

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2008/009852 A2**

(51) Classification internationale des brevets : **Non classée**

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/051678

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2007 (18.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0653026 19 juillet 2006 (19.07.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **GAL-  
DERMA RESEARCH & DEVELOPMENT** [FR/FR];  
2400 Route des Colles, Les Templiers, F-06410 Biot (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : **LABRIE,  
Fernand** [CA/CA]; 2989, de la Promenade, Quebec,  
G1W2J5 (CA).

(74) Mandataire : **ANDRAL, Christophe**; L'OREAL, RIVER  
PLAZA - DIPI, 25-29 Quai Aulagnier, F-92665 Asnieres-  
sur-Seine (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,  
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,  
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,  
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport
- avec la partie réservée au listage des séquences de la des-  
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-  
ponible sur demande auprès du Bureau international

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: MODULATORS OF LANOSTEROL SYNTHETASE IN THE TREATMENT OF ACNE OR OF HYPERSEBOR-  
RHOEA

(54) Titre : MODULATEURS DE LA LANOSTÉROL SYNTHÉTASE DANS LE TRAITEMENT DE L'ACNÉ OU DE  
L'HYPERSÉBORRHÉE

(57) Abstract: The invention relates to an *in vitro* method of screening for candidate compounds for the preventive or curative treatment of acne, comprising the determination of the ability of a compound to modulate the expression or the activity of lanosterol synthetase (LSS), and also to the use of modulators of the expression or of the activity of this enzyme for the treatment of acne or of skin disorders associated with hyperseborrhoea. The invention also relates to methods for the diagnosis or prognosis, *in vitro*, of these pathologies.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la lanostérol synthétase (LSS), ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de cette enzyme pour le traitement de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro* de ces pathologies.

WO 2008/009852 A2

## **Modulateurs de la lanostérol synthétase dans le traitement de l'acné ou de l'hyperséborrhée**

L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs de lanostérol synthétase (LSS) pour le traitement de l'acné, ainsi que des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. Elle concerne aussi des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro de ces pathologies.

Une peau grasse hyperséborrhéique est caractérisée par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Classiquement, un taux de sébum supérieur à 200µg/cm<sup>2</sup> mesuré au niveau du front est considéré comme caractéristique d'une peau grasse. Une peau grasse est souvent associée à un défaut de desquamation, un teint luisant, un grain de peau épais. En plus de ces désordres esthétiques, l'excès de sébum peut servir de support au développement anarchique de la flore bactérienne saprophyte (*P. acnes* en particulier), et provoquer l'apparition de comédons et/ou de lésions acnéiques.

Cette stimulation de la production de glandes sébacées est induite par les androgènes. L'acné est, de fait, une maladie chronique du follicule pilosébacé sous dépendance hormonale. Une thérapie hormonale contre l'acné est une possibilité de traitement pour les femmes, le but étant de s'opposer aux effets des androgènes sur la glande sébacée. Dans ce cadre on utilise généralement des oestrogènes, des anti-androgènes, ou des agents diminuant la production d'androgènes par les ovaires ou la glande surrénale. Les anti-androgènes utilisés pour le traitement de l'acné incluent notamment la spironolactone, l'acétate de cyprotérone, et le flutamide. Cependant, ces agents présentent des effets secondaires potentiellement sévères. Ainsi, toute grossesse doit être absolument empêchée, du fait notamment d'un risque de féminisation pour le fœtus mâle. Ces agents sont prohibés chez les patients masculins.

Il existe donc un besoin d'identifier des médiateurs en aval de l'action des hormones stéroïdiennes, et de les moduler, pour obtenir un profil thérapeutique similaire, mais avec des effets secondaires réduits.

La demanderesse a maintenant découvert que le gène codant pour la lanostérol synthétase (LSS) était exprimé dans les glandes sébacées humaines, et que son expression était régulée par les androgènes, *in vivo*, dans un modèle glande préputiale de souris. Elle propose dès lors de cibler le gène LSS ou son produit d'expression, pour

prévenir et/ou améliorer l'acné, ainsi que les désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, notamment l'aspect de peau grasse.

Par acné, on entend toutes les formes d'acné, à savoir notamment les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, les acnés nodulokystiques, conglobata, ou encore les  
5 acnés secondaires telles que l'acné solaire, médicamenteuse ou professionnelle. La demanderesse propose également des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro, basées sur la détection du niveau d'expression ou d'activité de la LSS.

### **LSS**

10 L'enzyme LSS désigne la lanostérol synthétase, encore appelée 2,3-epoxysqualène-lanostérol cyclase, 2,3-oxidosqualène-lanostérol cyclase, OSC, ou encore Oxidosqualene--lanostérol cyclase.

La lanostérol synthétase catalyse la cyclisation du (S)-2,3 oxydosqualène en lanosterol au cours de la réaction qui forme le noyau stérol. Le gène codant la lanosterol synthétase est  
15 appelé gène OSC, ou, dans le contexte de la présente demande, gène LSS. Le gène LSS est considéré comme une cible intéressante pour le traitement de l'hypercholestérolémie (Huff et Telford, 2005, Trends Pharmacol Sci. 2005 Jul;26(7):335-40) mais aussi pour le traitement de la maladie de Chagas (Hankins, Gillespie, Aikenhead et Buckner, 2005, Mol Biochem Parasitol. 2005 Nov ;144(1) : 68-75). L'inhibition de la lanostérol synthétase  
20 permet de diminuer la production de lanostérol et donc la synthèse de cholestérol. Elle provoque également une augmentation de la synthèse d'oxystérols. Cette double action permet d'amplifier la diminution du cholestérol lors d'un traitement (Telford et al, 2005, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Dec ; 25 (12) :2608-14). Les inhibiteurs impliqués sont nombreux et ont été produits à partir d'extraits de champignons (Sakano, Shibuya,  
25 Yamaguchi, Masuma, Tomoda, Omura, Ebizuka, 2004, J Antibiot. 2004 Sep ;57(9) :564-8), de végétaux, ou dérivés du ligand endogène et de sucres comme des mono- et digalactosides (Tanaka, Sakano, Nagatsu, Shibuya, Ebizuka, Goda, 2005, Bioorg Med Chem Lett. 2005 Jan 3 ;15 (1) :159-62) ou l'inhibiteur Ro 48-8071 cité dans les publications : Morand, Aebi, Dehmlow, Ji, Gains, Lengsfeld, Himber, 1997 J Lipid Res 38,  
30 373-390 et Thoma et al., 2004 Nature Nov 4 ; 432, 118-122.

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène LSS » ou « acide nucléique LSS » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour la lanostérol synthétase. Si la cible visée est de préférence le gène humain ou son produit d'expression, l'invention peut également faire appel à des cellules exprimant une lanostérol synthétase  
35 hétérologue, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant pour l'enzyme.

Une séquence d'ADNc humain de LSS est reproduite en annexe (SEQ ID No.1). Il s'agit de la séquence NM\_002340 dont la partie codante se situe de l'acide nucléique 33 à 2231.

### ***Applications diagnostiques***

- 5 Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de lésions acnéiques ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou d'activité de la protéine lanostérol synthétase (LSS), de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon
- 10 biologique d'un sujet contrôle.

L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine LSS par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène LSS, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité de la LSS peut être

15 également envisagé.

Dans le cadre d'un diagnostic, le sujet « contrôle » est un sujet « sain ».

- Dans le cadre d'un suivi de l'évolution des lésions acnéiques ou d'un désordre cutané lié à une hyperséborrhée, le « sujet contrôle » fait référence au même sujet à un temps différent, qui correspond de préférence au début du traitement (To). Cette mesure de la
- 20 différence d'expression ou d'activité de la LSS, ou d'expression de son gène ou d'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet notamment de suivre l'efficacité d'un traitement, notamment un traitement par un modulateur de la LSS, tel qu'envisagé plus haut, ou un autre traitement contre l'acné ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée. Un tel suivi peut conforter le patient quant au bien fondé, ou à la nécessité, de poursuivre ce
- 25 traitement.

- Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer des lésions acnéiques ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité
- 30 de la protéine lanostérol synthétase (LSS), de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

- Là encore, l'expression de la protéine LSS peut être déterminée par un dosage de cette protéine par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode,
- 35 notamment pour mesurer l'expression du gène LSS, est de mesurer la quantité d'ARNm

correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité de la LSS peut être également envisagé.

Le sujet testé est ici un sujet asymptomatique, ne présentant aucun trouble cutané lié à une hyperséborrhée ou une acné. Le sujet « contrôle » dans cette méthode, signifie un  
5 sujet ou une population de référence « saine ». La détection de cette susceptibilité permet la mise en place d'un traitement préventif et/ou d'une surveillance accrue des signes liés à l'acné ou à un désordre cutané associé à une hyperséborrhée.

Dans ces méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro*, l'échantillon biologique testé peut  
10 être n'importe quel échantillon de liquide biologique ou un échantillon d'une biopsie. De préférence l'échantillon peut être une préparation de cellules de la peau, obtenues par exemple par desquamation ou biopsie. Il peut également s'agir de sébum.

### **Méthodes de criblage**

15 Un objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou tout désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la lanostérol synthétase ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, ladite modulation indiquant l'utilité du composé  
20 pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, ou tout désordre cutané associé à une hyperséborrhée. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler l'expression ou l'activité de la LSS, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

25 Plus particulièrement, l'objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- 30 b. mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
- c. mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine lanostérol synthétase, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges  
35 réactionnels ;

- d. sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine lanostérol synthétase, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b), par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

5

Par « modulation », on entend tout effet sur l'expression ou l'activité de l'enzyme, l'expression du gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, à savoir éventuellement une stimulation, mais de préférence une inhibition, partielle ou complète. Ainsi, les composés testés à l'étape d) ci-dessus inhibent de préférence l'expression ou l'activité de la protéine lanostérol synthétase, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs. La différence d'expression obtenue avec le composé testé par rapport à un contrôle réalisé en l'absence du composé est significative à partir de 25% ou plus.

10

Dans l'ensemble du présent texte, à moins qu'il ne soit spécifié autrement, par « expression d'une protéine », on entend la quantité de cette protéine ;

15

Par « activité d'une protéine », on entend son activité biologique ;

Par « activité d'un promoteur », on entend la capacité de ce promoteur à déclencher la transcription de la séquence d'ADN codée en aval de ce promoteur (et donc indirectement la synthèse de la protéine correspondante).

20

Les composés testés peuvent être de tout type. Ils peuvent être d'origine naturelle ou avoir été produits par synthèse chimique. Il peut s'agir d'une banque de composés chimiques structuellement définis, de composés ou de substances non caractérisés, ou d'un mélange de composés.

25

Différents techniques peuvent être mises en œuvre pour tester ces composés et identifier les composés d'intérêt thérapeutique, modulateurs de l'expression ou de l'activité de la lanostérol synthétase.

30

Selon un premier mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant pour la lanostérol synthétase, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

Le gène rapporteur peut notamment coder pour une enzyme qui, en présence d'un substrat donné, conduit à la formation de produits colorés, telle que CAT (chloramphenicol acétyltransférase), GAL (beta galactosidase), ou GUS (beta glucuronidase). Il peut également s'agir du gène de la luciférase ou de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le dosage de la protéine codée par le gène rapporteur, ou de son activité, est réalisé classiquement, par des techniques colorimétriques, fluorométriques, ou de chimioluminescence, entre autres.

Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour la lanostérol synthétase, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène.

La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène LSS de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule ovarienne, ou encore mieux un sébocyte. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale, comme par exemple la glande préputiale, clitoridienne, ou encore la glande sébacée de la peau.

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour la lanostérol synthétase, de préférence humaine, ou de mammifère.

Une grande variété de systèmes de cellules hôtes peut être utilisée, telle que par exemples les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. L'acide nucléique peut être transfecté de manière stable ou transitoire, par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par phosphate de calcium, DEAE-dextran, liposome, virus, électroporation, ou microinjection.

Dans ces méthodes, l'expression du gène LSS ou du gène rapporteur peut être déterminée en évaluant le taux de transcription dudit gène, ou son taux de traduction.

Par taux de transcription d'un gène, on entend la quantité l'ARNm correspondant produite.

Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine produite.

L'homme du métier est familier des techniques permettant la détection quantitative ou semi-quantitative de l'ARNm d'un gène d'intérêt. Les techniques basées sur l'hybridation de l'ARNm avec des sondes nucléotidiques spécifiques sont les plus usuelles (Northern Blot, RT-PCR, protection à la RNase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands (par exemple, avidine/biotine).

En particulier, l'expression du gène peut être mesurée par PCR en temps réel ou par protection à la RNase. Par protection à la RNase, on entend la détection d'un ARNm

connu parmi les ARN-poly(A) d'un tissu qui peut se faire à l'aide d'une hybridation spécifique avec une sonde marquée. La sonde est un ARN complémentaire marqué (radioactif) du messenger à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la  
5 séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la sonde antisens. Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéinisé  
10 et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont détectés par autoradiographie.

Le taux de traduction du gène est évalué par exemple par dosage immunologique du produit dudit gène. Les anticorps utilisés à cet effet peuvent être de type polyclonal ou  
15 monoclonal. Leur production relève de techniques conventionnelles. Un anticorps polyclonal anti-lanostérol synthétase peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de l'enzyme entière. L'antisérum est prélevé puis épuisé selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler  
20 et Milstein (Nature (London), 256: 495- 497 (1975)). D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique clone à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage ("phage display"), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont  
25 typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E.coli).

Le dosage immunologique peut être réalisé en phase solide ou en phase homogène; en un temps ou en deux temps; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs. Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est  
30 immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, ou des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques.

Des dosages ELISA, des radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en oeuvre pour révéler la présence des complexes antigènes-anticorps  
35 formés.



La caractérisation des complexes antigène/anticorps, et plus généralement des protéines isolées ou purifiées mais également recombinantes (obtenues in vitro et in vivo) peut être réalisée par analyse en spectrométrie de masse. Cette identification est rendue possible grâce à l'analyse (détermination de la masse) des peptides générée par l'hydrolyse enzymatique des protéines (trypsine en générale). De façon générale, les protéines sont isolées selon les méthodes connues de l'homme du métier, préalablement à la digestion enzymatique. L'analyse des peptides (sous forme d'hydrolysats) est effectuée par séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leurs propriétés physico-chimiques (phase inverse). La détermination de la masse des peptides ainsi séparés est réalisée par ionisation des peptides et soit par couplage direct au spectromètre de masse (mode électrospray ESI), soit après dépôt et cristallisation en présence d'une matrice connue de l'homme de l'art (analyse en mode MALDI). Les protéines sont ensuite identifiées grâce à l'utilisation d'un logiciel approprié (par exemple Mascot).

Selon un troisième mode de réalisation, l'étape a) décrite ci-dessus consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une enzyme lanostérol synthétase et un substrat de l'enzyme, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'activité enzymatique.

L'enzyme lanostérol synthétase peut être produite selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Elle peut également être produite à l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple *E. coli* ou *B. subtilis*), des levures (par exemple *Saccharomyces*, *Pichia*) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

La détermination de l'activité enzymatique comprend de préférence la détermination de l'activité synthétase, par extraction des stérols produits et analyse chromatographique.

Des dosages de l'activité enzymatique de la LSS sont décrits dans la littérature (voir par exemple Kusano et al, 1991, *Chem. Pharm. Bull.* 39, 239-241, ou Morand et al, *Journals of Lipid Research*, 1997, 38:373-390).

Ainsi, l'activité de la lanostérol synthétase peut être évaluée de la manière suivante : l'ADNc de la lanostérol synthétase est exprimé sous le contrôle d'un promoteur glyceraldehydes-3-phosphate déshydrogénase dans une levure déficiente en lanostérol synthétase, GIL77 (Kushiro et al., *Eur. J. Biochem.*, 256, 238-241, 1998). L'extrait acellulaire obtenu de la cellule de levure transformée est utilisé. La levure est pour cela homogénéisée dans un tampon A [0.1 M tampon potassium-phosphate (pH 7.4), 0.45 M saccharose, 1 mM EDTA et 1 mM dithiothreitol] en présence de billes de verres traitées à

l'acide. Le surnageant obtenu par centrifugation est amené à la concentration de 10 mg/ml par addition du tampon A.

Un substrat  $^{14}\text{C}$ (3S)-2,3-oxydosqualène est préparé de manière biosynthétique par culture de cellules de levure GL7 déficientes en lanostérol (Gollub et al. J. Biol. Chem. 252, 2846-2854, 1977) en présence d'acétate  $^{14}\text{C}$  de sodium, pour incorporer la radioactivité dans l'oxydosqualène.

Le substrat (concentration finale, 0.17-0.42  $\mu\text{M}$ , 4.5 nCi) et le composé à tester sont ajoutés au tampon B [0.1 M tampon potassium-phosphate (pH7.4) et 0.1% Triton X-100] pour obtenir un volume total de 900  $\mu\text{l}$ , préincubé à 37°C pendant 10 minutes, avant l'ajout de l'enzyme (1 mg) pour préparer une solution de 1 ml, incubée à 37°C pendant 60 minutes. 6% potassium hydroxyde/ethanol est ajouté pour arrêter la réaction, et le mélange est saponifié par incubation à 37°C, pendant 10 minutes, avant ajout de cyclohexane (2 ml). La couche de cyclohexane est séchée, déposée sur plaque de chromatographie sur couche mince, et développée par un solvant benzène/acétone (19/1, v/v). Les quantités de substrat n'ayant pas réagi et de lanostérol  $^{14}\text{C}$  sont ensuite déterminées par analyseur BAS-1500 (Fuji Photo Film Co., Japon), pour calculer le taux d'inhibition de la synthèse de lanostérol.

### ***Modulateurs de l'enzyme***

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur de l'enzyme humaine lanostérol synthétase, susceptible d'être obtenu par l'une des méthodes ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur de l'enzyme humaine lanostérol synthétase, à un patient nécessitant un tel traitement.

L'invention vise enfin l'utilisation cosmétique d'un modulateur de l'enzyme humaine lanostérol synthétase, pour le traitement esthétique des peaux grasses.

De manière préférentielle, le modulateur est un inhibiteur de l'enzyme. Le terme « inhibiteur » se réfère à un composé ou une substance chimique qui élimine ou réduit substantiellement l'activité enzymatique de la lanostérol synthétase. Le terme « substantiellement » signifie une réduction d'au moins 25%, de préférence d'au moins 35%, de préférence encore d'au moins 50%, et de manière plus préférée d'au moins 70% ou 90%. Plus particulièrement, il peut s'agir d'un composé qui interagit avec, et bloque, le site catalytique de l'enzyme, comme des composés du type inhibiteur compétitif.

Un inhibiteur préféré interagit avec l'enzyme en solution à des concentrations en inhibiteur de moins de 1 $\mu$ M, de préférence moins de 0,1 $\mu$ M, de préférence encore moins de 0,01 $\mu$ M.

5 Le composé modulateur peut être un anticorps inhibiteur anti-lanostérol synthétase, de préférence un anticorps monoclonal. De manière avantageuse, un tel anticorps inhibiteur est administré en une quantité suffisante pour obtenir une concentration plasmatique d'environ 0.01 $\mu$ g par ml à environ 100 $\mu$ g/ml, de préférence d'environ 1 $\mu$ g par ml à environ 5 $\mu$ g/ml.

10 Le composé modulateur peut également être un polypeptide, un polynucleotide antisens d'ADN OU d'ARN, un si-ARN, ou un PNA ("Peptide nucleic acid", chaîne polypeptidique substituée par des bases puriques et pyrimidiques, dont la structure spatiale mime celle de l'ADN et permet l'hybridation à celui-ci).

15 Plusieurs inhibiteurs de la lanostérol synthétase sont connus, et proposés pour le traitement de l'hypercholestérolémie. L'invention comprend l'utilisation de tels composés inhibiteurs de la lanostérol synthétase pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. A titre non limitatif, on peut citer le Ro 48-8071 (ou [4'-(6-allyl-methyl-amino-hexyloxy)-2'-fluoro-phenyl]-(4-bromophenyl)-methanone fumarate) comme inhibiteur de la lanostérol synthétase.

20 D'autres composés modulateurs identifiés par la méthode de criblage décrite plus haut sont également utiles.

Les composés modulateurs sont formulés au sein de composition pharmaceutique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions peuvent  
25 être administrées par exemple par voie orale, entérale, parentérale, ou topique. De préférence, la composition pharmaceutique est appliquée par voie topique. Par voie orale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granules, d'émulsions, de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques  
30 ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau et des muqueuses et peut se présenter sous forme d'onguents, de  
35 crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de

suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques ou de patchs polymériques ou d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition pour application topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion. Dans une variante préférée, la composition pharmaceutique se présente sous la forme d'un gel, d'une crème ou d'une lotion.

La composition peut comprendre une teneur en modulateur de la LSS allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

10

La composition pharmaceutique peut en outre contenir des additifs inertes ou des combinaisons de ces additifs, tels que

- des agents mouillants;
- des agents d'amélioration de la saveur;
- 15 - des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;
- des agents stabilisants;
- des agents régulateurs d'humidité;
- des agents régulateurs de pH;
- des agents modificateurs de pression osmotique;
- 20 - des agents émulsionnants;
- des filtres UV-A et UV-B
- et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

25

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### **Légende des figures :**

Les Figures 1A et 1B sont des graphes qui montrent la mesure de l'expression du gène LSS chez des souris males gonadectomisées et traitées avec le véhicule, le DHT, la DHEA ou la combinaison de DHEA-Flutamide pendant une période de 7 jours une fois par jour (traitement long terme). Les résultats obtenus par la technique Affymetrix (Figure 1A) ont été confirmés par la technique de RT-PCR en temps réel (Figure 1B).

GDX: souris gonadectomisées et traitées avec le véhicule

35 DHT: souris gonadectomisées et traitées avec le Dihydrotestosterone (agoniste du récepteur aux androgènes)

DHEA: souris gonadectomisées et traitées avec la Dihydroepiandrosterone (précurseur des hormones stéroïdiennes; dans les glandes préputiales métabolisé en androgène actif)

DHEA-Flu: souris gonadectomisées et traitées avec une combinaison de Dihydroepiandrosterone et Flutamide (antagonistes du récepteur aux Androgènes; qui  
5 bloque les effets des agonistes DHT et DHEA).

Niveau d'expression : niveau d'expression de l'ARNm

Les figures 2A et 2B sont des graphes rapportant une étude cinétique de 15 minutes à 96 heures (Figure 2A) et une étude cinétique de 1 heure à 24 heures (Figure 2B). Dans la  
10 Figure 2A, les points l24a et l24b montrent le niveau d'expression de la lanosterol synthétase de souris contrôles (= souris non gonadectomisées; duplicat) au point 24 heures. Les points suivants proviennent de souris gonadectomisées et indiquent les temps successifs (en heures) de l'étude cinétique.

Niveau d'expression : niveau d'expression de l'ARNm

15 Carré: expression dans les souris gonadectomisées suite au traitement avec le DHT à temps zéro.

Losange: expression dans les souris gonadectomisées sans traitement DHT.

Dans la Figure 2B, le point Ctrl-24h montre le niveau d'expression de la lanosterol synthétase de souris gonadectomisées non traitées par le DHT au point 24 heures. Les  
20 points suivants proviennent de souris gonadectomisées et traitées avec le DHT et indiquent les temps successifs (en heures) de l'étude cinétique.

Niveau d'expression: niveau d'expression de l'ARNm

25 Les Figures 3A, 3B et 3C montrent l'expression de la LSS dans la glande sébacée de la peau de souris par hybridation in situ. La Figure 3A est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ utilisant une sonde sens de LSS (contrôle négatif; animal intact 44). La Figure 3B est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une  
30 coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal intact (animal 44). La Figure 3C est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal gonadectomisé (animal 53).

35 Les Figures 4A, 4B et 4C montrent l'expression de LSS dans la glande préputiale de souris par hybridation in situ. La Figure 4A est une photographie en éclairage classique et

en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde sens de LSS (contrôle négatif; animal 45). La Figure 4B est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal intact  
5 (animal 45). La Figure 4C est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal gonadectomisé (animal 53).

## 10 Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

### Exemple 1 : Expression de la lanosterol synthétase dans la glande sébacée humaine et dans l'épiderme humain

15 Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à la dispase et dissection sous une loupe binoculaire. Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés à partir des glandes sébacées et à partir de l'épiderme.

L'expression des gènes a été analysée sur une station d'Affymetrix (module microfluidique; four à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les protocoles fournis  
20 par la société. En bref, l'ARN total isolé des tissus est transcrit en ADNc. A partir de l'ADNc double brin, on synthétise un ARNc marqué à la biotine en utilisant la polymérase T7 et un NTP précurseur conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de petites tailles. Toutes les étapes de biologie moléculaire sont contrôlées en utilisant le système « Lab on a chip » d'Agilent pour confirmer les bonnes efficacités des  
25 réactions enzymatiques. La puce Affymetrix est hybridée avec l'ARNc biotinylé, rincée et ensuite marquée par fluorescence en utilisant un fluorophore conjugué à la Streptavidine. Après des lavages, la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel MAS5 fourni par Affymetrix. On obtient une valeur d'expression pour chaque gène ainsi que l'indication de la significativité de la valeur obtenue. Le calcul de la significativité de  
30 l'expression est basé sur l'analyse des signaux qui sont obtenus suite à l'hybridation de l'ARNc d'un gène donné avec un oligonucléotide hybridant parfaitement (« perfect match ») versus un oligonucléotide qui contient une mutation (« single mismatch ») dans la région centrale de l'oligonucléotide (voir tableau 1).

35 Tableau 1 : mesure de l'expression de la lanosterol synthétase dans l'épiderme et dans la glande sébacée humaine via l'utilisation de la technologie des puces affymetrix.

Identifiant Affymetrix	Nom du gène	Expression dans la glande sébacée humaine	Expression dans l'épiderme humain	Significativité de l'expression* dans la glande sébacée humaine	Significativité de l'expression* dans épiderme humain
202245_at	lanosterol synthétase (2,3- oxidosqualene- lanosterol cyclase)	302	255	1	1

\*Indicateur de la significativité de l'expression du gène analysé dans l'échantillon indiqué : présence (=1) ou absence (=0).

#### Résultats:

- 5 La lanosterol synthétase est bien exprimée dans les deux tissus (glande sébacée, épiderme). L'analyse différentielle entre l'expression dans la glande sébacée humaine et l'épiderme humain montre que l'expression légèrement plus forte dans la glande sébacée n'atteint pas de significativité par rapport à la valeur observée dans l'épiderme (tableau 1).
- 10 **Exemple 2 : Expression de la lanostérol synthétase dans la glande préputiale de souris**

- A. Les glandes préputiales de souris montrent une différenciation du type sébocytaire et sont utilisées comme modèle expérimental de glande sébacée. Elles ont une taille  
15 suffisante pour permettre l'isolement d'ARN sans avoir recours à des technologies de microdissection.

- L'analyse de l'expression de la Lanosterol synthétase dans les glandes préputiales de souris a été réalisée dans des conditions de déficiences en hormones stéroïdiennes  
20 (notamment en hormones androgéniques) suite à une gonadectomie. Les animaux gonadectomisés ont ensuite été traités avec des quantités physiologiques de Dihydrotestosterone (DHT) ou de Dihydroepiandrosterone (DHEA) pour restituer un niveau physiologique des hormones androgéniques, ou bien comme expérience de contrôle avec une combinaison de DHEA-Flutamide dans laquelle le Flutamide, un  
25 antagoniste du récepteur aux Androgènes bloque l'effet de la DHEA. La comparaison de

l'expression génique dans ces conditions expérimentales permet d'identifier de façon non ambiguë la modulation ou non de l'expression génique d'une gène en question par les hormones androgéniques.

- 5 L'expression génique a été analysée en utilisant la technologie Affymetrix décrit ci-dessus (Figure 1A) et les résultats ont ensuite été confirmés par la technique de PCR en temps réel (figure 1B).

La PCR en temps réel a été menée en suivant les protocoles fournis par la société Applied Biosystems en utilisant le « 7900HT Sequence Detection System ». L'ARN total  
10 isolé des tissus est transcrit (RT) en l'ADNc et celui-ci est amplifié par PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase). La progression de la PCR est suivie en temps réel en utilisant des sondes TaqMan fluorescentes, permettant une quantification précise de la quantité d'ARNm d'un gène donné, présent dans l'échantillon biologique au départ.

- 15 Résultat: L'ARNm de la lanosterol synthétase est induit par un traitement chronique pendant 7 jours aux androgènes dans la glande préputiale.

B. Des souris mâles ont été gonadectomisées et ensuite étaient traitées avec le véhicule, ou le DHT. Les glandes préputiales ont été prélevées pendant une période allant jusqu'à  
20 4 jours (traitement androgénique unique – observation d'une cinétique de court terme). L'ARN a été isolé et l'expression des gènes a été analysée par la technique Affymetrix. Les Figure 2A et Figure 2B représentent le niveau d'expression relative de l'ARNm en fonction du temps.

- 25 Résultats:

La gonadectomie (qui provoque une déficience d'hormones stéroïdiennes) induit une diminution de la quantité d'ARNm de la lanosterol synthétase dans la glande préputiale de la souris.

L'ARNm de la lanosterol synthétase dans la glande préputiale de la souris est induit par  
30 un traitement court terme avec le DHT (effet visible à 18, 24 et 96 heures).

**Exemple 3 : Expression de LSS dans la glande sébacée de la peau de souris par « hybridation *in situ* »**

- 35 Méthodes :



Des sondes sens et antisens ont été préparées à partir du gène LSS par incubation du gène linéarisé (2µg) avec 63µCi de [<sup>35</sup>S]UTP (1250 Ci/mmol ; NEN, Massachusetts, USA) en présence de l'ARN polymérase T7 ou T3. L'hybridation in situ a été réalisée sur un tissu de souris fixé au formaldéhyde et enveloppé dans de la paraffine. Des sections (4µm  
5 de large) ont ensuite été déparaffinées dans du toluène et réhydratées dans un gradient d'alcool. Après séchage, les différentes sections ont été incubées dans un tampon de préhybridation pendant deux heures. L'hybridation s'est déroulée sur la nuit dans un tampon d'hybridation (tampon de préhybridation avec 10mM DTT et 2X10<sup>6</sup> cpm ARN/µl <sup>35</sup>Smarqué) à 53°C. L'excès de sonde a été éliminé et les coupes ont été inclinées dans  
10 une émulsion LM1 (Amersham Biosciences, UK) et exposées dans le noir à 4°C pendant au moins un mois. Les coupes ont alors été développées et contre colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. L'hybridation avec la sonde sens a été utilisée comme témoin négatif et on a uniquement détecté le bruit de fond. Ces sondes ont été incubées avec des coupes histologiques de la peau de souris ou de la glande préputiale de souris.  
15 Suite à l'incubation en présence d'une émulsion photographique, les structures histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées (accumulation de grains argentés). Un signal spécifique se manifeste par un marquage positif avec la sonde antisens (Figure 3B et Figure 3C) et l'absence de marquage avec la sonde sens (Figure 3A) utilisé comme contrôle négatif.

20

### **RESULTATS:**

On observe sur la Figure 3A qu'il n'y a pas d'accumulation de grains argentés (pas de marquage) ce qui est en accord avec les attentes des inventeurs car elle correspond au contrôle négatif. La Figure 3B montre un fort marquage de la couche basale de la glande  
25 sébacée, visible par accumulation de grains argentés. La Figure 3C montre aussi un marquage de la couche basale de la glande sébacée.

LSS est exprimé dans les couches basales des glandes sébacées de la peau de souris. Une analyse fine basée sur l'observation de coupes histologiques obtenues pour 4  
30 animaux intacts et 4 animaux gonadéctomisés montre une expression plus forte dans les glandes sébacées des animaux intacts que dans les animaux gonadéctomisés. Ce résultat est en accord avec l'induction du gène par une stimulation androgénique observé dans les expériences Affymetrix et RT-PCR.

35 **Exemple 4 : Expression de LSS dans la glande préputiale de souris par « hybridation in situ »**

**Méthodes :**

Les méthodes utilisées dans cet exemple sont identiques à celles de l'exemple 3.

- 5 Les glandes préputiales de souris montrent une différenciation du type sébocyttaire et sont utilisées comme modèle expérimental de glande sébacée.

**RESULTATS:**

- 10 La Figure 4A ne montre pas de marquage au niveau de la glande préputiale ce qui est en accord avec les attentes des inventeurs car elle correspond au contrôle négatif. La Figure 4B montre un très fort marquage de la glande préputiale de souris dans un animal normal. La Figure 4C montre un marquage plus modéré des acini de la glande préputiale dans un animal gonadéctomisé.

- 15 LSS est exprimé dans la glande préputiale de souris, en particulier dans les couches basales des acini. Une analyse de plusieurs coupes histologiques provenant de 4 animaux contrôles et 4 animaux gonadéctomisés indique une expression nettement plus forte dans les glandes préputiaux des animaux intacts.

- 20 En résumé, les résultats d'hybridation in situ dans la glande préputiale de souris indiquent que l'expression de l'enzyme LSS augmente dans des conditions caractérisées par une stimulation androgénique (animaux intacts). Ces observations sont en accord avec les données obtenues par les technologies Affymetrix et la PCR en temps réelle.

25

**Exemple 5 : Exemples de Compositions****A- VOIE ORALE**

30 **Comprimé de 0,2 g**

- Ro 48-8071	0,001 g
- Amidon	0,114 g
- Phosphate bicalcique	0,020 g

- Silice	0,020 g
- Lactose	0,030 g
- Talc	0,010 g
- Stéarate de magnésium	0,005 g

5

B- VOIE TOPIQUE(a) Onguent

10	- Ro 48-8071	0,300 g
	- Vaseline blanche codex	qsp 100 g

(b) Lotion

15	- Ro 48-8071	0,100 g
	- Polyéthylène glycol (PEG 400)	69,900 g
	- Ethanol à 95%	30,000 g

## REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la lanostérol synthétase (LSS) ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
- Préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
  - Mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
  - Mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine lanostérol synthétase, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
  - Sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine lanostérol synthétase, ou une modulation de l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à l'étape d) inhibent l'expression ou l'activité de la protéine lanostérol synthétase, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant pour la lanostérol synthétase, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

5. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour la lanostérol synthétase, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
- 5 6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des sébocytes.
7. Méthode selon la revendication 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue, codant pour la lanostérol synthétase.
- 10 8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène.
- 15 9. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de traduction dudit gène.
10. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que l'étape a) consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une enzyme lanostérol synthétase et un substrat de l'enzyme, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'activité enzymatique.
- 20 11. Méthode selon la revendication 10, dans laquelle la détermination de l'activité enzymatique comprend la détermination de l'activité synthétase par extraction des stérols produits et analyse chromatographique.
- 25

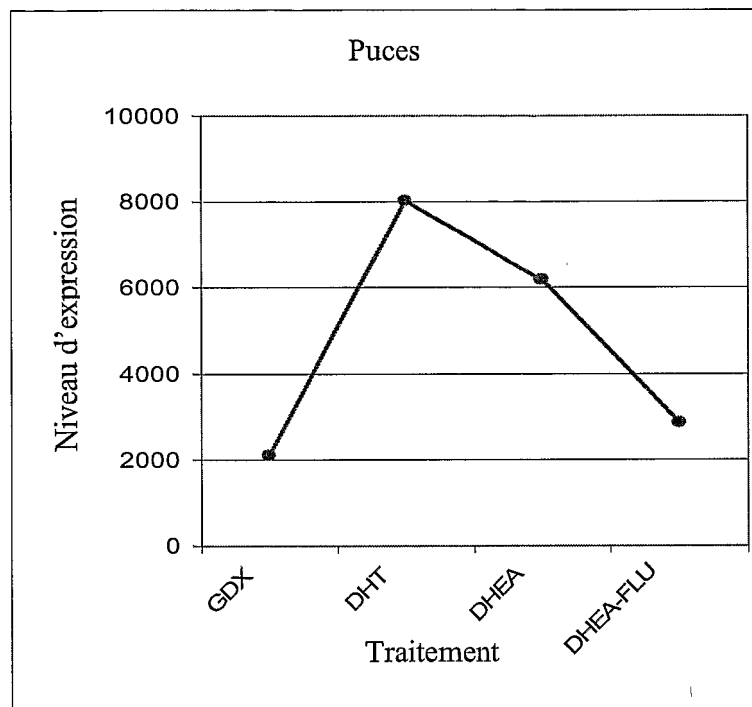


FIGURE 1A

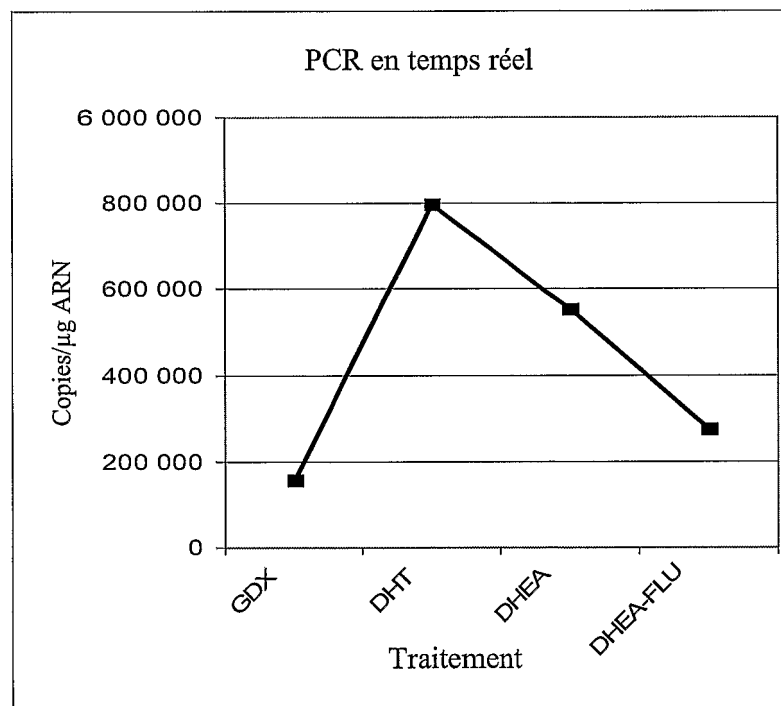


FIGURE 1B

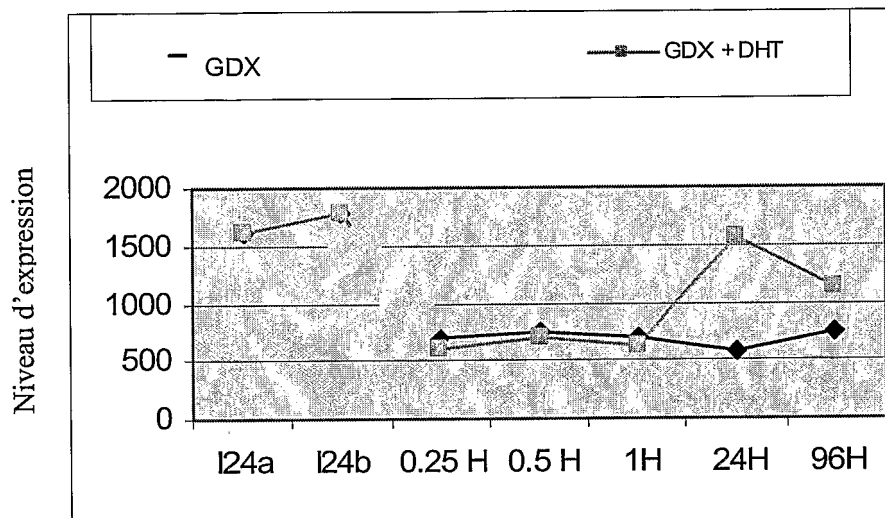


FIGURE 2A

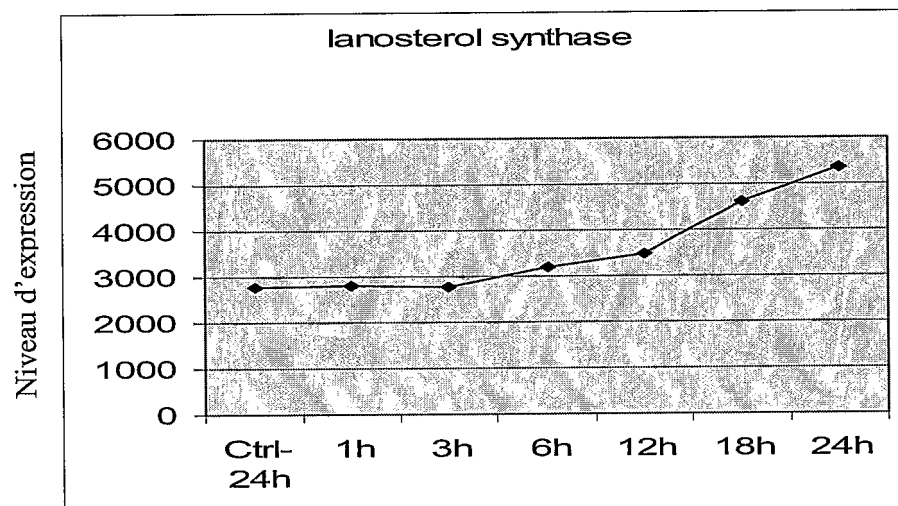


FIGURE 2B

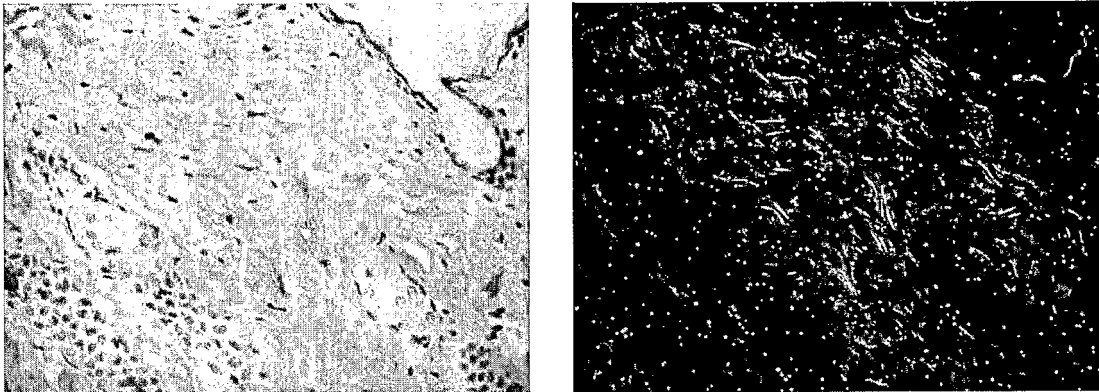


Figure 3A

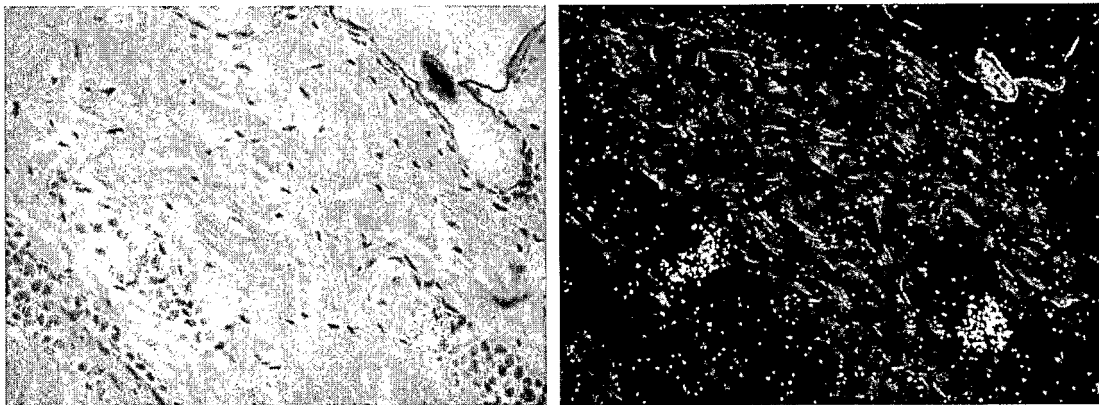


Figure 3B

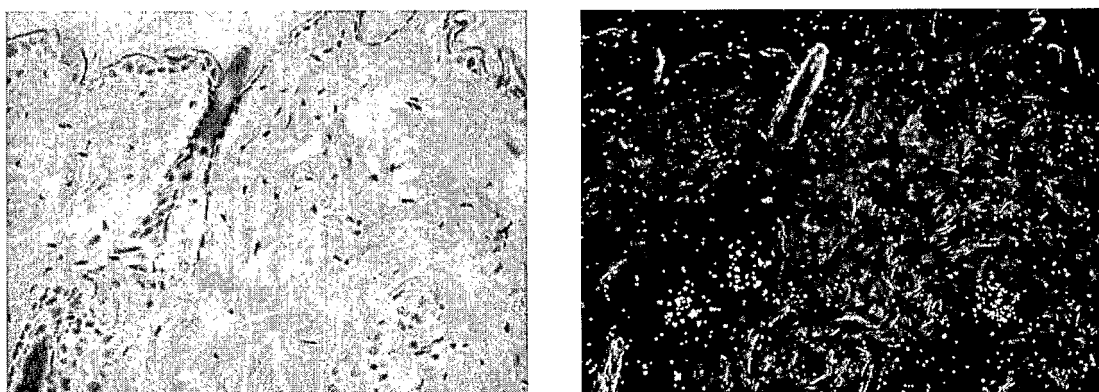


Figure 3C



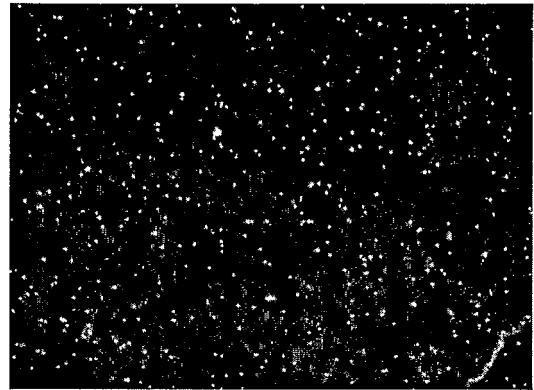
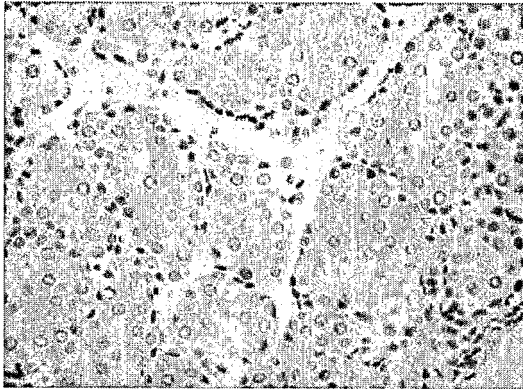


Figure 4A

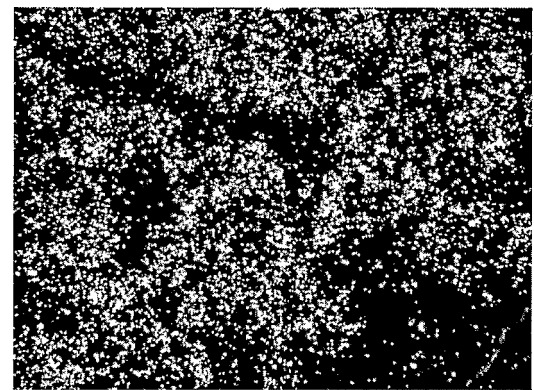
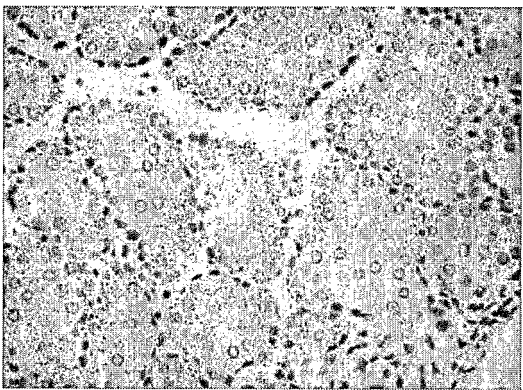


Figure 4B

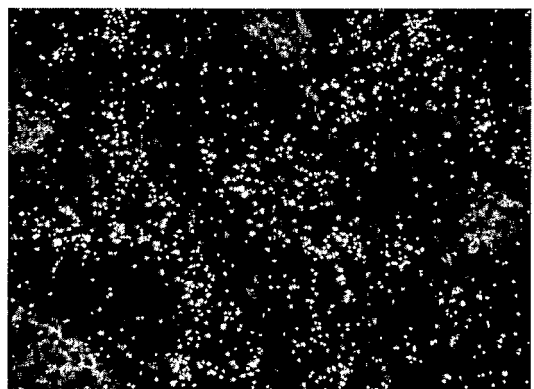
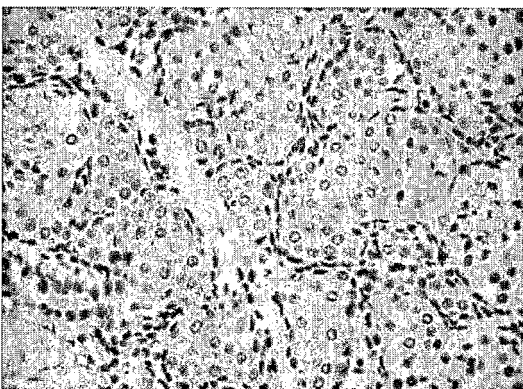


Figure 4C