

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 469**

51 Int. Cl.:

A61K 36/899 (2006.01)

A61K 36/33 (2006.01)

A61P 5/24 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015** **PCT/IB2015/051621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015** **WO15132755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015** **E 15711875 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras limitación: **15.07.2020** **EP 3113784**

54 Título: **Composiciones basadas en extractos de plantas para la inhibición de la 5-alfa reductasa**

30 Prioridad:

06.03.2014 IT MI20140351

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente limitada:

17.03.2021

73 Titular/es:

BIONAP S.R.L. (100.0%)
Contrada Fureria Zona Industriale Ovest
95032 Belpasso (CT), IT

72 Inventor/es:

BONINA, ANDREA FILIPPO y
BONINA, CLAUDIA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Composiciones basadas en extractos de plantas para la inhibición de la 5-alfa reductasa

5 La presente invención se refiere a composiciones nutraceuticas, cosméticas o farmacéuticas basadas en una combinación de extractos de plantas de flores o frutos de *Opuntia ficus indica* y *Oryza sativa* (arroz Negro) para la inhibición de la 5-alfa reductasa. En particular, las preparaciones según la invención son útiles en la prevención o tratamiento de hipertrofia o hiperplasia prostática benigna y de alopecia androgénica.

10 La testosterona es una hormona androgénica sintetizada por las células de Leydig de los testículos controlada por el hipotálamo y por la glándula pituitaria anterior (1). La testosterona dentro de las células, recogida por el sistema vascular, se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5- α -reductasa. Así, la DHT producida es capaz de unirse a receptores androgénicos y actuar sobre la transcripción y expresión de genes nucleares específicos. La DHT producida actúa sobre la diferenciación y crecimiento del tejido prostático, sobre el crecimiento de los genitales masculinos, sobre el crecimiento puberal de pelo en la cara y en el cuerpo y está implicado en varias enfermedades como el acné, el hirsutismo, la hiperplasia benigna de próstata (BPH) alopecia androgénica (AGA), cáncer de

15 próstata (1). La hipertrofia benigna de próstata (BPH) y la alopecia androgénica (AGA) son enfermedades dependientes de andrógenos, en las que la transformación de la testosterona en DHT por la 5- α -reductasa juega un papel clave (2). En la próstata, la DHT se produce por la acción de la 5- α -reductasa en sus dos isoformas (tipo 1 y 2) y está implicada en el crecimiento del tejido prostático. En el cuero cabelludo, la DHT es producida principalmente por la 5- α -reductasa del tipo 2 y es responsable de la miniaturización del bulbo piloso (2).

20 La hipertrofia benigna de próstata (BPH) es una afección patológica asociada con el envejecimiento que afecta hasta el 20% de hombres de 40 años, que también puede alcanzar el 80% en hombres de 70 años (3). Comparada con una baja mortalidad (0,35/100.000 personas), la hipertrofia benigna de próstata es una enfermedad que evoluciona potencialmente que implica varios síntomas del tracto urinario inferior (LUTS) y que, con el progreso de la enfermedad, puede afectar negativamente la calidad de vida de los sujetos varones (4).

25 Los síntomas más comunes asociados con la BPH se dividen en los tipos de síntomas obstructivos, mecánicos y dinámicos, e irritativos (5,6). Los síntomas obstructivos mecánicos están determinados por el crecimiento excesivo de tejidos epiteliales en la zona de transición de la próstata, mientras que los dinámicos derivan del aumento del tono del músculo liso del cuello de la vejiga, de la próstata y su cápsula. Entre los síntomas obstructivos están: dificultad para comenzar a orinar, flujo de orina intermitente, vaciado incompleto de la vejiga, reducción del flujo urinario y esfuerzo para orinar. Los síntomas definidos como de origen irritativo son nicturia, urgencia de orinar, polaquiuria (frecuencia urinaria), incontinencia y ardor/dolor al orinar (3,7). El cuestionario conocido como Escala Internacional de Síntomas Prostáticos (IPSS, por sus siglas en inglés) hoy en día se utiliza para la evaluación de tales síntomas y por lo tanto de la gravedad de la enfermedad.

35 Si no se trata adecuadamente, la hipertrofia benigna de próstata se puede desarrollar a lo largo del tiempo, dando lugar a consecuencias más graves para la salud del paciente. La retención urinaria puede determinar el desarrollo de prostatitis, debido al crecimiento de bacterias en el residuo vesical, y cálculos renales debido a la formación de sales en el residuo post-micción. Además, el vaciado incompleto de la vejiga y la retención urinaria crónica pueden comprometer significativamente la función renal con la consiguiente aparición de formas de uropatía obstructiva.

40 Todavía hoy en día, no se conocen completamente las causas de la BPH. Sin embargo, es posible suponer que con el envejecimiento tal enfermedad se correlaciona con una modificación del estado hormonal, en particular con el aumento de los niveles de dihidrotestosterona (DHT), en el sujeto varón. La DHT es de hecho un derivado de testosterona implicado en el crecimiento de los tejidos prostáticos, cuya acumulación puede así generar una condición de hipertrofia tisular (8). Todavía es objeto de estudio cual es la causa que genera tal aumento en la producción de DHT. Sin embargo, la evidencia científica ilustra cómo la inhibición de la 5- α -reductasa, que es la enzima responsable de la conversión de testosterona en DHT, es capaz de ejercer un efecto y controlar tal enfermedad (8). La terapia farmacológica en el tratamiento de la hipertrofia benigna de próstata se basa en dos

45 clases posibles de compuestos: los α -bloqueantes y los inhibidores de la 5 α -reductasa (8,9,10). Los α -bloqueantes (antagonistas de los receptores α 1-adrenérgicos) ejercen su efecto relajando los músculos lisos de arterias, de la próstata y del cuello de la vejiga, para reducir la obstrucción urinaria y promover el aumento de la velocidad del flujo urinario. Entre los α -bloqueantes más comunes se encuentran: doxazosina, terazosina, alfuzosina, silodosina y tamsulosina. Tales medicamentos se utilizan en el tratamiento de la sintomatología de la hipertrofia benigna de próstata, pero no muestran ninguna acción sobre el desarrollo de la enfermedad. Un uso prolongado de α -bloqueantes puede inducir varios efectos secundarios tales como mareos, dolor de cabeza, malestar, cansancio y dificultad para respirar. Otros efectos, menos frecuentes observados, son hipotensión ortostática y eyaculación retrógrada.

55 Los inhibidores de la 5 α -reductasa ejercen su efecto bloqueando la síntesis y la producción de la enzima y por lo tanto la conversión de testosterona en DHT. Tales compuestos (tales como finasterida y dutasterida) son capaces de inducir la reducción del volumen de la glándula prostática hipertrófica y prevenir la progresión en el crecimiento, ya

que tales terapias están indicadas en el tratamiento de la BPH leve y grave (volumen prostático >40 ml) (9). También en este caso, se observan varios efectos secundarios tales como disminución de la libido, ginecomastia, eyaculación retrógrada (eyaculación anormal).

- 5 Otros tratamientos farmacológicos se refieren a sustancias con acción antimuscarínica (anticolinérgica) y a los inhibidores de la 5-fosfodiesterasa, pero su uso está restringido debido a su baja eficacia y numerosos efectos secundarios (9).

10 Sólo en los casos de fracaso absoluto de la terapia farmacológica (incluso combinada), es posible recurrir al tratamiento quirúrgico. Sin embargo, tales tratamientos exponen a los pacientes a altos niveles de riesgo postquirúrgico en relación con la funcionalidad normal y la mecánica eyaculatoria. Incluso las técnicas menos invasivas más recientes, como la ablación transuretral con aguja (TUNA) o la prostatectomía con láser (TURP), presentan algunas limitaciones y están en experimentación (11,12).

15 La alopecia androgénica o calvicie (AGA) es una condición dermatológica que afecta tanto a hombres como mujeres. En el caso de los hombres, se ven afectados por esta condición hasta el 30% de más de 30 años de edad y hasta el 50% de más de 50 años de edad. El AGA puede afectar con menor incidencia incluso a mujeres, aunque con signos clínicos leves en general, tales como el adelgazamiento difuso del pelo en toda la parte superior del cuero cabelludo (13). Las causas primarias de alopecia androgénica no se conocen completamente y varios factores pueden ejercer su efecto en esta condición, tales como la edad y la predisposición genética. Además, existe cierta correlación entre la aparición de alopecia y la actividad androgénica en el individuo, en particular, la producción de DHT por parte de la enzima 5- α -reductasa. De hecho, la DHT presente en los folículos pilosos es capaz de unirse a los receptores androgénicos e inducir, en el ciclo de vida del pelo, una reducción en la duración de la fase anagénica y una extensión de la fase de reposo. Como consecuencia, el pelo sufrirá una disminución de su longitud y de su diámetro (miniaturización). Después de la fase telagénica y la pérdida del pelo, se observará un retraso en la restauración de la fase de crecimiento y el folículo, como resultado, permanecerá vacío durante un período de tiempo más largo. Esto implicará una reducción de la densidad del cabello y un adelgazamiento evidente en la zona afectada del cuero cabelludo. La recurrencia de esta condición (miniaturización) en los diversos ciclos de vida, conducirá a la muerte final del bulbo y a la pérdida irreversible del cabello (13).

30 El Minoxidil, administrado por vía tópica o sistémica, constituye uno de los tratamientos más comunes de alopecia androgénica. El Minoxidil, originalmente utilizado como vasodilatador en el tratamiento de hipertensión, parece ser capaz de actuar directamente sobre la proliferación y diferenciación de queratinocitos foliculares, lo que induce una extensión de la fase anagénica. A menudo se utiliza en combinación con otras sustancias activas, sin embargo el efecto de Minoxidil tiene una duración limitada después de suspender la terapia. Por otro lado, el uso prolongado de este medicamento parece aumentar considerablemente el riesgo de efectos secundarios no deseados tales como irritación, erupción cutánea, picazón también en forma grave.

35 También se utilizan los inhibidores selectivos de la 5- α -reductasa, por ejemplo finasterida, en las terapias sistémicas de AGA. Sin embargo, estas terapias presentan algunas desventajas, tales como: necesidad de períodos largos de tratamiento (al menos un año), altas dosis y, por lo tanto, su alto coste, los efectos secundarios asociados con esta clase de medicamentos (ginecomastia, disfunciones sexuales, etc.) (13).

40 Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos alternativos de hipertrofia benigna de próstata, más que de alopecia androgénica, que no presenten los efectos secundarios graves notificados en el estado de la técnica.

45 Los autores de la presente invención han encontrado ahora que el uso combinado de extractos de plantas de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y de *Oryza sativa* (arroz Negro) implica una acción antiproliferativa de tipo sinérgico sobre líneas celulares de hipertrofia benigna de próstata. Del mismo modo, esta combinación de extractos de plantas muestra una acción proliferativa de tipo sinérgico sobre líneas celulares inmortalizadas de papilas dérmicas foliculares (utilizadas en la bibliografía para estudiar el efecto sobre la alopecia androgénica). La combinación de los dos extractos de plantas no mostró ninguna citotoxicidad sobre líneas celulares normales, es decir, líneas celulares de fibroblastos, como resultado de los ensayos del azul Trypan (datos no mostrados).

50 *Opuntia Ficus Indica* (Nopal) es una planta perteneciente a la familia de Cactaceae nativa de México y del suroeste de los Estados Unidos, pero también común entre las plantas naturales alrededor de la cuenca mediterránea. Además, en medicina popular, las diversas partes de la planta tienen utilidad en numerosas aplicaciones: los frutos se consideran astringentes y debido a su riqueza en vitamina C han sido utilizados en el pasado por marineros para la prevención del escorbuto; los cladodios jóvenes, calentados en el horno, se utilizan como emolientes, aplicados en forma de cataplasma; la aplicación directa de la pulpa de cladodios sobre heridas y llagas constituye un excelente remedio antiinflamatorio, reparador y cicatrizante en heridas cutáneas y úlceras cutáneas; la decocción de flores tiene propiedades diuréticas y en Israel se considera un remedio natural para el tratamiento de la hipertrofia benigna de próstata (BPH).

En el estudio llevado a cabo por Jonas et al. (14), se observó que los extractos de flores de la variedad de cactus obtenida con disolvente acuoso y orgánico son capaces de actuar como inhibidores tanto de la enzima 5- α -reductasa como de la aromatasa.

Ammar et al. (15) han logrado una caracterización cuali-cuantitativa de los compuestos contenidos en las flores de *Opuntia ficus indica*. Según lo que se describió por los autores, la extracción en hexano de las flores está constituida principalmente por derivados de ácidos carboxílicos (29-97%); terpenos (0,2-57%), ésteres (0,2-27%) y, en menor cantidad, por compuestos alcohólicos (<1,8%).

Recientemente, se ha prestado una atención particular a los compuestos de tipo flavonoide presentes en tal matriz vegetal. De Leo et al (16) han identificado en el extracto metanólico de flores de *Opuntia ficus indica*, la presencia de derivados glicosilados de kaempferol, de quercetina e isoramnetina, con un contenido total que alcanza los 81,75 mg/1 g de flor fresca.

Entre estos compuestos, el 3-O-robinobiosido de isoramnetina es el compuesto más frecuente, que representa aproximadamente el 52% con respecto al contenido total de flavonoides.

El arroz Negro (*Oryza sativa* L.) es un tipo de arroz cuyo grano presenta un pericarpio típico (cascarón de semilla) de color negro.

Hoy en día el arroz Negro se distribuye a través del mercado mundial y también se cultiva en Italia. De hecho, a partir del cruce de arroz negro con líneas de arroz italiano, se obtuvo un híbrido (arroz Venus) que mantiene las peculiaridades del arroz Chino, pero capaz de adaptarse a nuestros propios climas.

En China el arroz Negro se considera un producto alimenticio valioso por la riqueza en nutrientes presentes (proteínas y sales minerales tales como hierro, manganeso, selenio), pero sobre todo por sus propiedades beneficiosas y saludables.

El arroz Negro se utiliza de hecho en medicina popular en el tratamiento de anemia, para reforzar la función renal, para promover la circulación sanguínea y en el tratamiento de diabetes (17). Hoy en día, tales propiedades se atribuyen principalmente a las sustancias activas antioxidantes presentes en el pericarpio y que confieren al mismo el color peculiar: las antocianinas. Estudios recientes llevados a cabo por Min-Kyoung et al. (18) han demostrado que el arroz Negro contiene tres especies de antocianósidos: cianidina-3-glucósido; delphinidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido. Sin embargo, entre estos, la cianidina-3-glucósido se presenta como el compuesto proporcionado en cantidad predominante de modo que se puede considerar al arroz Negro como una fuente natural de tal compuesto antocianósido (18).

Un objeto de la presente invención es una composición nutracéutica o farmacéutica que comprende un extracto de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* en combinación con un extracto de *Oryza sativa* como principios activos junto con adyuvantes y/o excipientes fisiológicamente aceptables, para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades metabólicas o trastornos relacionados con la inhibición de la actividad enzimática de la 5-alfa reductasa, seleccionados del grupo consistente en hipertrofia benigna de próstata o alopecia androgénica. Los extractos de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y *Oryza sativa* presentes en las composiciones según la invención están en una relación en peso recíproca comprendida entre 1:1 y 1:25, preferiblemente 1:10 o 1:20.

Según la presente invención se pueden utilizar algunas variedades híbridas de arroz Negro.

Los extractos de flores o de frutos de *Opuntia Ficus Indica* se pueden utilizar de manera alternativa, o combinados entre sí.

Según una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas basadas en una combinación de extractos de plantas de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y *Oryza sativa* para uso según la invención se dedican al uso en el tratamiento de hipertrofia benigna de próstata. Preferiblemente, tales composiciones son adecuadas para administración oral, aún preferiblemente en forma de solución oral, emulsión oral, suspensión oral, cápsula, comprimido o polvo. En esta realización, la concentración total de los extractos utilizados en combinación está comprendida entre 10-90% en peso de la composición total.

Según una realización alternativa de la presente invención, las composiciones cosméticas o farmacéuticas basadas en una combinación de extractos de plantas de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y *Oryza sativa* (arroz negro) para uso según la invención, se dedican al uso en el tratamiento de androgénica.

Preferiblemente, tales composiciones cosméticas o farmacéuticas son adecuadas para aplicación tópica, aún más preferiblemente en forma de crema, pomada, ungüento, espuma, loción, gel o pulverización. Para la aplicación tópica, el intervalo de concentración preferido puede variar entre 0,5% y 5% (preferiblemente 2%) en peso de la composición final. También es posible proporcionar su administración oral, en forma de solución, emulsión, suspensión oral, cápsula, comprimido o granulado. Para la administración oral, el intervalo preferido de concentración total de los extractos utilizados en combinación puede variar entre 10% y 90% en peso de la composición final.

Un objeto adicional de la presente invención es también una combinación de un extracto de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y un extracto de *Oryza sativa* (arroz Negro) para uso simultáneo, secuencial o separado en la prevención y en el tratamiento de enfermedades metabólicas o trastornos relacionados con la inhibición de la

actividad enzimática de la 5-alfa reductasa. Dichas enfermedades metabólicas o trastornos correlacionados con la inhibición de la actividad enzimática de la 5-alfa reductasa se seleccionan entre la hipertrofia prostática benigna o la alopecia androgénica.

- 5 La combinación de extractos de plantas de flores y/o frutos de *Opuntia Ficus Indica* y *Oryza sativa* (arroz Negro) para uso según la invención puede ser adecuada para administración oral o para aplicación oral en el campo cosmético, farmacéutico o nutracéutico.

10 Sin embargo, los extractos de flores y/o de frutos de *Opuntia Ficus Indica* y *Oryza sativa* (arroz Negro) se administran en combinación manteniendo una relación de peso recíproca comprendida entre 1:1 y 1:25, preferiblemente una relación de peso recíproca de 1:10 o 1:20.

Para administración oral, el intervalo preferido de concentración total de extractos puede variar entre 10% y 90% en peso de la composición final; para administración tópica, el intervalo de concentración preferido puede variar entre 0,5% y 5% en peso (preferiblemente 2% en peso) de la composición final.

15 La presente invención se describirá ahora de una manera ilustrativa, pero no limitativa, según algunas realizaciones preferidas con referencia particular a las figuras adjuntas, en donde:

- La Figura 1 ilustra los valores porcentuales de vitalidad celular de las células BPH-1 (células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata) obtenidas después de 72 horas de tratamiento con el extracto de flor *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R). * $p < 0,05$ frente a O y R;

20 - La Figura 2 ilustra los valores porcentuales de vitalidad celular de células LNCaP (células prostáticas tumorales dependientes de andrógenos) obtenidas después de 72 horas de tratamiento con extracto de flor de *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R). * $p < 0,05$ frente a O y R;

- La Figura 3 ilustra los valores porcentuales de vitalidad celular de células DU145 (células prostáticas tumorales resistentes a andrógenos) obtenidas después de 72 horas de tratamiento con extracto de flor de *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R). * $p < 0,05$ frente a O y R;

25 - La Figura 4 ilustra los valores de crecimiento celular frente al control (no tratado) de células dérmicas papilares de folículo piloso humano (células DP) obtenidas después de 24 horas de tratamiento con vitamina C (50 $\mu\text{g/ml}$); extracto de flor de *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R). * $p < 0,05$;

30 - La Figura 5 ilustra los porcentajes de inhibición de la enzima 5- α -reductasa obtenida de células BPH-1 después de 72 horas de tratamiento con extracto de flor de *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R); * $p < 0,05$ frente a O y R;

- La Figura 6 ilustra los valores porcentuales de proteínas IF/mg con respecto al control (expresión de las especies radicales ROS) obtenidos a partir de células BPH-1 después de 72 horas de tratamiento con extracto de flor de *Opuntia* (O); extracto de arroz Negro (R) y su combinación (O/R); * $p < 0,05$ frente a O y R.

35 Con un mero propósito ilustrativo, pero no limitativo, de la presente invención, a continuación se dan a conocer estudios in vitro llevados a cabo por los autores de la presente invención sobre varias líneas celulares de próstata humana para mostrar el efecto antiproliferativo sinérgico de las composiciones según la presente invención que contienen los extractos de flor de *Opuntia ficus indica* y de arroz Negro.

Ejemplo 1: Preparación de extractos de flor/fruto de *Opuntia ficus indica* y de *Oryza sativa*.

i) Extracto de flor/fruto de *Opuntia ficus indica*

40 El proceso de extracción se describe a continuación:

Etapa a: maceración de flores/frutos de *Opuntia ficus indica* (procedentes de cultivos de la cuenca mediterránea) frescos o secos en solución acuosa, preferentemente acidificada a pH 3, o con una solución hidroalcohólica (contenidos en etanol 10-70%) a temperatura ambiente. Para facilitar la extracción, las flores y los frutos se pueden triturar o cortar antes de ponerse en contacto con el disolvente de extracción.

45 Etapa b: segunda extracción en la misma matriz vegetal con un disolvente de extracción nuevo, con el fin de facilitar la recuperación de las sustancias activas presentes;

Etapa c: recuperación y concentración bajo vacío de los extractos obtenidos a una temperatura no superior a 50-60°C. En el caso de extractos hidroalcohólicos se procede con la concentración del extracto hasta eliminación completa del disolvente orgánico.

50 Etapa d: recuperación y aislamiento de los compuestos activos a través del paso del extracto sobre una resina Amberlite XAD-7 absorbente macroporosa u otra resina absorbente similar, por elución con una solución hidroalcohólica (50-90%).

Etapa e: concentración hasta eliminación completa del disolvente orgánico y secado siguiente por medio de secado por pulverización o liofilización mediante el uso de un soporte tecnológico adecuado, p. ej., maltodextrinas.

5 El extracto según la invención puede ser líquido o seco (polvo). El extracto obtenido contiene una cantidad de compuestos flavonoides no inferior a 0,1% p/p (intervalo 0,1-5%) y cuyo contenido en 3-O-robinobiosido de isoramnetina no es inferior a 20% con respecto al contenido total de flavonoides.

ii) Extracto de arroz Negro (*Oryza sativa* L.)

El proceso de extracción se describe a continuación:

10 Etapa a: maceración del grano entero o del pericarpio pigmentado solo obtenido por abrasión de la superficie externa del grano con una solución hidroalcohólica (20-60%) a pH ácido con ácido clorhídrico (HCl al 0,1%), a temperatura ambiente.

Etapa b: segunda extracción en la misma matriz vegetal con un nuevo disolvente de extracción, con el fin de favorecer la recuperación de las sustancias activas presentes.

15 Etapa c: recuperación y concentración bajo vacío de los extractos obtenidos a una temperatura no superior a 50-60°C hasta eliminación completa del disolvente orgánico.

Etapa d: recuperación y aislamiento de los compuestos antocianósidos haciendo pasar el extracto a través de resina Amberlite XAD-7 absorbente macroporosa u otra resina absorbente similar, por elución con una solución hidroalcohólica (50-90%).

20 Etapa e: concentración hasta eliminación completa del disolvente orgánico y secado siguiente por medio de secado por pulverización o liofilización mediante el uso de un soporte tecnológico adecuado, p. ej., maltodextrinas.

La invención se refiere a un extracto líquido o seco (en polvo). El extracto de arroz Negro obtenido presenta un contenido de antocianósidos expresado en equivalentes de cianidina-3-O-glucósido, su principal componente, comprendido entre 1-20% p/p.

25 Ejemplo 2: Estudio in vitro sobre la actividad antiproliferativa de extractos de flores de *Opuntia ficus indica* y de *Oryza sativa*.

El estudio tuvo como objetivo la evaluación in vitro de la actividad antiproliferativa ejercida por los extractos vegetales de flores de *Opuntia ficus indica* y de *Oryza sativa* (Arroz Negro) por separado y en combinación entre sí sobre células epiteliales prostáticas humanas, normales y tumorales.

30 El protocolo experimental proporcionó el uso de un modelo celular in vitro capaz de evaluar la vitalidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT.

Materiales y métodos

35 La hipertrofia o hiperplasia benigna de próstata es una enfermedad transmitida por la glándula prostática. La enfermedad se caracteriza por un aumento benigno del volumen de la glándula debido a un crecimiento excesivo de células epiteliales y de elementos estromales. La degeneración maligna de tal hiperplasia tisular determina el desarrollo de un cáncer de próstata.

La actividad antiproliferativa del extracto de flores de *Opuntia* y de arroz Negro y de su combinación se evaluó en las siguientes células modelo de hipertrofia benigna de próstata y de cáncer de próstata:

- BPH-1: células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata;
- LNCaP: células de cáncer de próstata dependientes de andrógenos;
- 40 - DU145: células de cáncer de próstata resistentes a andrógenos.

Estas células expresan diferentes grados de invasividad de enfermedades prostáticas, desde hipertrofia benigna de próstata (BPH-1) hasta las formas más graves de cáncer (LNCaP y DU145).

45 Las células BPH-1 y LNCaP se cultivaron en medio RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero fetal de ternero, glutamina 1 mM y 10 µl/ml de estreptomycin/penicilina. Las células DU145 se cultivaron en medio DMEM enriquecido con 10% de FCS, 1% de estreptomycin-penicilina, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días.

Las células BPH-1, DU145 y LNCaP se sembraron entonces en pocillos para los ensayos MTT y, después de 24 horas de incubación en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C, se trataron durante 72 horas con cada extracto utilizado por separado y en combinación, de acuerdo con lo que se indica en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Extractos y su combinación utilizados en la evaluación en el ensayo de proliferación celular (ensayo celular MTT) sobre células BPH-1, LNCaP y Du145.

Muestra	Composición	Concentración
O	Extracto de flores de Opuntia ficus Indica	10 µg/ml
R	Extracto de arroz Negro	200 µg/ml
O/R	Extracto de flores de Opuntia ficus Indica/extracto de arroz Negro	210 µg/ml

O: Extracto de flores de Opuntia ficus Indica; R: Extracto de arroz Negro; O/R: combinación de los dos extractos

- 5 La vitalidad celular después del tratamiento se midió mediante el ensayo colorimétrico de sales de tetrazolio, que evalúa la capacidad de las células para reducir, por medio de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El MTT entra en las células y pasa a las mitocondrias, en donde se reduce a un producto coloreado e insoluble, que es formazano. Para hacer el color visible, los gránulos coloreados de formazano se solubilizan mediante adición de DMSO. La reacción de escisión por MTT requiere integridad completa de la célula y es proporcional a su grado de actividad metabólica. Después de la incubación de las células durante tres horas, en CO₂ al 5% a 37°C, con 20 µl de solución de sal de tetrazolio, solubilizada en medio (5 mg/ml), y 180 µl de medio, se separó el sobrenadante y se añadió 100 µl de DMSO. A continuación, se midió la densidad óptica (O.D.) a una longitud de onda de 570 nm a través de un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Titertek Multiscan, Flow Laboratories).
- 10
- 15 La vitalidad celular se expresó como porcentaje de densidad óptica con respecto al control no tratado. El experimento se llevó a cabo por triplicado para cada muestra.

Resultados

- Los datos obtenidos de los ensayos MTT realizados han demostrado que tanto el extracto de flor de Opuntia Indica (O) como el extracto de arroz Negro (R) son capaces de inducir, cuando se utilizan por separado, una reducción de la vitalidad celular sobre las líneas celulares BPH-1, LNCaP y DU145 (Tabla 2). El tratamiento de las mismas líneas celulares con ambos extractos utilizados en combinación (O/R), determina una disminución significativa de vitalidad celular con respecto a los extractos individuales, con un efecto antiproliferativo del tipo sinérgico (véase Figuras 1-3 y Tabla 2). La siguiente Tabla 2 ilustra los valores de proliferación celular (MTT) expresados como porcentaje de vitalidad celular con respecto al control (CTRL) de células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata (BPH-1), de células de cáncer de próstata dependiente de andrógenos (LNCaP) y de células de cáncer de próstata resistentes a andrógenos (DU145) después de 72 horas de tratamiento.
- 20
- 25

Tabla 2

	Células BPH-1 % de vitalidad celular (% de inhibición)	Células LNCap % de vitalidad celular (% de inhibición)	Células DU145 % de vitalidad celular (% de inhibición)
Extracto de flores de Opuntia ficus indica (O)	67,42±3,83 (32,6)	71,27±3,68 (28,7)	79,91±2,65 (20,1)
Extracto de arroz Negro (R)	84,81±4,23 (15,2)	74,70±3,46 (25,3)	80,56±3,11 (19,44)
Extracto de Opuntia/arroz Negro (O/R)	30,61±3,11* (69,4)	37,51±2,98* (62,5)	38,82±3,53* (60,2)

*p<0,05 frente a O y R

- Ejemplo 3: Evaluación de la actividad de los extractos de Opuntia ficus indica y de arroz Negro sobre la proliferación de células dérmicas papilares.
- 30

Las células dérmicas papilares son células mesenquimales especializadas que tienen un papel importante en el ciclo vital del pelo.

La estimulación y proliferación de estas células promueven el crecimiento del pelo en la fase anagénica. Tales células se utilizan como células modelo en la evaluación de promotores de crecimiento del bulbo piloso.

Materiales y métodos

- 5 Las células dérmicas papilares de un folículo piloso humano (DPCells, PromoCell) se cultivaron en medio de crecimiento (PromoCell) enriquecido con 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Las células DP se sembraron posteriormente en pocillos para los ensayos MTT y, después de 24 horas de incubación en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C, se trataron durante 24 horas con cada extracto utilizado por separado y en combinación, según lo que se indicó en la Tabla 1. La vitalidad celular después del tratamiento se midió a través del ensayo colorimétrico MTT (según el protocolo descrito anteriormente). La vitamina C se utilizó como control positivo (50 µg/ml).

Resultados

- 15 Los resultados obtenidos del ensayo de proliferación celular realizado sobre células dérmicas papilares de un folículo piloso humano muestran cómo el extracto de flor de Opuntia (O) y de arroz Negro (R) determinan un efecto proliferativo moderado, inferior o comparable al de la vitamina C utilizada como control positivo (Figura 4). Sin embargo, dicho efecto se hace significativamente mayor cuando los dos extractos se utilizan en combinación (O/R), con un aumento del crecimiento celular de aproximadamente el 54%.

Ejemplo 4: Evaluación del mecanismo de acción ejercido por los extractos de flor de Opuntia ficus indica y de arroz Negro sobre la proliferación celular.

- 20 En el presente estudio se llevó a cabo una evaluación de los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto ejercido por los extractos de flor de Opuntia y de arroz Negro, utilizados solos o en combinación, que utilizan las células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata BPH-1 como células modelo en los siguientes ensayos:

- expresión de la enzima 5-α-reductasa a través de la técnica Western-blot (inhibición enzimática);
- producción de especies radicales del oxígeno ROS (actividad antioxidante);
- 25 - expresión del factor Akt/PKB a través de la técnica ELISA (regulación del ciclo celular).

Materiales y métodos

Cultivo celular y tratamiento

- 30 Las células BPH-1 se cultivaron en medio RPMI 1640 enriquecido con FCS al 10%, glutamina 1 mM y 10 µl/ml de estreptomycin/penicilina y mantenido en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. Veinticuatro horas antes de los experimentos, las células se tripsinizaron, contado en un hemocitómetro, sembrado en nuevos pocillos y tratado durante 72 horas con cada extracto, utilizados por separado y en combinación, según lo que se indica en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Extractos y su combinación utilizados en los ensayos de inhibición de 5α-reductasa, producción de ROS y regulación del ciclo celular en el cultivo celular de BPH-1.

Muestra	Composición	Concentración
O	Extracto de flor de Opuntia ficus indica	10 µg/ml
R	Extracto de arroz Negro	200 µg/ml
O/R	Extracto de Opuntia/arroz Negro	210 µg/ml

35

Inhibición de la enzima 5α-reductasa

- 40 Las células BPH-1 tratadas se lavaron en frío dos veces con PBS y luego se recogieron con un tampón de lisis que contenía Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, PMSF 0,6 mM y 1% de SDS con un pH de 7,4. Después de enfriar durante 10 minutos a 0°C, las proteínas se recogieron después de la centrifugación. Se cargaron en cada pista sesenta microgramos de proteínas totales, presentes en el sobrenadante, y luego separados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa en un ambiente húmedo.

Los sitios inespecíficos de membranas se enmascararon mediante incubación con un tampón salino que contiene 0,01% de Tween-20 (TBST) y 5% de leche en polvo sin grasa a 4°C durante toda una noche.

Los anticuerpos dirigidos contra la 5 α -reductasa diluida adecuadamente en TBST, se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que utiliza el sustrato Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) para quimioluminiscencia. La expresión de proteínas se cuantificó por medio de análisis densitométrico de autorradiografías. La densidad de las bandas simples para cada muestra se expresó en relación con la de la α -tubulina, tomada como proteína de referencia, y los valores indicados (correspondientes a la intensidad de señal) se indicaron como unidades densitométricas arbitrarias. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control para cada muestra. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Resultados

Los datos obtenidos de los estudios llevados a cabo han demostrado que el extracto de Opuntia presenta una mayor inhibición de la expresión de la enzima 5 α -reductasa con respecto al extracto de arroz Negro, con un porcentaje que alcanza aproximadamente 40% (véase Tabla 4; Figura 5).

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de la enzima 5 α -reductasa obtenida de células epiteliales de hiperplasia benigna de próstata (BPH-1) tratadas con extracto de flor de Opuntia (O) y de arroz Negro (R) solo o en combinación (O/R).

Muestra	% de inhibición frente a control
Extracto de flor de Opuntia ficus indica (O)	39,01 $\pm$ 3,26
Extracto de arroz Negro (R)	12,46 $\pm$ 2,52
Extracto de Opuntia/arroz Negro (O/R)	75,48 $\pm$ 2,36*

*p<0,05 frente a O y R

Sin embargo, cuando se utilizan los extractos en combinación, se observa un refuerzo considerable de este efecto con un porcentaje de inhibición igual a aproximadamente 75%.

Determinación de las especies radicales de oxígeno (ROS)

Para la determinación de ROS se utilizó diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) no fluorescente. En presencia de ROS, el DCFH-DA se hidroliza y se oxida a DCF, que es una molécula altamente fluorescente. La intensidad de fluorescencia intracelular de DCF se utilizó para cuantificar las especies oxidantes presentes en la célula que utiliza un fluorómetro Hitachi a λ EX = 485 nm y λ E = 530 nm.

Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia/mg de proteínas.

Resultados

Los datos obtenidos del experimento han mostrado que el tratamiento de la línea celular BPH-1 con el extracto de arroz Negro determina una menor expresión de las especies radicales ROS y así un efecto de protección antioxidante superior al obtenido del extracto de flor de Opuntia (véase Tabla 5 y Figura 6). Además, cuando las células se trataron con ambos extractos, la producción de especies radicales resulta estar considerablemente reducida (87% de inhibición), con un efecto sinérgico entre los dos extractos en el refuerzo de las defensas antioxidantes intracelulares.

Tabla 5. Valores porcentuales frente al control de las especies radicales ROS expresadas por las células BPH-1 tratadas con el extracto de flor de Opuntia (O) y de arroz Negro (R) solos y en combinación (O/R).

Muestra	%IF/mg de proteína frente al control (% de inhibición)
Extracto de flor de Opuntia ficus indica (O)	81,16 $\pm$ 3,53 (18,8%)
Extracto de arroz Negro (R)	46,07 $\pm$ 2,79 (53,9%)

Extracto de Opuntia/arroz Negro (O/R)	12,95 ±2,90* (87,1%)
---------------------------------------	-------------------------

*p<0,05 frente a O y R

Determinación de la expresión de factor Akt/PKB

- 5 La determinación de la expresión del fosfo-AKT (Thr308) y fosfo-AKT (Ser473) en el lisado de las células BPH-1 se realizó a través de STAR (Reacción de Ensayo de Transducción de Señales) kit ELISA, según la especificación del proveedor. La determinación colorimétrica se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm y el contenido en p-Akt (Thr308) y p-Akt (Ser473) se expresó en U/ng de Akt total.

Resultados

- 10 En las muestras celulares tratadas con el extracto de flor de Opuntia y de arroz Negro se observa una reducción significativa de los niveles del Akt(Thr308) y del Akt(Ser473) con respecto a las células no tratadas utilizadas como control (Tabla 6). Sin embargo, este efecto se refuerza considerablemente cuando los extractos se utilizan en combinación (O/R).

Tabla 6. Expresión de los factores Akt(Thr308) y Akt(Ser473) en células BPH-1 tratadas con el extracto de flor de Opuntia (O) y de arroz Negro (R) solos y en combinación (O/R).

Tratamiento	Akt(Thr308) U/ng Akt total	Akt(Ser473) U/ng Akt total
Control	0,89 ± 0,018	0,085 ± 0,004
Extracto de flor de Opuntia (O)	0,78 ± 0,023	0,070 ± 0,003
Extracto de arroz Negro ®	0,80 ± 0,015	0,077 ± 0,003
Extracto de Opuntia/arroz Negro (O/R)	0,48 ± 0,010*	0,051 ± 0,002*

- 15 *p<0,05 frente a O y R

- Los diversos modelos experimentales adoptados en los Ejemplos 2-3 permitieron evaluar el efecto de los extractos de flor de Opuntia indica y de arroz Negro, utilizados solos o en combinación, también en el tratamiento de diversas enfermedades dependiente de andrógenos tales como: hipertrofia benigna de próstata (en diferentes grados de agresividad) a través de las líneas celulares BPH-1, LNCaP y DU145; alopecia androgénica a través de las células dérmicas papilares del folículo piloso humano (células DP).

- 20 El ensayo MTT de proliferación celular se adoptó como método de evaluación y cuantificación en cada una de las líneas celulares utilizadas. Los datos obtenidos han demostrado cómo los extractos individuales son capaces de actuar como reguladores de proliferación de las líneas celulares adoptadas. De hecho inhiben la hiperproliferación expresada por las líneas celulares prostáticas BPH-1, LNCaP y DU145 promueven la vitalidad de las células dérmicas papilares del pelo. Tales efectos se refuerzan significativamente en todas las líneas celulares cuando los extractos se utilizan en combinación, con una acción de tipo sinérgico.

Ejemplo 5: Ejemplos de formulaciones

- 30 A continuación se ejemplifican diversas formulaciones para uso oral (comprimidos, cápsulas, polvos) y para uso tópico (gel, tónico) que comprenden la combinación del extracto de flor/fruto de Opuntia Indica y de arroz Negro con una relación en peso recíproco diferente.

I) Ejemplos de formulaciones para uso oral

- Cápsulas (relación 1:10)

Componentes	% p/p
Extracto de flores de Opuntia	1%
Extracto de arroz Negro	10%
Lactosa	Hasta 100 g

Método de preparación:

Mezclar los extractos con lactosa, según las reglas de dilución geométrica, luego se procede con la repartición en las cápsulas.

- 5 - Comprimidos (relación 1:20)

Componentes	% p/p
Extracto de flores de Opuntia	4,2%
Extracto de arroz Negro	84,2%
Estearato de magnesio vegetal	0,7%
Dióxido de silicio	1,4 %
Talco	0,7%
Goma arábica	0,7%
Ácido cítrico	0,8%
Agentes de recubrimiento:	
- Amidón modificado pregelatinizado	3,5%
- Talco	2,2%
- Goma laca	0,9%
- Glicerol	0,7%

Método de preparación:

Mezclar los extractos de arroz Negro y de flor de Opuntia ficus indica y se procede, según la práctica, a la granulación en lecho fluido, que utiliza una solución de granulación acidificada con ácido cítrico y goma arábica.

- 10 Mezclar el granulado con los agentes antiaglomerantes (talco, dióxido de silicio, estearato de magnesio); someter la mezcla a compresión por medio de una máquina de compresión. Proceder con un recubrimiento primario de los comprimidos con goma laca y talco y un subsiguiente recubrimiento con almidón modificado pregelatinizado, glicerol y talco.

- Polvo para uso oral (ejemplo de relación 1:1)

Componentes	% p/p
Extracto de fruto de Opuntia	5%
Extracto de arroz Negro	5%
Dióxido de silicio	0,67%
Sucralosa	0,17%
Maltodextrina	Hasta 100 g

- 15 Método de preparación:

Mezclar los componentes individuales con maltodextrina, según las reglas de dilución geométrica, luego se procede a la repartición en bolsitas o bolsas.

II) Ejemplos de formulaciones para uso tópico

- Tónico anticaída de pelo

Componentes	% p/p
-------------	-------

Extracto de fruto de Opuntia	0,05%
Extracto de arroz Negro	0,5%
Etanol	18,2%
Clorfenesina, metilparabeno	0,3%
Fragancia (perfume)	0,05%
Ácido cítrico 10%	Una cantidad suficiente
Agua desionizada	Hasta 100 g

Método de preparación:

- 5 Solubilizar los extractos en agua acidificada con ácido cítrico, añadir etanol y los otros componentes bajo agitación mecánica y a temperatura ambiente. Filtrar para eliminar posibles partículas en suspensión.

- Gel

Componentes	% p/p
Hidroxietilcelulosa (Natrosol)	1,5%
Extracto de fruto de Opuntia	0,1%
Extracto de arroz Negro	2%
Propilenglicol	10%
Citrato de sodio	0,35%
Metabisulfito de sodio	0,50%
EDTA disódico	0,10%
p-hidroxibenzoato de metilo	0,20%
p-hidroxibenzoato de propilo	0,05%
Agua desionizada	Hasta 100 g

Método de preparación:

- 10 Solubilizar el citrato de sodio en agua y posteriormente todos los demás ingredientes excepto para hidroxietilcelulosa (Natrosol). Añadir a la solución obtenida hidroxietilcelulosa en porciones, para promover su dispersión, y dejar agitar durante aproximadamente 12 horas para la formación de gel. Verificar que el pH de la formulación no supere un valor igual a 5.

Referencias bibliográficas

- (1) Azzouni F. et al. Advances in Urology. 2012, pages 1-18.
- (2) Arias-Santiago S. J. Am. Acad. Vol. 66, No. 3, pages 401-408.
- 5 (3) Edwards J. American Family Physician Vol. 77, Number 10, May 2008.
- (4) Iperplasia Prostatica Benigna. AURO.it, pp. 1-48, 2004. Redazione Zadig.
- (5) Chun H.M. et al. Asian Journal of Andrology. Vol. 15, pp. 471-482, 2013.
- (6) McPartland J.M. & Pruitt P.L. JAOA. Vol. 100 Number 2, February 2000.
- (7) MarbergerM. Adv. Ther. Vol. 30(4), pages: 309-319, 2013.
- 10 (8) US Patent Application No. 2013/0259958.
- (9) Park H.J. World J. Mens Health. Vol. 31(3), pages 193-207, 2013.
- (10) Izumi K. The American Journal of Pathology. Vol. 182(6), June 2013.
- (11) Beduschi MC & Oesterling JE. Mayo Clin Proc. Vol. 73(7), pp:696-701, July 1998.
- (12) Teng J. et al. BJU Int. Vol. 111(2), pages:312-23, February 2013.
- 15 (13) Bienova M. et al. Acta Dermatoven APA. Vol. 14, No. 1, pages 1-8, 2005.
- (14) Jonas A. et al. Urol. Res. Vol. 26, pages 265-270, 1998.
- (15) Ammar I. et al. Industrial Crops and Products. Vol. 37, pages 34-40, 2012.
- (16) De Leo M. et al. Phytochemistry Letters. Vol.3, pages 48-52, 2010.
- (17) Deng G.F. et al. Crit Rev Food Sci Nutr. Vol. 53(3), pages 296- 306, 2013.
- 20 (18) Min-Kyoung K. et al. Nutrition Research and Practice Vol. 2(1), pages 46-49, 2008.

REIVINDICACIONES

1. Una composición nutracéutica o farmacéutica que comprende una combinación de un extracto de flores y/o frutos de *Opuntia ficus indica* y un extracto de *Oryza sativa* (arroz Negro) como principios activos, junto con adyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, para uso en la prevención y tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la inhibición de la actividad enzimática de la 5-alfa reductasa seleccionada entre hiperplasia benigna de próstata o alopecia androgénica.
2. La composición nutracéutica o farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en donde el extracto de flores y/o frutos de *Opuntia ficus indica* y el extracto de *Oryza sativa* (arroz Negro) están en una relación de peso recíproca comprendida entre 1:1 y 1:25, preferiblemente 1:10 ó 1:20.
3. La composición nutracéutica o farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso en la prevención y tratamiento de hiperplasia benigna de próstata, que es adecuada para la administración oral.
4. La composición nutracéutica o farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en forma de solución oral, emulsión oral, suspensión oral, cápsula, comprimido, polvo o granulado.
5. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso en la prevención o tratamiento de la alopecia androgénica, que es adecuada para administración tópica u oral.
6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, adecuada para aplicación tópica en forma de crema, pomada, ungüento, espuma, loción, gel o pulverización.
7. La composición adecuada para la administración oral para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde la concentración total de los extractos está comprendida entre 10%-90% en porcentaje en peso de la composición final.
8. La composición farmacéutica adecuada para aplicación tópica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde la concentración total de los extractos está comprendida entre 0,5%-5% en porcentaje en peso de la composición final.
9. Una preparación combinada de un extracto de flores y/o frutos de *Opuntia ficus indica* y de un extracto de *Oryza sativa* (arroz Negro) para uso simultáneo o separado en la prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la inhibición de la actividad enzimática de la 5-alfa reductasa, seleccionados entre hiperplasia benigna de próstata o alopecia androgénica.
10. Una preparación combinada para el uso según la reivindicación 9, adecuada para administración tópica u oral.

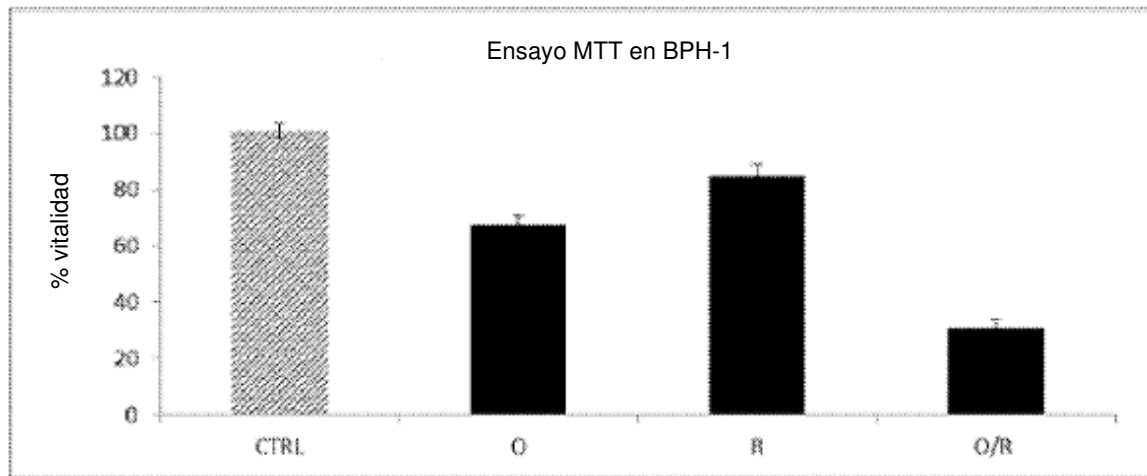


Fig. 1

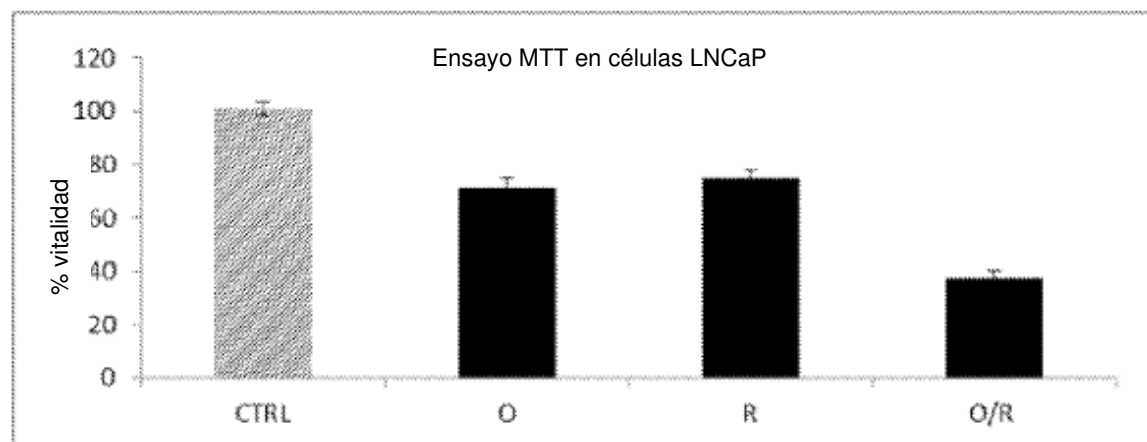


Fig. 2

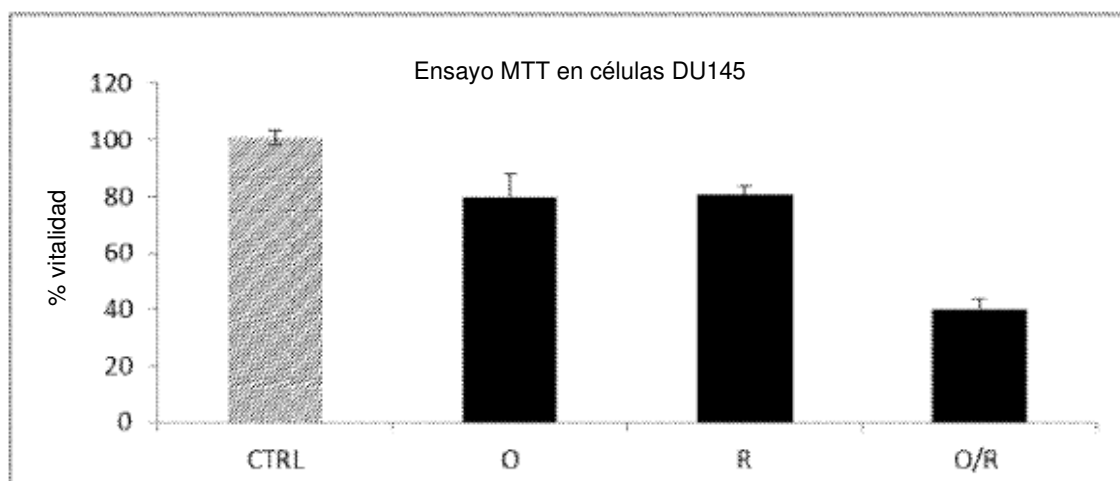


Fig. 3

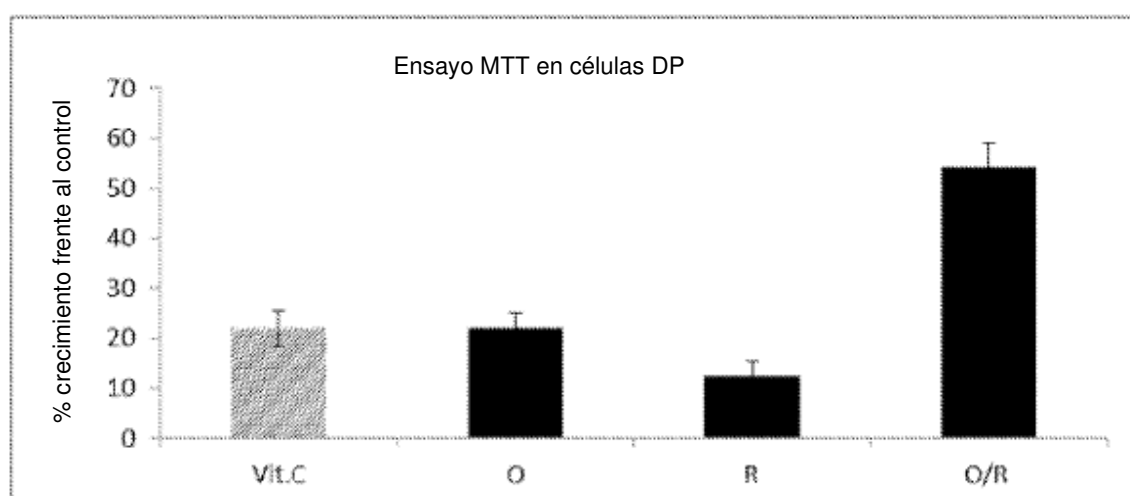


Fig. 4

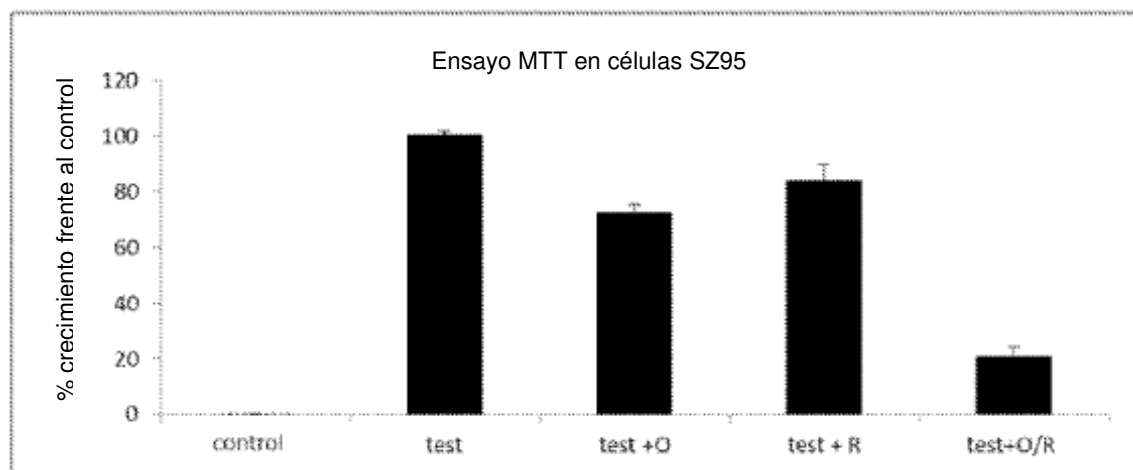


Fig. 5

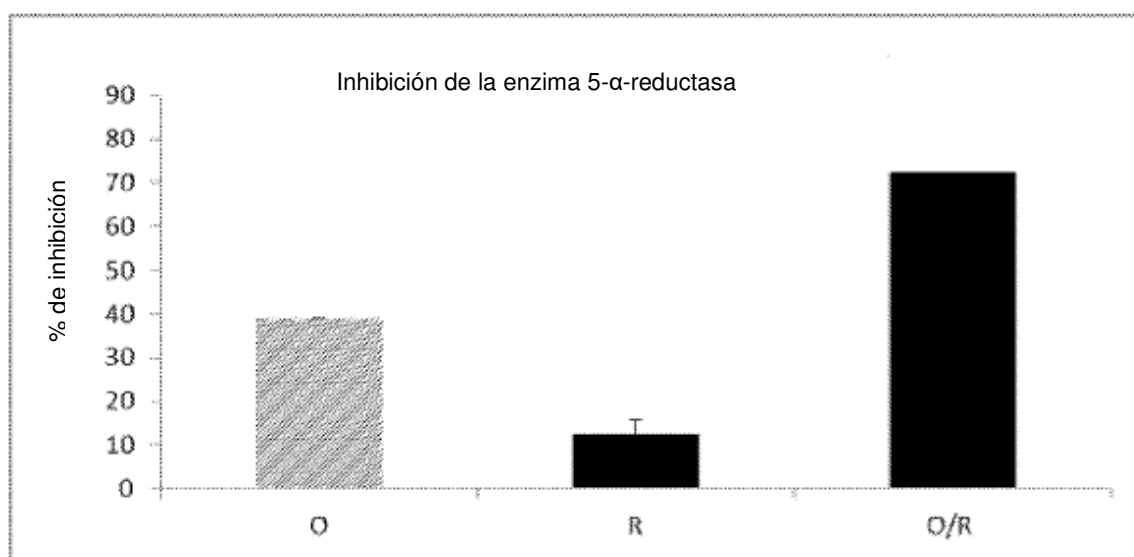


Fig. 6

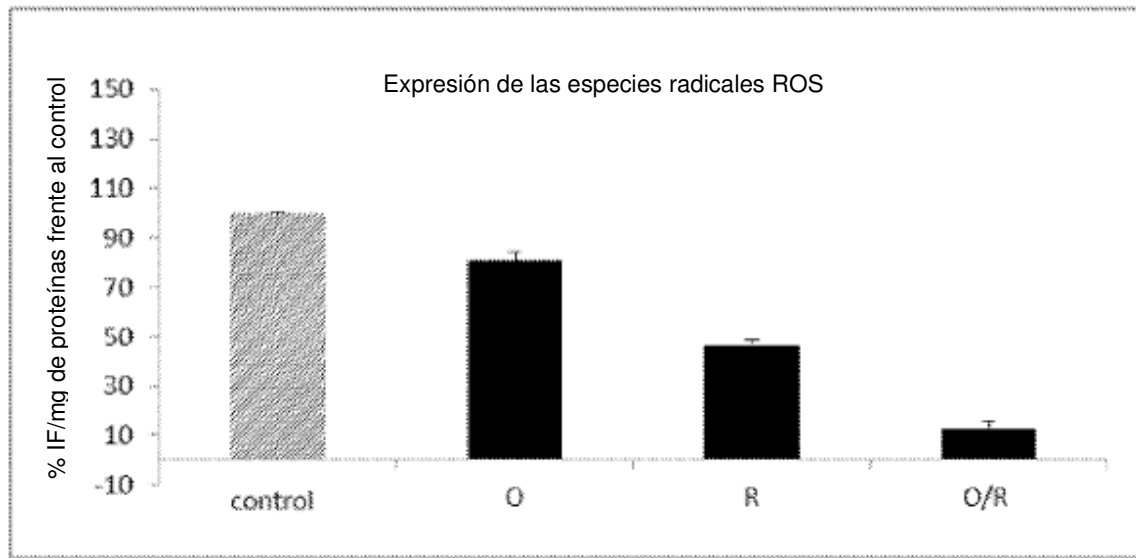


Fig. 7