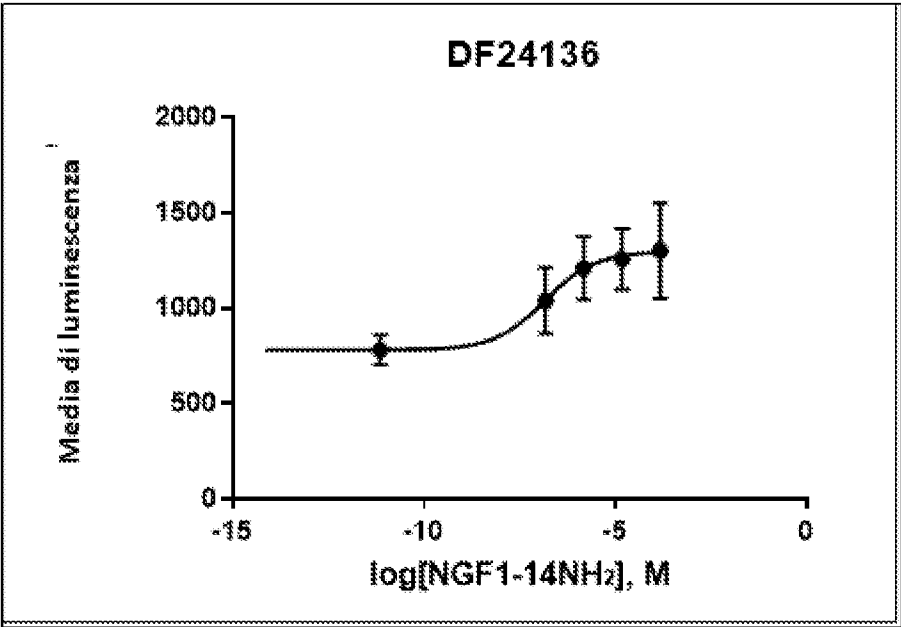
11. Metodo non terapeutico per il trattamento e la prevenzione dell'invecchiamento
cutaneo e del foto-invecchiamento in una persona che ne ha bisogno,
comprendente l'applicazione topica di una composizione cosmetica comprendente
un peptide come definito in una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni da 1 a 5 e
almeno un eccipiente cosmeticamente accettabile.

12. Il metodo non terapeutico secondo la rivendicazione 11, in cui tale metodo
comprende un pretrattamento cutaneo mediante sonoforesi a bassa frequenza
(LFS).

Fig. 1



A



B

Fig. 2

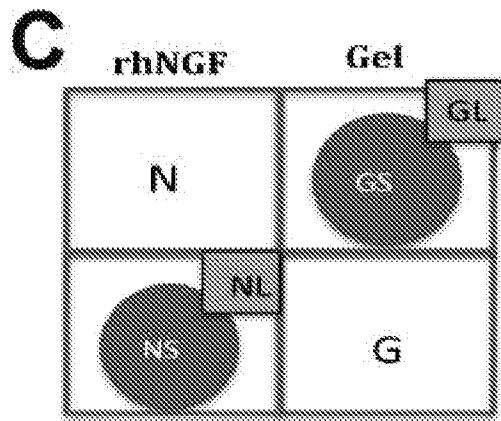


Fig. 3

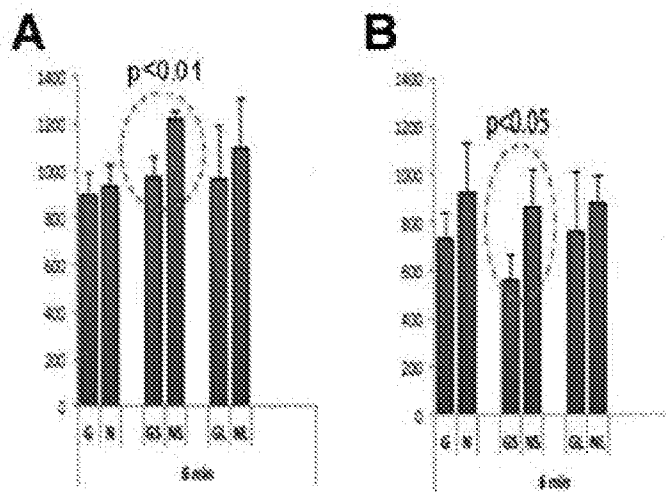


Fig. 4

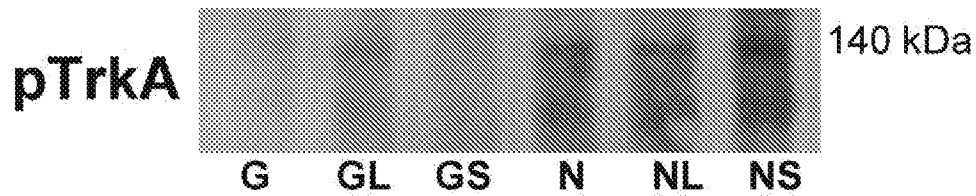


Fig. 5

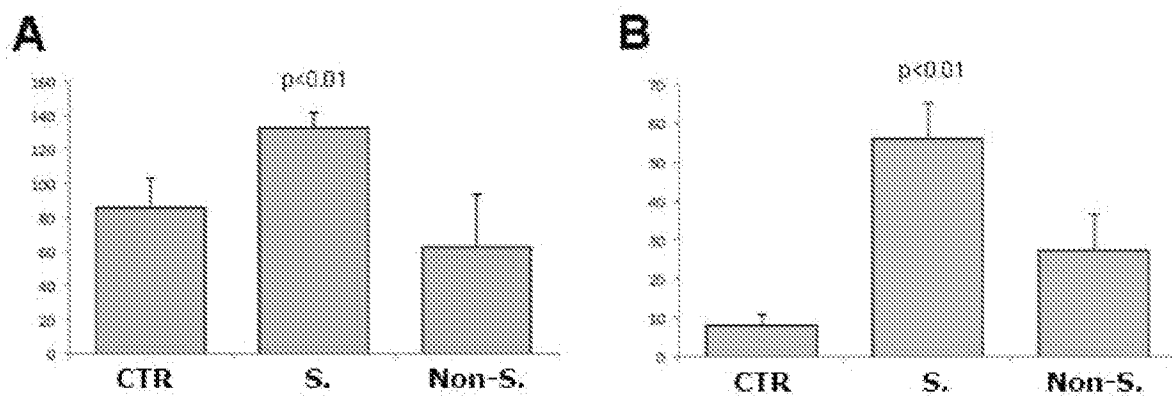


Fig. 6

