



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 351 856**

⑤1 Int. Cl.:

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **03738666 .1**

⑨6 Fecha de presentación : **03.07.2003**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1541171**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

⑤4 Título: **Medicamentos para disminuir la tasa de glucosa en sangre.**

③0 Prioridad: **05.07.2002 JP 2002-197582**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.02.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.02.2011

⑦3 Titular/es: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA**
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo, 115-8543, JP

⑦2 Inventor/es: **Asakawa, Akihiro y**
Inui, Akio

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Técnica anterior

[0001] En Japón, la rápida occidentalización de la dieta ha dado lugar a una "era de saciedad". Además, con la propagación de una civilización mecanizada tipificada por el automóvil, un número cada vez mayor de Japoneses se encuentran en un estado de inactividad física crónica. Dado este entorno social, la población diabética en Japón ha aumentado recientemente a ritmos asombrosos a aproximadamente cinco o seis millones, incluyendo los pacientes potenciales.

[0002] La diabetes mellitus se clasifica en dos tipos principales, el tipo I (diabetes mellitus insulino-dependiente, o DMID) y el tipo II (diabetes mellitus no insulino-dependiente, o DMNID). La diabetes de tipo I aparece más comúnmente en menores; en esta enfermedad, los islotes de Langerhans del páncreas, que son responsables de la secreción de insulina, son destruidos por infecciones víricas u otras y se vuelven totalmente incapaces de segregar insulina. La diabetes de tipo II aparece predominantemente en personas de mediana edad y en los ancianos; casi todos (aproximadamente un 95%) los diabéticos en Japón quedan incluidos en esta clasificación. Las personas predispuestas a la diabetes debido a una tendencia a una insuficiente secreción de insulina desarrollarán la enfermedad como consecuencia de la inhibición fisiológica de la acción de la insulina, tal como por ingestión de un exceso de calorías, inactividad física, obesidad, estrés y envejecimiento.

[0003] La diabetes mellitus está estrechamente relacionada con la obesidad y un estudio muestra que aproximadamente dos tercios de los pacientes con DMNID o bien son obesos ahora o bien experimentaron obesidad en el pasado. De hecho, se ha visto que la acción reductora de la glucosa en sangre de la insulina es baja en personas obe-

sas.

[0004] La obesidad tiene cada vez mayor prevalencia y es un importante problema de salud en todo el mundo, particularmente en las sociedades desarrolladas. En los
5 EE.UU., más de la mitad de todos los adultos tienen actualmente sobrepeso. Allison *et al.* informaron que aproximadamente 280.000 muertes en EE.UU. en 1991 eran atribuibles a la obesidad (Allison DB *et al.*, JAMA, 282: 1530-1538, 1991). Se sabe que la fisiopatología de la
10 obesidad es una ingestión prolongada y excesiva de nutrientes en relación al gasto. Se ha visto que una "dieta occidental" que tiene un alto contenido en grasa va asociada a un mayor riesgo de obesidad.

[0005] La clave para la regulación del peso corporal
15 es el equilibrio entre la ingestión de alimento y el consumo energético y un desequilibrio entre los dos causa o bien obesidad o bien delgadez. La leptina fue descubierta por vez primera en 1994 y desde entonces se vio que era crítica para la regulación del peso corporal como señal
20 de adiposidad. Se han descubierto también una gran cantidad de nuevos péptidos que se localizan secuencia abajo de la cascada de la leptina y que están implicados en la regulación del apetito. En particular, ha quedado claro que grupos de neuropéptidos derivados del hipotálamo que
25 se consideró previamente que tenían funciones independientes desempeñan papeles individuales secuencia abajo de la cascada de la leptina y que se produce un íntimo intercambio de información entre esos grupos de neuropéptidos.

[0006] Entre esos neuropéptidos, el neuropéptido Y (NPY), las orexinas, la motilina, la hormona concentradora de la melanina (HCM) y la proteína relacionada con el agouti (AGRP) son conocidos como sustancias incrementadoras del apetito. Se conocen como sustancias supresoras
35 del apetito la hormona estimuladora de α -melanocitos (α -

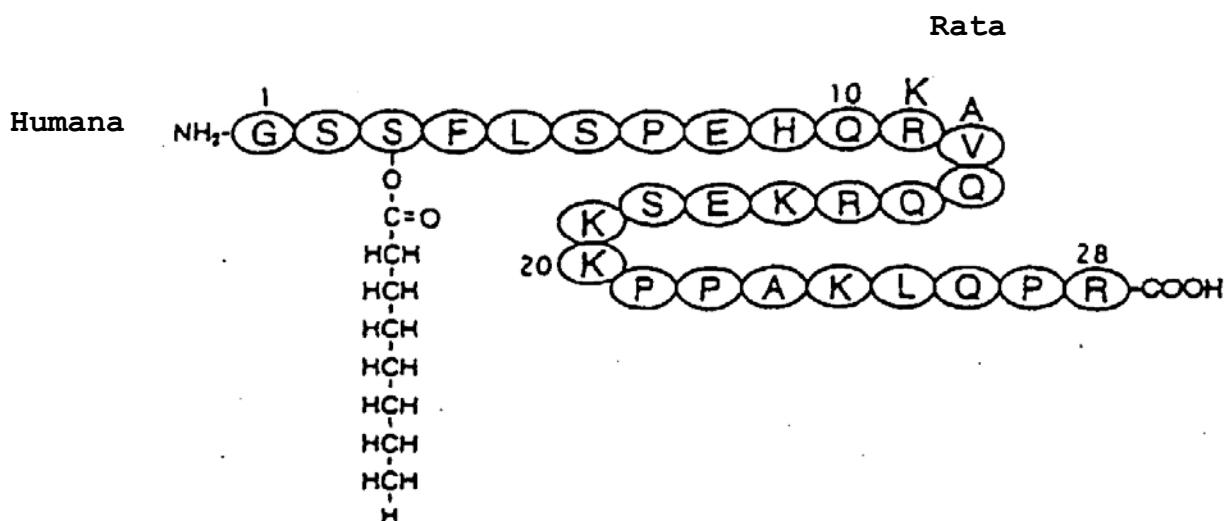
MSH), el factor liberador de corticotropina (CRF), el transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART) y la colecistoquinina (CCK). Se considera que estos péptidos están implicados en el mecanismo fisiológico de control del apetito y que también afectan a la homeostasis energética.

[0007] La hormona del crecimiento es segregada por el lóbulo anterior de la hipófisis; su secreción está controlada de un modo ingenioso, ya que es estimulada por la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) procedente del hipotálamo y suprimida por la somatostatina. Se ha visto recientemente que existe un mecanismo regulador de la secreción de GH a través de una ruta diferente a la que implica a la GHRH y a la somatostatina. Se han investigado los detalles de este mecanismo de regulación de la secreción de GH a través de una ruta diferente mediante estudios sobre el secretagogo de la hormona de crecimiento (GHS), que es un compuesto sintético que tiene la actividad de promover la secreción de GH. El GHS actúa a través de una ruta diferente a la GHRH. Para resumirlo, la GHRH activa el receptor de GHRH para elevar la concentración intracelular de AMPc, mientras que el GHS activa un receptor diferente del receptor de GHRH para elevar la concentración intracelular de ion Ca^{++} mediada por el sistema IP3 intracelular. Se identificó la estructura de GHS-R, el receptor sobre el que actúa el GHS, por la clonación de expresión en 1996 (Howard A.D. *et al.*, Science, 273: 974-977, 1996). El GHS-R es un receptor acoplado a proteína G típico que tiene siete dominios de expansión de transmembrana y que se expresa predominantemente en el hipotálamo y en la glándula pituitaria.

[0008] Además, la existencia del receptor que se une al GHS, que es un compuesto sintético que no se encuentra de forma natural en los organismos vivos, ha inducido a

los científicos a buscar ligandos endógenos que activen el GHS-R al unirse a él. Como resultado, se purificó la grelina a partir del estómago de rata y se identificó como un ligando específico para GHS-R (Kojima M. *et al.*,
 5 Nature, 402: 655-660, 1999).

[0009] La grelina es un péptido de 28-aminoácidos, con una modificación n-octanoílo sobre la Ser 3 (serina del 3° residuo de aminoácido). La grelina humana difiere de la grelina de rata en dos residuos de aminoácido. A
 10 continuación se muestran las fórmulas estructurales de la grelina de rata y de la humana:



[0010] La grelina químicamente sintetizada presente en una cantidad del orden nanomolar tiene la actividad de elevación del Ca⁺⁺ intracelular en células CHO en las que se expresa GHS-R, así como la actividad de liberación de hormona del crecimiento en un cultivo primario de células
 20 de la glándula pituitaria. La grelina también eleva la hormona del crecimiento en la sangre en ratas *in vivo*. El ARNm de la grelina se expresa altamente en el estómago y la grelina está también presente en la sangre. El GHS-R está presente en el hipotálamo, el corazón, el pulmón, el
 25 páncreas, el intestino delgado y el tejido adiposo (*ibid.* Kojima *et al.*). Además, se ha descrito que la grelina estimula la alimentación (Wren *et al.*, Endocrinology,

141(11): 4325-4328, 2000). Los presentes inventores vieron con anterioridad que la grelina mostraba una marcada acción promotora del apetito a través del receptor NPY e Y1 y propusieron que la grelina sería útil como agente terapéutico para enfermedades que muestran un síntoma de hipoalimentación (PCT/JP02/00765).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0011] Según la presente invención, se proporciona un antagonista de los receptores del secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R) para uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre.

Breve descripción de los dibujos

[0012]

La Fig. 1A muestra las secuencias de aminoácidos de la grelina humana y de la motilina humana y la Fig. 1B muestra las secuencias de aminoácidos de un receptor de grelina humana y de un receptor de motilina humana, indicándose con asteriscos los mismos aminoácidos.

La Fig. 2 muestra el efecto de la grelina administrada IP sobre el peso corporal bajo una dieta de alto contenido en grasas.

La Fig. 3 muestra el efecto de la grelina administrada IP sobre la masa grasa del epidídimo bajo una dieta de alto contenido en grasas.

La Fig. 4 muestra la expresión del ARNm de la leptina, de la adiponectina y de la resistina en WAT tras la administración IP de grelina, valorada por análisis Northern blot.

La Fig. 5 muestra la expresión del ARNm de la grelina bajo una dieta de alto contenido en grasas, valorada por análisis Northern blot.

La Fig. 6 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP sobre la ingestión de alimento.

La Fig. 7 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 ad-

ministrado ICV sobre la ingestión de alimento.

La Fig. 8 muestra el efecto de la administración simultánea de grelina (IP) y [D-Lys-3]-GHRP-6 (ICV) sobre la ingestión de alimento.

5 La Fig. 9 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP sobre la velocidad de vaciado gástrico.

La Fig. 10 muestra el efecto de [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P administrada IP sobre la ingestión de alimento.

10 La Fig. 11 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP sobre la ingestión de alimento.

La Fig. 12 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP sobre la ingestión de alimento en ratones *ob/ob*.

15 La Fig. 13 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 repetidamente administrado sobre el aumento de peso corporal en ratones *ob/ob*.

La Fig. 14 muestra el efecto de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP sobre los ácidos grasos libres en ratones *ob/ob*.

20 MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

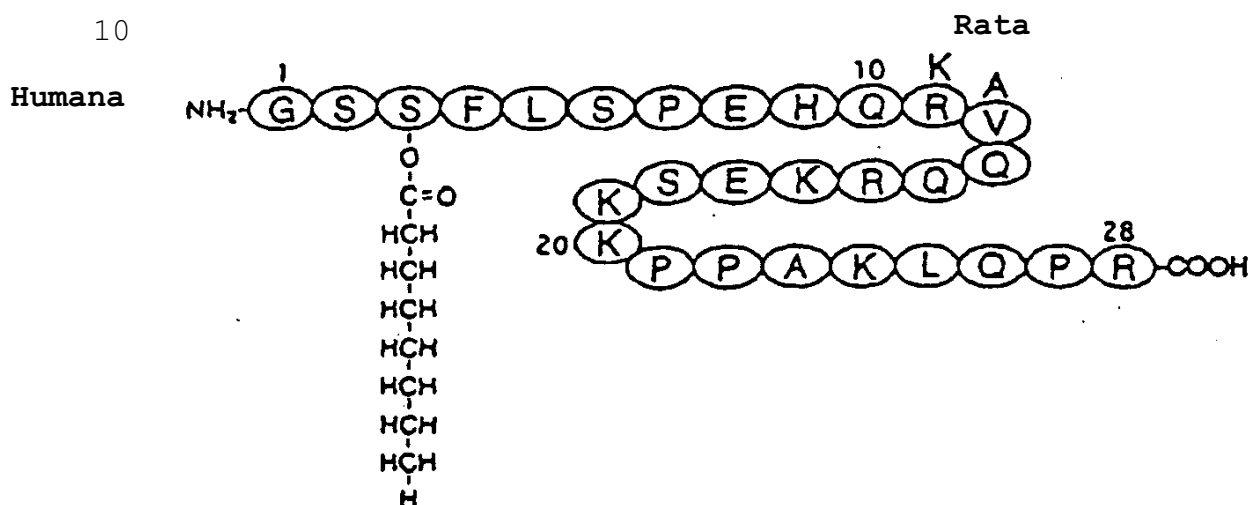
[0013] Los antagonistas GHS-R utilizados como principios activos en la presente invención son sustancias que pueden unirse a GHS-R, inhibiendo así los efectos de los agonistas. Son antagonistas GHS-R útiles los antagonistas de la grelina o de los análogos de la grelina.

[0014] Los antagonistas de la grelina o de los análogos de la grelina pueden ser típicamente identificados por el método de rastreo descrito a continuación (véase PCT/JP02/00765).

[0015] Para decirlo de una manera específica, el rastreo de los antagonistas de la grelina o de los análogos de la grelina puede ser realizado, aunque sin limitación, administrando una sustancia candidata a un animal

en presencia o ausencia de grelina o de un análogo de la grelina y midiendo la ingestión de alimento, la expresión de ARNm NPY, la cantidad de unión entre NPY y su receptor Y1, el consumo de oxígeno, la velocidad de vaciado gástrico o la actividad del nervio vago.

[0016] Nótese que la grelina es la grelina de rata o la grelina o análogo de grelina humana, que se representan mediante la fórmula I:



[0017] Los análogos de grelina, tal como se describen aquí, incluyen aquéllos que tienen uno o más de los 28 aminoácidos suprimidos, substituidos o añadidos, siempre que tengan la acción promotora del apetito deseada. También se incluyen diversos derivados de dichos análogos de grelina [v.g., derivados que tienen aminoácidos constituyentes de los péptidos substituidos (incluyendo los que tienen un grupo, digamos un alquileo, insertado entre aminoácidos) y derivados éster].

[0018] La grelina o los análogos de grelina pueden ser producidos por cualquier método e incluyen, aunque sin limitación, los aislados y purificados a partir de células humanas o de rata, los sintetizados o semisintetizados y los obtenidos por ingeniería genética.

[0019] Un ejemplo típico de los análogos de grelina que tienen uno o más de los 28 aminoácidos suprimidos,

substituidos o añadidos es la des-Gln14-grelina, en donde se ha suprimido la Gln 14 de la grelina. La des-Gln14-grelina de rata se produce debido a diferencias en el ajuste del gen de la grelina; en el estómago de la rata, este análogo representa aproximadamente una cuarta parte de la grelina y proporciona la misma intensidad de actividad liberadora de hormona del crecimiento.

[0020] También se incluyen entre los análogos de la grelina los siguientes, que se describen en J. Med. Chem., 43, 4370-4376, 2000. Son ejemplos aquellos péptidos o derivados de los mismos que tienen dos de los 28 aminoácidos de la grelina, es decir, los que están en las posiciones 3 y 4 desde el extremo N (preferiblemente los cuatro aminoácidos del extremo N) y que tienen la cadena lateral en el tercer aminoácido (Ser) a partir del extremo N substituida, siempre que tengan una acción promotora de la liberación de la hormona del crecimiento.

[0021] Pueden ser ejemplos de la cadena lateral en el tercer aminoácido a partir del extremo N grupos acilo distintos del grupo octanoílo, que es la cadena lateral en la grelina, y grupos alquilo (los grupos acilo y alquilo tienen preferiblemente 6-18 átomos de carbono). Como cadenas laterales específicas, se incluyen:

-CH₂(CH₂)₉CH₃, -(CO)-(CH₂)₆CH₃, -CO-CH=CH-CH=CH-CH=CH-CH₃,
-CO-CH(CH₂CH₂CH₃)₂, -CO-(CH₂)₉CH₃, -CO-(CH₂)₁₄CH₃, -CO-(CH₂)₆CH₂Br, -CO-CH(CH₂)₂CONH(CH₂)₂CH₃, -COPh y las fórmulas siguientes:



[0022] Como ejemplos específicos de análogos de grelina que tienen los aminoácidos en las posiciones 3 y 4 desde el extremo N y que tienen la cadena lateral en el tercer aminoácido (Ser) a partir del extremo N substitui-

da, se incluyen $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO-Ser (octil)-Phe-Leu-NH-}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ y el compuesto descrito en el 37 Peptide Forum (18-20 de Octubre de 2000).

[0023] En la presente invención, se usaron [D-Lys-
5 3]-GHRP-6 (Veeraragavan K. *et al.*, Life Sci. 50: 1149-55, 1992) y [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P (Cheng, K. *et al.*, Journal of Endocrinology, 152: 155-158, 1997) como antagonistas GHS-R para verificar los efectos de la invención.

10 **[0024]** Los agentes terapéuticos de la presente invención pueden ser administrados central (v.g., por la vía intracerebroventricular o inyectados en la columna vertebral) o periféricamente. Se prefiere la administración periférica. Muchos de los péptidos reguladores del
15 apetito administrados periféricamente no muestran la misma acción que cuando se administran centralmente; sin embargo, los agentes terapéuticos de la presente invención redujeron significativamente el nivel de glucosa en sangre incluso cuando se administraron periféricamente. Por
20 lo tanto, los agentes terapéuticos de la presente invención pueden ser administrados convenientemente, causando menos dolor al paciente y ofreciendo así ventajas mucho mayores que los péptidos reguladores del apetito convencionales.

25 **[0025]** Los antagonistas GHS-R pueden ser formulados solos o junto con soportes y aditivos farmacológicamente aceptables en preparaciones orales y preparaciones parenterales comunes mediante procedimientos conocidos de formulación farmacéutica. Por ejemplo, pueden ser formulados
30 en preparaciones en solución (v.g., inyecciones para vía intraarterial, intravenosa o subcutánea, gotas nasales y jarabes), tabletas, pastillas para chupar, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos y supositorios. Es también posible el uso en sistemas de administración de fármacos (co-
35 mo para terapia de liberación prolongada).

[0026] La dosis de los agentes terapéuticos de la presente invención varía con la edad del paciente, su peso corporal, los síntomas, la vía de administración, etc. y debe ser determinada según el criterio de un médico.

5 Normalmente, para administración intravenosa, la dosis varía de aproximadamente 0,1 µg a 1.000 mg por kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal y más preferiblemente de 0,1 mg a 10 mg por kg de peso corporal, calculada para el
10 antagonista GHS-R. Sin embargo, la dosis no se limita en modo alguno a estos rangos.

[0027] Como se describirá en los Ejemplos que se darán más adelante, los presentes inventores midieron el peso corporal, la masa grasa, la glucosa, la insulina y
15 las expresiones génicas de la leptina, la adiponectina y la resistina en el tejido adiposo blanco tras administraciones repetidas de grelina bajo una dieta rica en grasas. Los inventores valoraron también la expresión gástrica del gen de la grelina por análisis Northern
20 blot. Además, los inventores midieron la ingestión de energía y el vaciado gástrico tras la administración de los antagonistas GHS-R. Se continuó con la administración repetida de los antagonistas GHS-R durante seis días en ratones obesos ob/ob y se estudió su eficacia.

25 **[0028]** Los resultados fueron los siguientes: la grelina indujo una adiposidad apreciable y empeoró el control glicémico bajo una dieta rica en grasas; la grelina elevó la expresión del ARNm de la leptina y también redujo la expresión del ARNm de la resistina; y la expresión
30 gástrica del ARNm de la grelina aumentó con una dieta rica en grasas.

[0029] Los antagonistas GHS-R redujeron la ingestión de energía en ratones delgados, en ratones con obesidad inducida por la dieta y en ratones obesos ob/ob, asociándose su mecanismo de acción a la reducción del vaciado
35

gástrico. La administración repetida de los antagonistas GHS-R redujo el aumento de peso corporal y mejoró el control glicémico en ratones ob/ob.

[0030] Por lo tanto, se ha verificado que la grelina está estrechamente relacionada con el aumento de peso corporal en exceso, la adiposidad y la resistencia a la insulina, particularmente bajo una dieta rica en grasas. Discusión de los efectos de los antagonistas GHS-R sobre la alimentación

[0031] En base a la predicción de que los antagonistas GHS-R inducirían un estado de equilibrio energético negativo, los presentes inventores examinaron los efectos de los antagonistas GHS-R sobre la alimentación. Los antagonistas GHS-R administraron redujeron la alimentación en ratones delgados y en ratones a los que se había convertido en obesos mediante una dieta rica en grasas. Informes previos han mostrado que el GHS-R está presente en el hipotálamo, el corazón, el pulmón, el páncreas, el intestino delgado y el tejido adiposo. En el hipotálamo, el GHS-R se localiza en el núcleo arcuato (ARC), donde se sintetizan dos péptidos orexigénicos, el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con el agouti (AGRP), en las neuronas. Además, secretagogos GH no peptídicos actúan sobre el hipotálamo para alterar la actividad eléctrica de las neuronas ARC y activar la expresión del c-fos (véase, por ejemplo, Lawrence *et al.*, *Endocrinology*, 143: 155-162, 2002). Hasta la fecha, se ha descrito que la grelina estimula el comportamiento de alimentación al estar implicado su mecanismo de acción en la activación directa de las neuronas NPY y AGRP hipotalámicas en el ARC, donde la barrera hematoencefálica es menos efectiva (véase, por ejemplo, Inui, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 551-560, 2001). Sin embargo, una ruta alternativa para la señalización de la grelina a partir del estómago es mediante una red neural ascendente que va a través del nervio

vago y de los núcleos del tronco cerebral y que alcanza finalmente el hipotálamo. En la presente invención, los antagonistas GHS-R centralmente administrados abolieron la acción estimuladora sobre la alimentación inducida por la grelina periféricamente administrada. Estos resultados sugieren que la grelina puede actuar a través de GHS-R en el cerebro. Los presentes inventores demostraron también que los antagonistas GHS-R periféricamente administrados reducían la velocidad de vaciado gástrico, lo que contribuye a su acción anorexígena (acción supresora del apetito). Se ha acumulado una considerable evidencia que indica que la distensión gástrica actúa como señal de saciedad para inhibir la ingestión de alimento y que el rápido vaciado gástrico se relaciona con la sobrealimentación y la obesidad, mientras que un vaciado gástrico retardado se relaciona con la anorexia y la caquexia (Inui, Mol. Psychiatry, 6: 620-624, 2001). Estudios previos han mostrado que la grelina aumenta la velocidad de vaciado y la motilidad del estómago a través de la ruta vagal (Inui, Nat. Rev. Neurosci., 2: 551-560, 2001).

[0032] La presente invención muestra que el GHS-R desempeña un papel en el control del comportamiento de alimentación y que el antagonismo del GHS-R puede ser un enfoque prometedor para el tratamiento de la obesidad.

[0033] Los presentes inventores demostraron además que los antagonistas GHS-R periféricamente administrados producían una acción anorexígena y causaban pérdida de peso corporal y reducían las concentraciones de glucosa en sangre en ratones *ob/ob*, que se conocen como modelo genético de obesidad y diabetes mellitus con resistencia a la insulina y rápido vaciado gástrico. Esta notable reducción en los niveles de glucosa, junto con la reducción moderada de los niveles de insulina en suero, indica el papel de los antagonistas GHS-R en el mejoramiento de la resistencia a la insulina. Por otra parte, se ha visto

que elevaciones de los FFA en plasma inducen resistencia a la insulina por inhibición de la actividad de transporte de la glucosa, estando implicado su mecanismo de acción en la reducción de la actividad fosfatidilinositol 3-kinasa. Recientemente, se ha descrito que una elevada concentración circulante de FFA es un factor de riesgo independiente para la muerte súbita en hombres de mediana edad en un estudio de cohorte a largo plazo (Jouven *et al.*, *Circulation*, 104: 756-761, 2001). En los Ejemplos que se dan a continuación, los antagonistas GHS-R produjeron una notable disminución en los niveles de FFA de ratones obesos ob/ob.

[0034] En conclusión, los presentes inventores vieron que los antagonistas GHS-R, [D-Lys-3]-GHRP-6 y [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P, periféricamente administrados reducían la ingestión de alimento en ratones delgados, en ratones con obesidad inducida por la dieta y en ratones obesos ob/ob. Los inventores vieron también que la administración repetida de [D-Lys-3]-GHRP-6 reducía el aumento de peso corporal y mejoraba el control glicémico en ratones.

[0035] La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Japonesa 2002-197582.

[0036] La presente invención es descrita con mayor detalle en relación a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos de ensayo

(1) Experimentos con animales

[0037] Se utilizaron ratones machos de la cepa ddy (34-37 g, JAPAN SLC, Shizuoka, Japón) y ratones C57BL/6J obesos (ob/ob) (68-74 g, Shionogi Co., Ltd., Shiga, Japón). Se les alojó individualmente en un ambiente regulado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ de humedad, ciclo de 12:12 horas de luz:oscuridad, encendiendo la luz a las 7:00 AM). Los ratones recibieron una dieta estándar que contenía un 12%

de energía total como grasa o una dieta rica en grasa que contenía un 45% de energía total como grasa (CLEA Japan, INC., Tokyo, Japón). Podían disponer de alimento y agua *ad libitum*, salvo indicación en contrario. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de protección animal de la Universidad de Kobe.

(2) Fármacos de ensayo

[0038] Se compraron la [D-Lys-3]-GHRP-6, la [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P y la grelina de rata a BACHEM CALIFORNIA INC. (Torrance, California, EE.UU.), NEOSYSTEM (Strasbourg, Francia) y Peptide Institute (Osaka, Japón), respectivamente. Justo antes de la administración, se diluyó cada fármaco en 4 µl de líquido cefalorraquídeo artificial ("ACSF") para administración en el interior del tercer ventrículo cerebral (ICV), o en 100 µl de suero fisiológico para administración intraperitoneal (IP). Se expresan los resultados como valor medio $\pm$ s.e.m. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba t de Bonferroni, para valorar las diferencias entre grupos. Se consideró que una $P < 0,05$ era estadísticamente significativa.

(3) Administración ICV de los fármacos

[0039] Para la administración ICV, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (80-85 mg/kg IP) y colocados en un instrumento estereotáxico (SR-6, Narishige, Tokyo, Japón) siete días antes de los experimentos. Se practicó un agujero en cada cráneo utilizando una aguja insertada 0,9 mm lateral a la sutura central y 0,9 mm posterior al bregma. Se implantó una cánula de calibre 24 (Safelet-Cas, Nipro, Osaka, Japón) biselada en un extremo en una distancia de 3 mm en el tercer ventrículo cerebral para la administración ICV. Se fijó la cánula al cráneo con cemento dental y se tapó con silicio. Se unió una inserción para inyección de calibre 27 a una microjeringa mediante tubos PE-20.

(4) Pruebas de alimentación

[0040] Antes de las pruebas de alimentación, se privó a los ratones del alimento durante 16 horas, con libre acceso al agua, excepto durante un experimento sobre el efecto de la coadministración de [D-Lys-3]-GHRP-6 y grelina sobre la ingestión de alimento, donde se dio a los ratones libre acceso al alimento y al agua. Se midió la ingestión de alimento restando el alimento no comido del alimento inicialmente premedido a los 20 minutos, 1, 2 y 4 horas después de la administración.

(5) Aislamiento de ARN y análisis Northern blot

[0041] Se aisló el ARN del estómago y de la grasa epididimal usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japón). Se desnaturalizó el ARN total con formaldehído, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se depositó en mancha sobre una membrana Hybond N⁺. Se hibridaron las membranas con una sonda de ADNc marcada con fluoresceína. Se determinaron las densidades integradas totales de las señales de hibridación por densitometría (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia). Se normalizaron los datos con respecto a la abundancia de ARNm de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y se expresaron como porcentaje de los controles.

(6) Expresión del gen de la grelina

[0042] Se dio a ratones delgados una dieta estándar que contenía un 12% de energía total en forma de grasa o una dieta rica en grasas que contenía un 45% de energía total en forma de grasa durante dos semanas. Se dejó a los ratones en ayunas durante ocho horas antes de ser sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después de eso, se extrajeron los estómagos de los ratones, se congelaron sobre hielo seco y se guardaron a -80°C hasta la preparación de los Northern blots.

(7) Vaciado gástrico

[0043] Antes de los experimentos sobre el vaciado

gástrico, se privó a los ratones de alimento durante 16 horas con libre acceso al agua. Los ratones que habían estado en ayunas tuvieron libre acceso a pellas prepesadas durante una hora y se les administró luego [D-Lys-3]-
 5 GHRP-6. Se privó a los ratones de alimento de nuevo durante una o dos horas tras la administración. Se midió la ingestión de alimento pesando las pellas no comidas. Se sacrificó a los ratones por dislocación cervical dos o tres horas después del comienzo de los experimentos. In-
 10 mediatamente después de eso, se expuso el estómago por laparotomía, se ligó rápidamente tanto en el píloro como en el cardias, se extrajo luego y se pesó su contenido seco. Se calculó el vaciado gástrico según la siguiente fórmula:

15

$$\text{vaciado gástrico (\%)} = \{1 - (\text{peso seco de alimento recuperado del estómago} / \text{peso de alimento ingerido})\} \times 100$$

20 (8) Administración repetida

[0044] Se continuó con administraciones IP repetidas durante cinco días en ratones delgados bajo una dieta rica en grasas o una dieta estándar, y durante seis días en ratones obesos *db/db* bajo una dieta estándar, respectiva-
 25 mente. Se dio a los ratones la administración a las 7:00 AM y a las 19:00 PM. Se midieron diariamente la ingestión de alimento y el peso corporal. Se separó el suero de sangre obtenida del seno orbital bajo anestesia con éter al final del experimento (ocho horas tras la retirada del
 30 alimento y la administración IP final). Se sacrificó a los ratones por dislocación cervical. Inmediatamente después de eso, se extrajeron y pesaron la masa del cojinete graso epididimal, valorada como tejido adiposo blanco ("WAT") y el músculo gastrocnemio. Se midió la glucosa en
 35 sangre por el método de la glucosa oxidasa. Se midieron

la insulina y los ácidos grasos libres en suero ("FFA") por enzimoimmunoensayo y un método enzimático (EIKEN CHEMICAL CO., LTD., Tokyo, Japón), respectivamente. Se midieron los triglicéridos y el colesterol total en suero mediante un método enzimático (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japón).

Ejemplo 1: Los efectos de la administración repetida de grelina sobre el aumento del peso corporal y el control glicémico bajo una dieta rica en grasas

10 **[0045]** Como consecuencia de la administración IP de grelina dos veces al día durante cinco días (una dosis: 3 nmol/ratón), el aumento de peso corporal se incrementó significativamente, con un aumento concomitante en la ingestión diaria de energía (Figs. 2 y 3 y Tabla 1). La masa del cojinete graso aumentó significativamente en un 49% y un 125% en comparación con los ratones tratados con suero fisiológico que fueron alimentados con dieta estándar y dieta rica en grasas, respectivamente. El músculo esquelético no mostró ningún aumento de peso. Los niveles de colesterol e insulina en suero aumentaron también, junto con un moderado aumento en las concentraciones de glucosa en sangre. A continuación, se valoraron los niveles de ARNm de la leptina, la adiponectina y la resistina en WAT. Las administraciones repetidas de grelina aumentaron la expresión del ARNm de la leptina, y redujeron también la expresión del ARNm de la resistina en WAT (Fig. 4).

25 **[0046]** En siguiente lugar, se valoró la expresión del ARNm de la grelina bajo una dieta rica en grasas que contenía un 45% de energía total en forma de grasa. La dieta rica en grasas durante dos semanas aumentó significativamente la expresión del gen de la grelina en el estómago de ratones privados de alimento en comparación con la dieta estándar (Fig. 5).

Tabla 1. Efectos de la grelina administrada intraperitonealmente (3 mmol/ratón cada 12 horas durante 5 días) sobre la ingestión de calorías, la masa de grasa epididimal, el músculo gastrocnemio y las concentraciones de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en sangre en ratones delgados bajo una dieta rica en grasas.

	LF, Suero fisiológico	HF, Suero fisiológico	HF, Grelina
Ingestión de calorías (kcal/día)	18,83 ± 1,055	23,22 ± 1,329	25,94 ± 2,562*
Masa del cojín graso (g)	0,533 ± 0,049	0,797 ± 0,095	1,202 ± 0,175** [#]
Músculo esquelético (g)	0,337 ± 0,016	0,353 ± 0,010	0,340 ± 0,005
Glucosa (mg/dl)	142,3 ± 8,578	151,2 ± 14,86	160,5 ± 8,977
Insulina (ng/ml)	0,900 ± 0,134	1,183 ± 0,087	2,520 ± 0,945*
Colesterol (mg/dl)	144,7 ± 13,03	215,3 ± 19,22*	224,8 ± 19,69**
Triglicéridos (mg/dl)	30,67 ± 2,860	27,00 ± 3,454	32,80 ± 7,965
Ácidos grasos libres (meq./l)	1,467 ± 0,050	1,623 ± 0,100	1,636 ± 0,047

Notas: En la tabla, se expresan los resultados como media ± s.e.m. LF y HF indican la dieta estándar y la dieta rica en grasas, respectivamente.

* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ representan cada una la diferencia significativa entre los ratones tratados con el suero fisiológico alimentados con la dieta estándar y los

ratones tratados con grelina alimentados con la dieta rica en grasa.

$P < 0,05$ representa la diferencia significativa entre los ratones tratados con suero fisiológico alimentados con la dieta rica en grasa y los ratones tratados con grelina alimentados con la dieta rica en grasa.

Ejemplo 2: La influencia de los antagonistas GHS-R sobre el equilibrio energético

[0047] Se administró el antagonista GHS-R [D-Lys-3]-GHRP-6 IP a ratones privados de alimento. Como muestra la Fig. 6, [D-Lys-3]-GHRP-6 redujo significativamente la ingestión de alimento de un modo dosis-dependiente.

[0048] Los presentes inventores investigaron también si el [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado centralmente tendría efectos similares. El [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado tanto ICV como IP produjo una potente disminución en el comportamiento de alimentación (Fig. 7).

[0049] Con objeto de evaluar la posibilidad de que la grelina actuara a través de GHS-R en el cerebro, los inventores examinaron los efectos de la administración simultánea de grelina y [D-Lys-3]-GHRP-6 sobre la ingestión de alimento. El [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado ICV abolió los efectos estimulantes sobre la alimentación inducidos por la administración IP de grelina (Fig. 8).

[0050] A continuación, los inventores examinaron el efecto de la administración IP de [D-Lys-3]-GHRP-6 sobre la velocidad de vaciado gástrico. El [D-Lys-3]-GHRP-6 periféricamente administrado produjo una reducción significativa en la velocidad de vaciado gástrico una hora después de la administración (Fig. 9).

[0051] Los inventores examinaron también el efecto del otro antagonista GHS-R, [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P (L-756.867), sobre la alimentación en ratones privados de alimento. Como el [D-Lys-3]-GHRP-

6, la [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P periféricamente administrada redujo significativamente la ingestión de alimento de un modo dosis-dependiente (Fig. 10).

5 **[0052]** Dado que la administración repetida de vehículo comprometía en gran medida el aumento de peso corporal inducido por la dieta rica en grasas (Fig. 2), los presentes inventores examinaron la acción aguda de [D-Lys-3]-GHRP-6 en ratones con obesidad inducida por la dieta. Con la administración IP de [D-Lys-3]-GHRP-6, la ingestión de alimento disminuyó potentemente, con la resultante reducción del aumento de peso corporal (Fig. 11).

10 **[0053]** Para comprender mejor el potencial terapéutico de los antagonistas GHS-R, los presentes inventores examinaron si el [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado IP produciría una acción anorexígena en ratones *ob/ob*. El [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado redujo significativamente la ingestión de alimento en ratones *ob/ob*, así como en ratones delgados (Fig. 12).

20 **[0054]** Finalmente, los inventores examinaron los efectos de administraciones repetidas de [D-Lys-3]-GHRP-6 sobre el aumento de peso corporal y el control glicémico en ratones *ob/ob*. Las administraciones repetidas de [D-Lys-3]-GHRP-6 redujeron significativamente el aumento de peso corporal y las concentraciones de glucosa en sangre sin reducir el peso muscular (Fig. 13 y Tabla 2). Más aún, el tratamiento con [D-Lys-3]-GHRP-6 redujo significativamente los niveles de FFA en ratones *ob/ob* en un 24% en comparación con los ratones *ob/ob* tratados con suero fisiológico (Fig. 14).

30

Tabla 2. Efectos de [D-Lys-3]-GHRP-6 administrado intra-peritonealmente (20-200 nmol/ratón cada 12 horas durante 6 días) sobre la ingestión de alimento, la masa de grasa epididimal, el músculo gastrocnemio y las concentraciones en sangre de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en ratones obesos *ob/ob*.

	Suero fisiológico	20 nmol	200 nmol
Ingestión de alimento (g/día)	4,845 ± 0,160	4,527 ± 0,261	4,285 ± 0,298
Masa del co-jinete graso (g)	0,974 ± 0,066	0,897 ± 0,169	0,860 ± 0,086
Músculo esquelético (g)	0,300 ± 0,012	0,314 ± 0,009	0,326 ± 0,013
Glucosa (mg/dl)	234,4 ± 27,71	217,3 ± 27,90	134,9 ± 19,47*
Insulina (ng/ml)	55,29 ± 11,17	41,61 ± 10,85	36,54 ± 8,695
Colesterol (mg/dl)	257,1 ± 13,38	219,0 ± 11,24	228,4 ± 21,84
Triglicéridos (mg/dl)	45,86 ± 4,378	38,57 ± 3,551	41,14 ± 5,990
Ácidos grasos libres (meq./l)	2,164 ± 0,075	2,036 ± 0,121	1,646 ± 0,078**

Nota: * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ representan cada una la diferencia significativa entre los controles tratados con suero fisiológico.

Lista de secuencias

[0055]

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120> Agentes terapéuticos para la diabetes mellitus

5 <130> 021019

<160> 4

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Val	Gln	Gln	Arg	Lys
1				5					10					15	
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg				
			20					25							

<210> 2

15 <211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe	Val	Pro	Ile	Phe	Thr	Tyr	Gly	Glu	Leu	Gln	Arg	Met	Gln	Glu	Lys
1				5					10					15	
Glu	Arg	Asn	Lys	Gly	Gln										
			20												

20

<210> 3

<211> 366

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 3

```

Met Trp Asn Ala Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Phe Asn Leu Thr Leu
 1      5      10      15
Ala Asp Leu Asp Trp Asp Ala Ser Pro Gly Asn Asp Ser Leu Gly Asp
      20      25      30
Glu Leu Leu Gln Leu Phe Pro Ala Pro Leu Leu Ala Gly Val Thr Ala
      35      40      45
Thr Cys Val Ala Leu Phe Val Val Gly Ile Ala Gly Asn Leu Leu Thr
      50      55      60
Met Leu Val Val Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Thr Thr Thr Asn Leu
65      70      75      80
Tyr Leu Ser Ser Met Ala Phe Ser Asp Leu Leu Ile Phe Leu Cys Met
      85      90      95
Pro Leu Asp Leu Val Arg Leu Trp Gln Tyr Arg Pro Trp Asn Phe Gly
      100      105      110
Asp Leu Leu Cys Lys Leu Phe Gln Phe Val Ser Glu Ser Cys Thr Tyr
      115      120      125
Ala Thr Val Leu Thr Ile Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Phe Ala
      130      135      140
Ile Cys Phe Pro Leu Arg Ala Lys Val Val Val Thr Lys Gly Arg Val
145      150      155      160
Lys Leu Val Ile Phe Val Ile Trp Ala Val Ala Phe Cys Ser Ala Gly
      165      170      175
Pro Ile Phe Val Leu Val Gly Val Glu His Glu Asn Gly Thr Asp Pro
      180      185      190
Trp Asp Thr Asn Glu Cys Arg Pro Thr Glu Phe Ala Val Arg Ser Gly
      195      200      205
Leu Leu Thr Val Met Val Trp Val Ser Ser Ile Phe Phe Phe Leu Pro
210      215      220
Val Phe Cys Leu Thr Val Leu Tyr Ser Leu Ile Gly Arg Lys Leu Trp

```

```

225      230      235      240
Arg Arg Arg Arg Gly Asp Ala Val Val Gly Ala Ser Leu Arg Asp Gln
      245      250      255
Asn His Lys Gln Thr Val Lys Met Leu Ala Val Val Val Phe Ala Phe
      260      265      270
Ile Leu Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Tyr Leu Phe Ser Lys
      275      280      285
Ser Phe Glu Pro Gly Ser Leu Glu Ile Ala Gln Ile Ser Gln Tyr Cys
      290      295      300
Asn Leu Val Ser Phe Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ala Ile Asn Pro
305      310      315      320
Ile Leu Tyr Asn Ile Met Ser Lys Lys Tyr Arg Val Ala Val Phe Arg
      325      330      335
Leu Leu Gly Phe Glu Pro Phe Ser Gln Arg Lys Leu Ser Thr Leu Lys
      340      345      350
Asp Glu Ser Ser Arg Ala Trp Thr Glu Ser Ser Ile Asn Thr
      355      360      365

```

<210> 4

5 <211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Gly Ser Pro Trp Asn Gly Ser Asp Gly Pro Glu Gly Ala Arg Glu
 1           5           10           15
Pro Pro Trp Pro Ala Leu Pro Pro Cys Asp Glu Arg Arg Cys Ser Pro
          20           25           30
Phe Pro Leu Gly Ala Leu Val Pro Val Thr Ala Val Cys Leu Cys Leu
          35           40           45
Phe Val Val Gly Val Ser Gly Asn Val Val Thr Val Met Leu Ile Gly
          50           55           60
Arg Tyr Arg Asp Met Arg Thr Thr Thr Asn Leu Tyr Leu Gly Ser Met
          65           70           75           80
Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Leu Pro Phe Asp Leu Tyr
          85           90           95
Arg Leu Trp Arg Ser Arg Pro Trp Val Phe Gly Pro Leu Leu Cys Arg
          100          105          110
Leu Ser Leu Tyr Val Gly Glu Gly Cys Thr Tyr Ala Thr Leu Leu His
          115          120          125
Met Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu
          130          135          140
Arg Ala Arg Val Leu Val Thr Arg Arg Arg Val Cys Ala Leu Ile Ala
          145          150          155          160
Val Leu Trp Ala Val Ala Leu Leu Ser Ala Gly Pro Phe Leu Phe Leu
          165          170          175
Val Gly Val Glu Gln Asp Pro Gly Ile Ser Val Val Pro Gly Leu Asn
          180          185          190
Gly Thr Ala Arg Ile Ala Ser Ser Pro Leu Ala Ser Ser Pro Pro Leu
          195          200          205
Trp Leu Ser Arg Ala Pro Pro Pro Ser Pro Pro Ser Gly Pro Glu Thr
          210          215          220
Ala Glu Ala Ala Ala Leu Phe Ser Arg Glu Cys Arg Pro Ser Pro Ala
          225          230          235          240
Gln Leu Gly Ala Leu Arg Val Met Leu Trp Val Thr Thr Ala Tyr Phe
          245          250          255
Phe Leu Pro Phe Leu Cys Leu Ser Ile Leu Tyr Gly Leu Ile Gly Arg
          260          265          270
Glu Leu Trp Ser Ser Arg Arg Pro Leu Arg Gly Pro Ala Ala Ser Gly
          275          280          285
Arg Glu Arg Gly His Arg Gln Thr Val Arg Val Leu Leu Val Val Val
          290          295          300

```

Leu	Ala	Phe	Ile	Ile	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	His	Val	Gly	Arg	Ile	Ile
305					310					315					320
Tyr	Ile	Asn	Thr	Glu	Asp	Ser	Arg	Met	Met	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Phe
				325					330					335	
Asn	Ile	Val	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ser	Ile	Asn	Pro
			340					345					350		
Ile	Leu	Tyr	Asn	Leu	Ile	Ser	Lys	Lys	Tyr	Arg	Ala	Ala	Ala	Phe	Lys
		355					360					365			
Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Lys	Ser	Arg	Pro	Arg	Gly	Phe	His	Arg	Ser	Arg
	370					375					380				
Asp	Thr	Ala	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly	Asp	Thr	Val	Gly
385					390					395				400	
Tyr	Thr	Glu	Thr	Ser	Ala	Asn	Val	Lys	Thr	Met	Gly				
				405					410						

REIVINDICACIONES

. Un antagonista de los receptores del secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R) para uso en la reducción del nivel de glucosa en sangre.

5 **2.** El antagonista GHS-R según la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo consistente en un antagonista de los análogos de grelina, [D-Lys-3]-GHRP-6 y [D-Arg-1, D-Phe-5, D-Trp-7, 9, Leu-11]substancia P.

10 **3.** El antagonista GHS-R según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, formulado para ser administrado central o periféricamente.

Fig.1

A

Grelina	Ghrelin	1:--GSSFLSPEHQRVQQRKESKPPAKLQPR	28
Motilina	Motilin	1:FV-PIFTYGELQRMQE-KERNKGQ-----	22
		* * * * *	

B

Receptor de grelina (GHSR)	1:MMNATPSEEPGNLTADLDWDASPGNDLGDLLQLFPAPLAGVTATCVALFWGIAGNLLTMLVVSFRFELRTTTNLYLSSMAFSDDLIFLCMPDL	100
Receptor de motilina	1:M--GSPWNGSDGPEGAREPPWALP--PC-DERRCSPFLGALVPVTAVCLCLFVVGVSNGVVTMLIGRYRDMRTTTNLYLGSMAVSDLLILLGLPFDL	95
	* * * * *	
Receptor de grelina (GHSR)	101:VRLWQYRPNFNGDLLCKLFQVSESCYATVLTITALSVERYFAICFPLRAKVVTKGRVKLVIFVWAVAFCSAGPIFVLVGVHE-----	190
Receptor de motilina	96:YRLWRSRPWFVGPILLCLSLYVGEGETYATLLHMTALSVERYLAICRPLRARLVTRRRVCALIAVLWAVALLSAGPFLVLGVGEQDPGISVWPGLNGTA	195
	* * * * *	
Receptor de grelina (GHSR)	191:-----D-P-W-D-T-NEC--R-P-T-E----FA--VR-S-G-L--LTVMWVSSIFFFLPVFCLTVLYSLIGRKLWRRRRGDVVGASLRDQNHKQ	260
Receptor de motilina	196:RIASSPLASSPPLWLSRAPPPSPSGPETAEAAALFSRECRPSPAQLGALRVMLWTTAYFFLPFLCLSLILYGLIGRELWSSRRPLRGPAASGRERGRHQ	295
	* * * * *	
Receptor de grelina (GHSR)	261:TVKMLAVVWFATILCWLPHVGRYLFKSKFEPGSLIAQISQYCNLVSVLYLSAAINPILYNIMSKKYRVAVFRLLGFEFPSQKRLSTLKDESSRAWT	360
Receptor de motilina	296:TVRVLLVWVLAFFIICWLPHVGRITTYNT-EDSRM-MY-FYQYFNIVALQLFYLASINPILYNLISKKYRAAAFKLLARKSRPRGFHRSRDTAGEVAG	392
	* * * * *	
Receptor de grelina (GHSR)	361:ESSINT-----	366
Receptor de motilina	393:DTGGDTVGYTETSANVKTMG	412

Fig.2

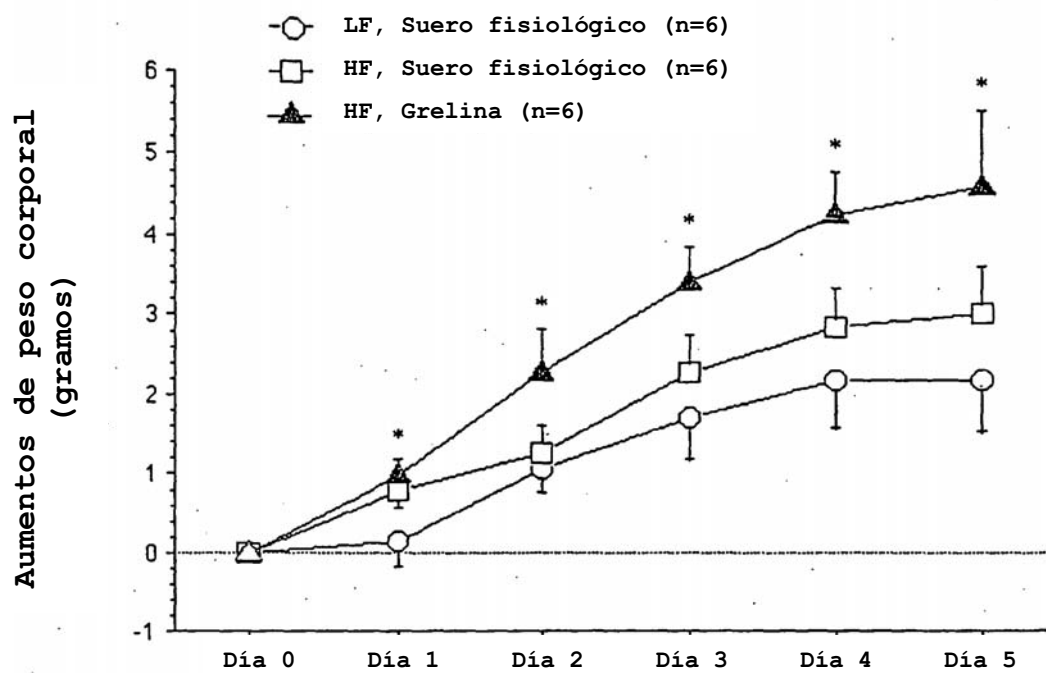


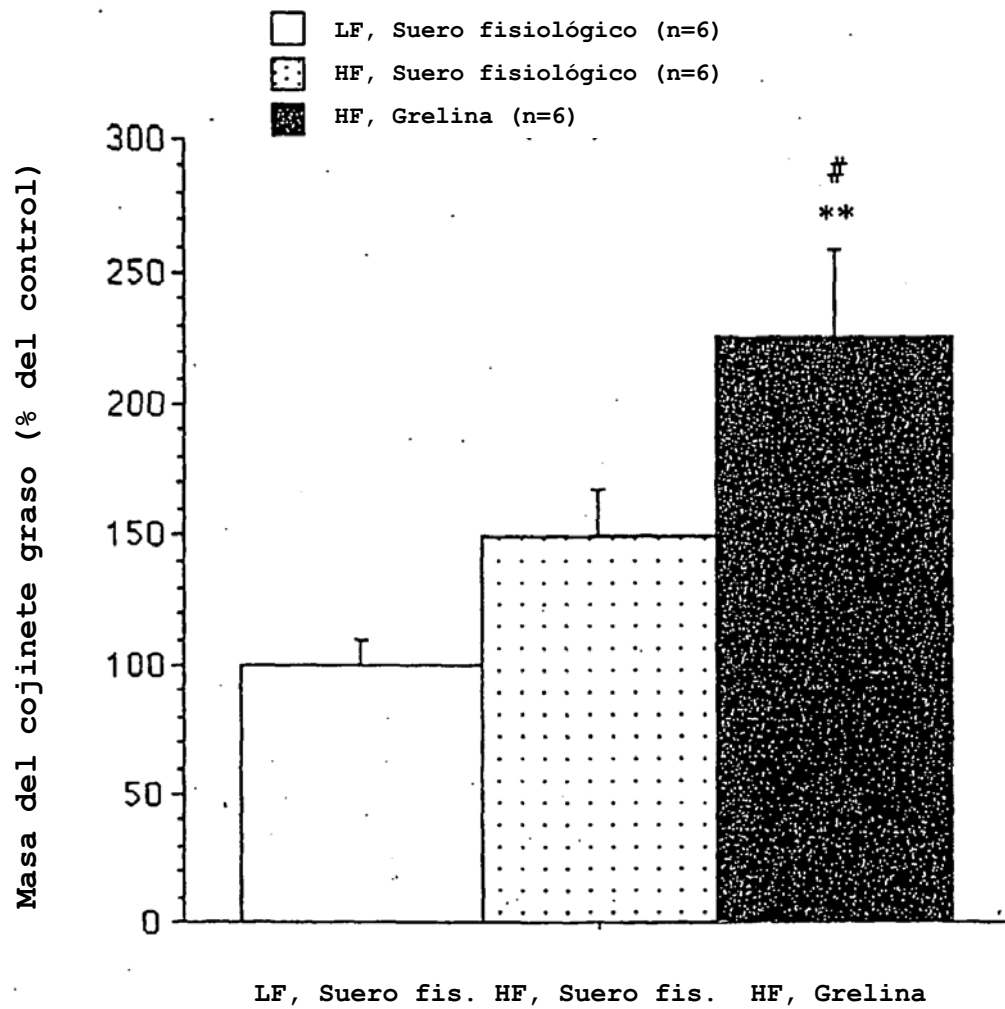
Fig.3

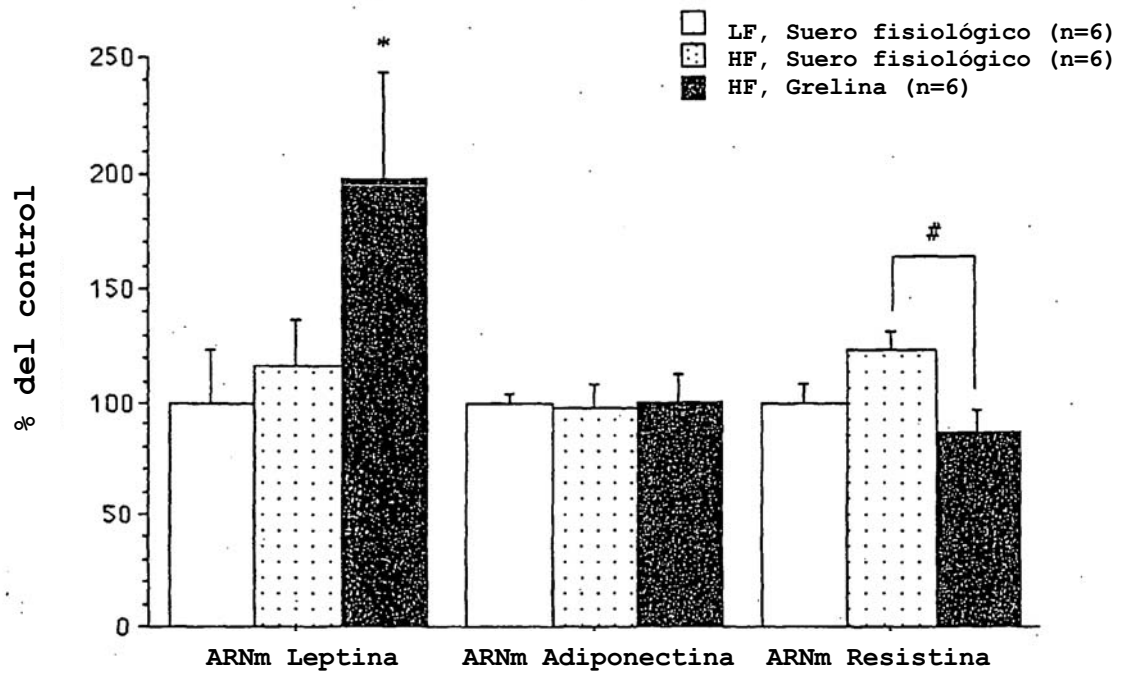
Fig.4

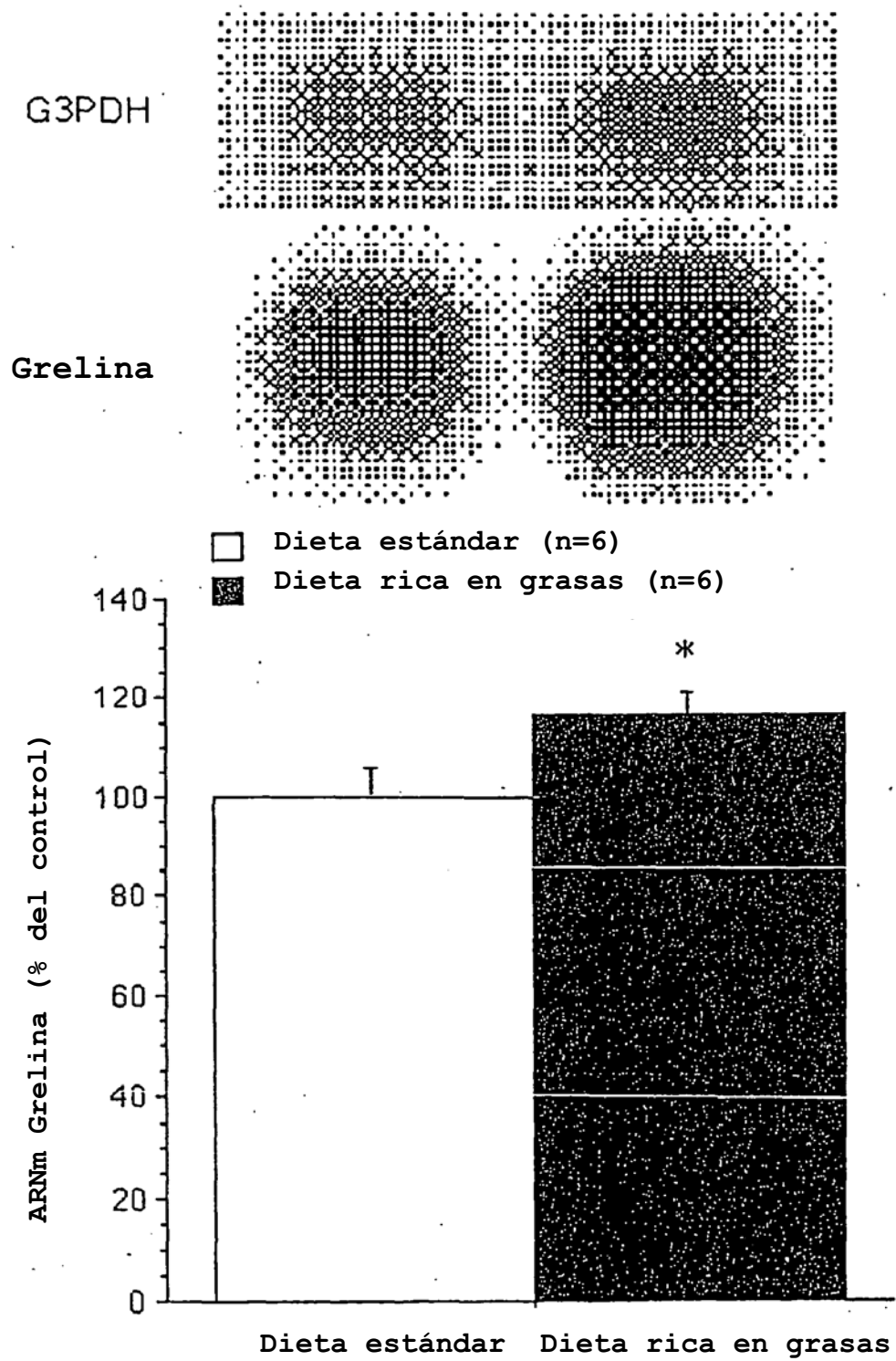
Fig.5

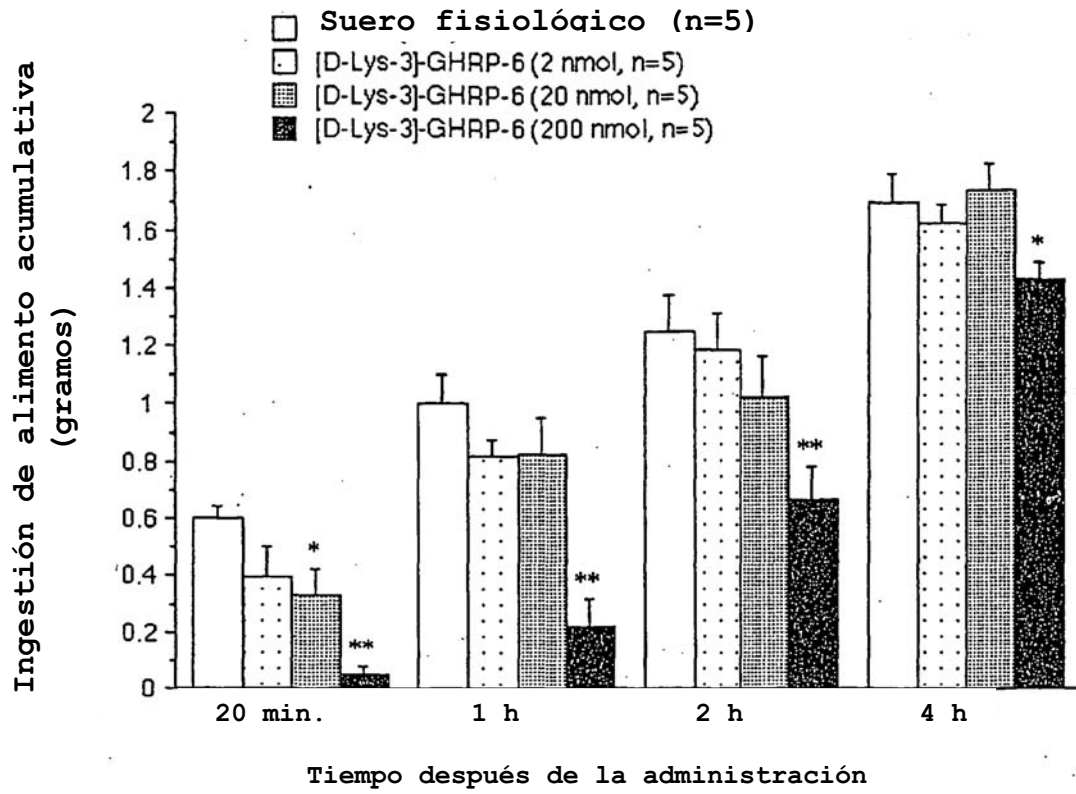
Fig.6

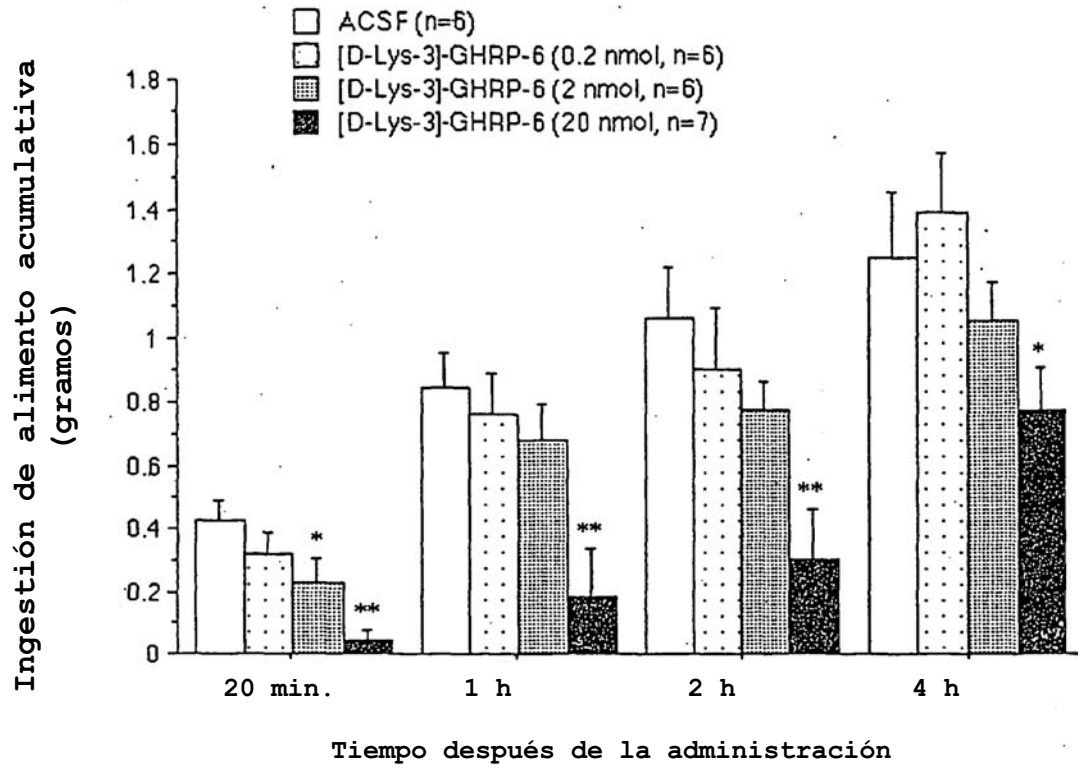
Fig.7

Fig.8

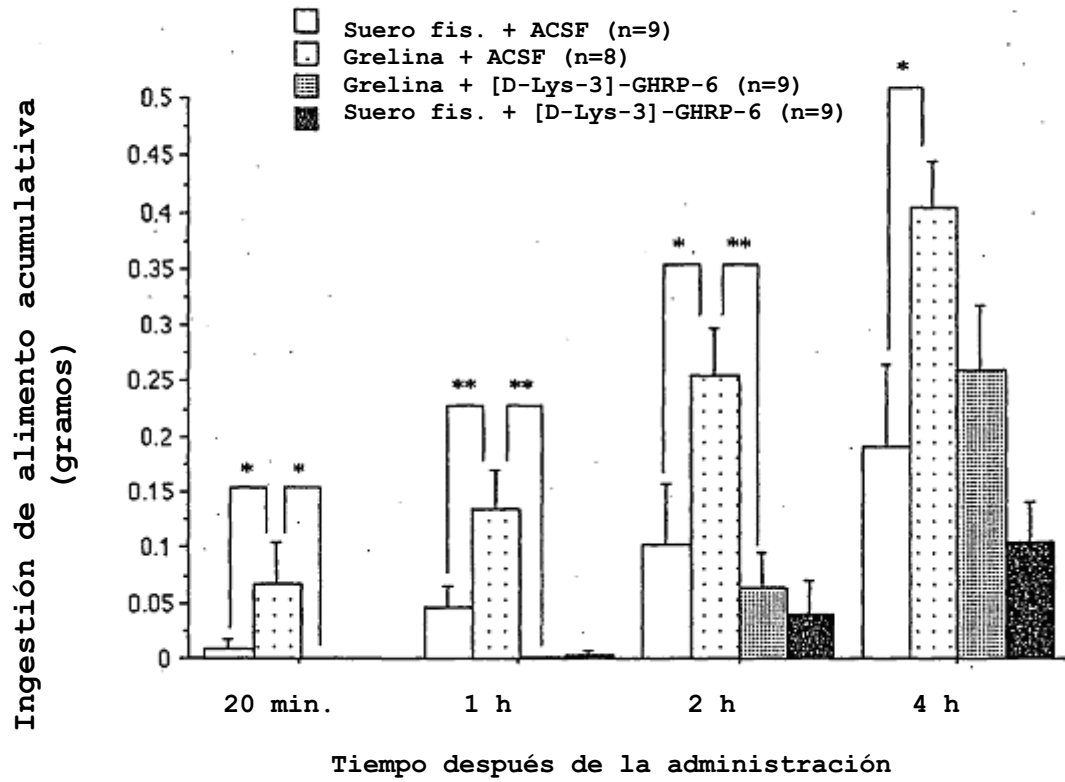


Fig.9

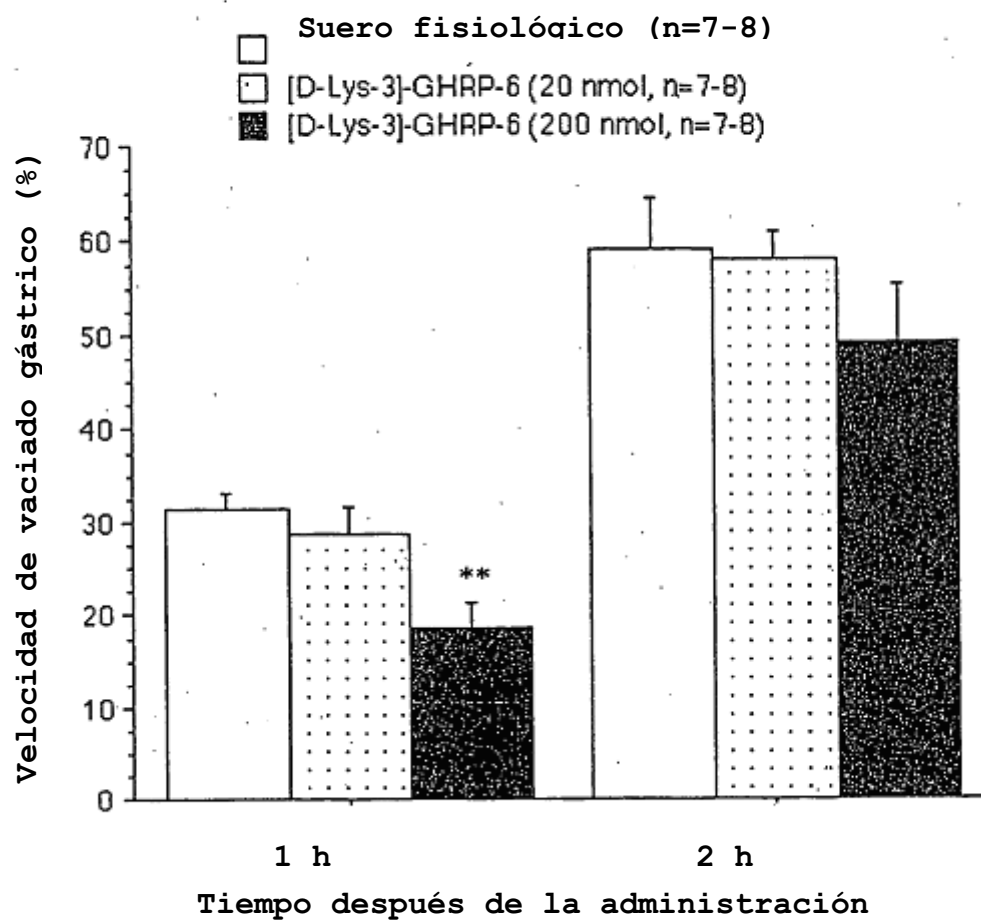


Fig.10

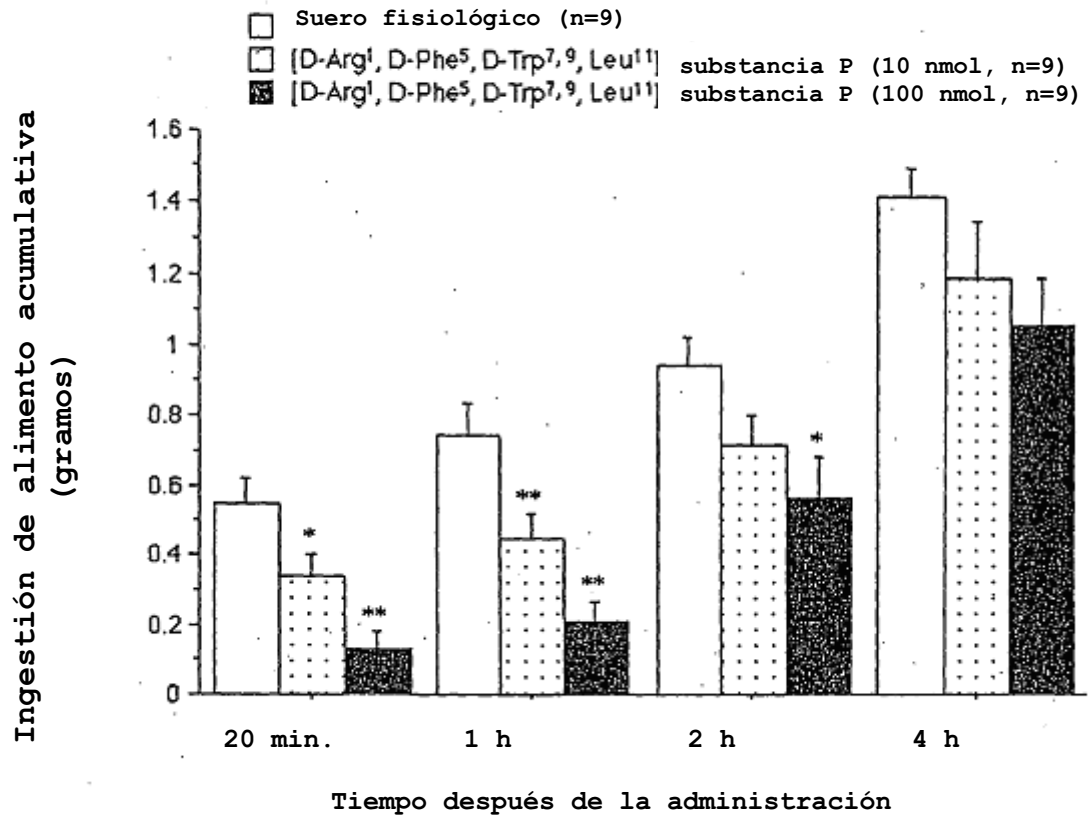


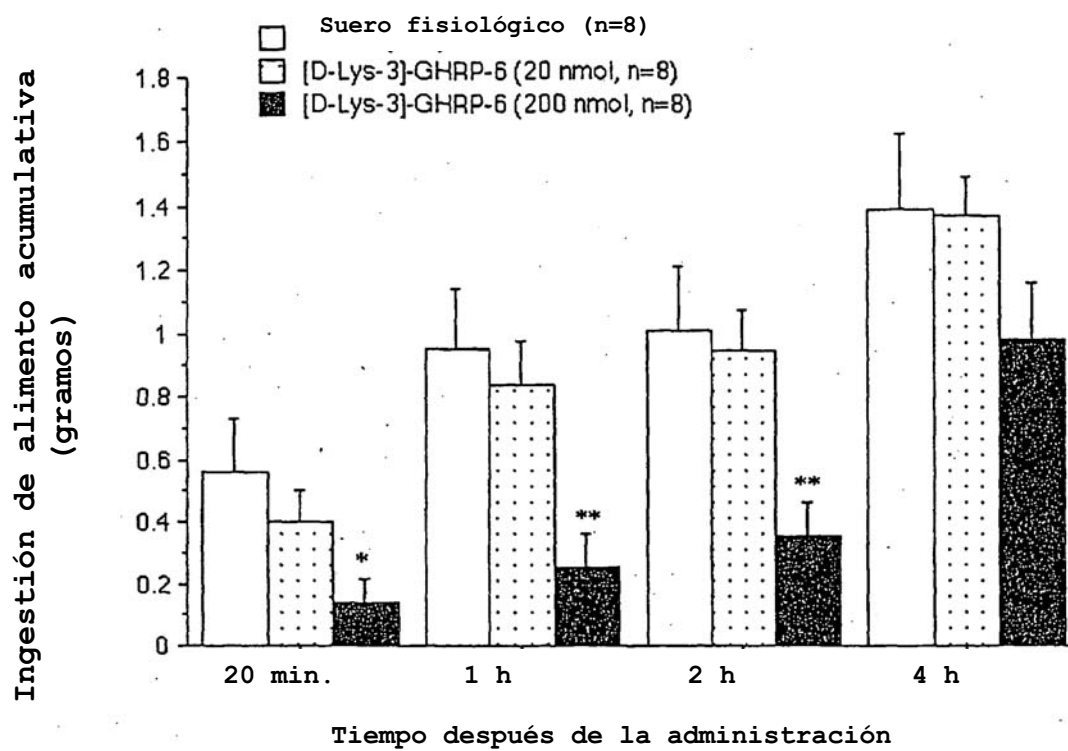
Fig.11

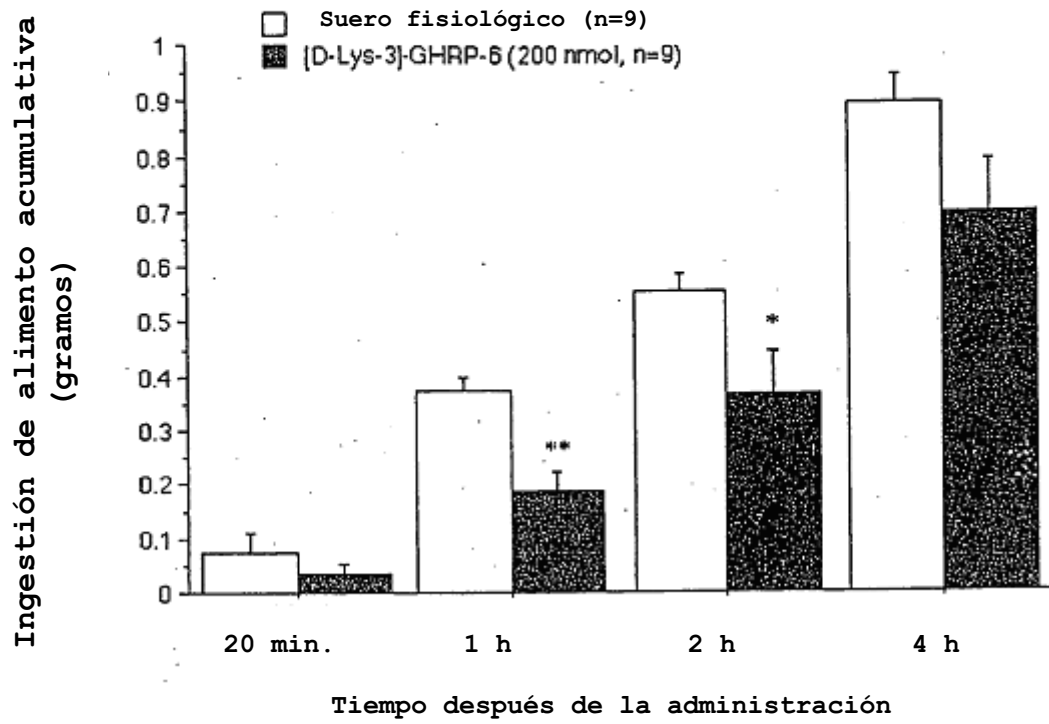
Fig.12

Fig.13

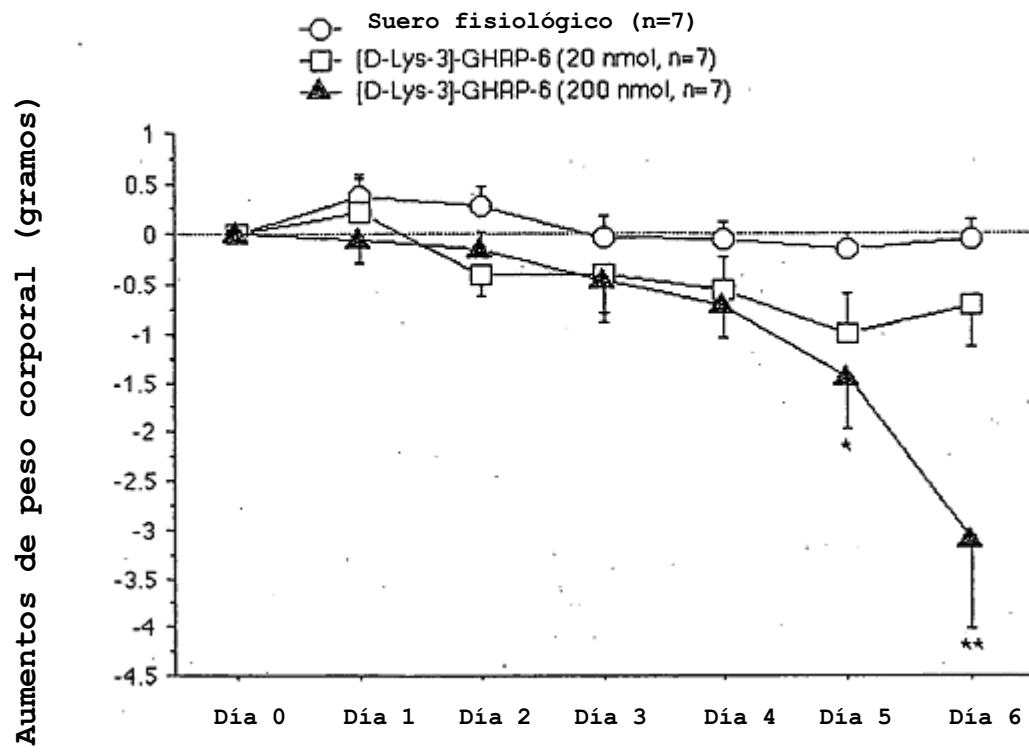


Fig.14