

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 005**

51 Int. Cl.:

C07K 5/103 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A23L 33/18 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2018** **PCT/KR2018/007515**
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2019** **WO19045248**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2018** **E 18850102 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3677590**

54 Título: **Péptido que presenta actividad de mejora de las arrugas y usos del mismo**

30 Prioridad:

31.08.2017 KR 20170111211

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.10.2024

73 Titular/es:

CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, KR

72 Inventor/es:

CHUNG, YONG JI;
KIM, EUN MI y
LEE, EUNG JI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 982 005 T3

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

Péptido que presenta actividad de mejora de las arrugas y usos del mismo

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que incluye el péptido y una composición para mejorar el estado de la piel que incluye el péptido en donde la composición es una composición cosmética o una composición alimenticia.

Antecedentes de la técnica

La piel humana cambia constantemente, siendo lo más representativo de esto el deterioro de la función de la piel y la disminución de la belleza visual a causa del envejecimiento. El envejecimiento de la piel se clasifica en envejecimiento endógeno debido a factores genéticos y envejecimiento exógeno debido a factores ambientales externos tales como la luz solar.

Se forman arrugas en la piel a causa del envejecimiento y los factores representativos en la formación de arrugas incluyen el oxígeno activo, rayos ultravioleta y disminución de la biosíntesis de colágeno. En el caso del envejecimiento endógeno de la piel, el control artificial no es posible, pero, en el caso del envejecimiento exógeno, el envejecimiento se puede prevenir, tratar o retrasar eliminando el oxígeno activo, induciendo la proliferación de fibroblastos y promoviendo la biosíntesis de colágeno.

El documento WO 2015/174601 se refiere a un péptido que tiene actividad para mejorar las afecciones cutáneas y su uso.

Sumario de la invención

Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar un péptido excelente que tenga actividad biológicamente eficaz. Como resultado, se descubrió que un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 puede usarse eficazmente para mejorar las arrugas de la piel, completando de este modo la presente divulgación.

La invención se define en las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes se definen aspectos y realizaciones preferidas adicionales. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona únicamente con fines ilustrativos.

La invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene actividad de mejora del estado de la piel.

La invención también proporciona una composición para mejorar el estado de la piel que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde dicha composición es una composición cosmética o una composición alimenticia.

La invención proporciona además una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que incluye el péptido, una composición cosmética para mejorar el estado de la piel que incluye el péptido y una composición alimenticia para mejorar el estado de la piel que incluye el péptido.

Las características representativas de un área de arrugas cutáneas son un menor nivel de proteínas de la matriz extracelular (MEC), tal como niveles de colágeno, elastina y fibronectina, que constituyen la dermis.

Para presentar el efecto de mejora de las arrugas cutáneas, es necesario mostrar el efecto de aumento de la expresión de las moléculas de la MEC promoviendo la proliferación y activación de los fibroblastos, que son las principales células que componen la dermis. Para confirmar la eficacia de estos péptidos, se llevaron a cabo ensayo MTT, prueba del nivel de fosforilación de MAPK, AKT (la forma fosforilada es la forma activa de las moléculas de señalización asociadas con la proliferación celular), prueba de expresión de colágeno, elastina y fibronectina (identificación de niveles de ARNm mediante RT-PCR y niveles de proteínas mediante ELISA). Como resultado, se mostraron efectos positivos.

Además, al observar el efecto de promover la proliferación de queratinocitos, que son células constituyentes epidérmicas, y aumentar la expresión de HA, AQP3 y SIRT1, se confirmó que el péptido tiene un efecto de inhibición de la estimulación externa mediante el fortalecimiento de la barrera.

5 A continuación en el presente documento, se describirá la presente divulgación con más detalle.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene actividad de mejora del estado de la piel. También se describe, pero no forma parte de la invención, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 3 o 4.

10 En el péptido, se puede inducir una modificación aminoterminal y/o carboxitterminal para seleccionar una parte de la secuencia de aminoácidos y aumentar su actividad. Dicha modificación aminoterminal o carboxitterminal puede mejorar significativamente la estabilidad del péptido de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede aumentar la semivida *in vivo* tras la administración del péptido.

15 El extremo N del péptido puede modificarse uniéndolo a un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxycarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y un polietilenglicol (PEG).

20 El extremo C del péptido puede modificarse uniéndolo a un grupo hidroxilo (-OH), un grupo amino (-NH₂), un grupo azida (-NHNH₂), o similar, pero no se limita a esto.

El grupo protector puede actuar para proteger el péptido de la presente invención contra el ataque de una enzima de escisión de proteínas *in vivo*.

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se describe, pero no forma parte de la invención, una composición farmacéutica para prevenir o tratar dermatopatías que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

30 La dermatopatía puede ser psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis no alérgica y xerodermia, pero no se limita a estas.

La composición farmacéutica puede comprender una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2.

35 1 o 2.

Además, la composición farmacéutica puede incluir también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser cualquier vehículo adecuado incluido generalmente en la preparación. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, pero no se limita a estos. El vehículo y la preparación farmacéuticamente aceptables que son adecuados para su uso se describen detalladamente en Remington's Pharmaceutical Sciences (19.^a ed., 1995).

45 La composición farmacéutica puede incluir adicionalmente, además de los ingredientes anteriores, un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, una suspensión o un conservante, pero no se limita a estos.

50 La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral o parenteral. Preferentemente, la composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral. La administración parenteral puede ser administración intramuscular, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración local o administración dérmica, pero no se limita a estas.

55 La dosis de la composición farmacéutica puede estar en un intervalo de 0,0001 microgramos (µg) a 1.000 µg (de 0,001 µg a 1.000 µg, de 0,01 µg a 1.000 µg, de 0,1 µg a 1.000 µg o de 1,0 µg a 1.000 µg) al día, pero no se limita a estas. La prescripción puede variar según el método de preparación, el método de administración, la edad, el peso, el sexo, el proceso patológico, la alimentación, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad del paciente.

60 La composición farmacéutica se puede preparar en forma de dosis unitaria formulándola con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable o prepararse en un recipiente multidosis según un método que puede ser llevado a cabo fácilmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

65 La formulación puede estar en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones en aceites o medios acuosos o en

forma de excipientes, polvos, gránulos, comprimidos o cápsulas y, además, puede contener agentes dispersantes y/o estabilizantes.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una composición para mejorar la piel que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde dicha composición es una composición cosmética o una composición alimenticia. En algunas realizaciones, la composición es una composición alimenticia para mejorar el estado de la piel que incluye como principio activo un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se describe, pero no forma parte de la invención, una composición alimenticia para mejorar el estado de la piel que incluye como principio activo al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 3 o 4.

La mejora del estado de la piel puede ser una mejora de las arrugas, regeneración de la piel, mejora de la elasticidad de la piel, inhibición del envejecimiento de la piel, regeneración de heridas, mejora del acné, regeneración de la piel o blanqueamiento de la piel, pero no se limita a estas.

El alimento puede ser distintos alimentos, bebidas, aditivos alimentarios y similares.

La cantidad del péptido como principio activo contenida en la composición alimenticia no está particularmente limitada y puede controlarse adecuadamente dependiendo del tipo de alimento o del uso deseado del mismo. Por ejemplo, se puede añadir una cantidad del péptido en un intervalo de 0,01 % a 15 % en peso del peso total del alimento y se puede añadir una cantidad del péptido a una composición de bebida saludable en un intervalo de 0,02 g a 10 g, preferiblemente de 0,3 g a 1 g basado en 100 ml.

Cuando el alimento es una bebida, los componentes líquidos no están particularmente limitados excepto que el péptido está contenido como ingrediente fundamental en la proporción indicada y la bebida puede contener ingredientes adicionales tales como diversos agentes saborizantes o carbohidratos naturales como en las bebidas en general.

Los ejemplos de los carbohidratos naturales incluyen azúcares convencionales, tales como monosacáridos, p. ej., glucosa, fructosa y similares; disacáridos, p. ej., maltosa, sacarosa y similares; y polisacáridos, p. ej., dextrina, ciclodextrina y alditos tales como xilitol, sorbitol y eritritol.

Como agente saborizante distinto de los mencionados anteriormente, se puede emplear un agente saborizante natural (taumartina o un extracto de estevia, p. ej., rebaudiósido A, glicirricina o similares); y un agente saborizante sintético tal como sacarina, aspartamo y similares. Una proporción de tales carbohidratos naturales puede ser generalmente de aproximadamente 1 g a 20 g, preferiblemente de 5 g a 12 g por cada 100 ml de la composición de la presente divulgación.

Además de lo anterior, la composición alimenticia de la presente divulgación puede contener diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), aromas, tales como aromas sintéticos y naturales, agentes colorantes y agentes neutralizantes (queso, chocolate, etc.), ácido péctico y sales del mismo, ácido alginico y sales del mismo, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, ajustadores del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes, agentes de carbonatación usados en bebidas carbonatadas y similares.

Además, la composición alimenticia de la presente divulgación puede contener pulpa para la producción de zumos de frutas naturales, bebidas de zumos de frutas y bebidas de hortalizas. Estos componentes pueden usarse independientemente o en combinación. La proporción de dichos aditivos no es crítica, pero generalmente está en un intervalo de 0 a aproximadamente 20 partes en peso por 100 partes en peso de la composición de la presente divulgación.

En algunas realizaciones de la invención, la composición es una composición cosmética para mejorar el estado de la piel que incluye un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se describe, pero no forma parte de la invención, una composición cosmética para mejorar el estado de la piel que incluye como principio activo al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, 3 o 4.

La mejora del estado de la piel puede ser una mejora de las arrugas, regeneración de la piel, mejora de la elasticidad de la piel, inhibición del envejecimiento de la piel, regeneración de heridas, mejora del acné, regeneración de la piel o blanqueamiento de la piel, pero no se limita a estas.

La composición cosmética puede incluir: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido de la presente divulgación y/o (b) un vehículo cosméticamente aceptable, pero no se limita a estos.

La expresión "cantidad cosmética eficaz" como se usa en el presente documento significa una cantidad suficiente para lograr la eficacia de mejora de la piel de la composición de la presente divulgación descrita anteriormente.

La composición cosmética puede prepararse en cualquier formulación preparada convencionalmente en la técnica,

por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, pastas, geles, cremas, lociones, polvos, jabones, limpiador que contiene tensioactivo, aceites, bases en polvo, bases en emulsión, bases de cera, aerosoles y similares, pero no se limita a estos. Más específicamente, la composición cosmética puede prepararse en forma de loción flexible, loción nutritiva, crema nutritiva, crema para masaje, esencia, crema oftálmica, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, paquete, atomizador o polvo.

Cuando una formulación de un producto cosmético de la presente divulgación es una pasta, crema o gel, se pueden usar aceites animales, aceites vegetales, ceras, parafinas, almidones, goma arábiga, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, sílices, talco u óxido de zinc como componente transportador.

Cuando una formulación de un producto cosmético de la presente divulgación es polvo o aerosol, se puede usar lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o polvo de poliamida como componente transportador. En particular, en el caso de un aerosol, se puede incluir además un propulsor, tal como clorofluorohidrocarburo, propano/butano o dimetiléter.

Cuando una formulación de un producto cosmético de la presente divulgación es una solución o emulsión, se utiliza un disolvente, un solubilizante o un emulsionante como componente transportador, tal como agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol o ésteres de ácidos grasos de sorbitán.

Cuando una formulación de un producto cosmético de la presente divulgación es una suspensión, se puede utilizar un diluyente líquido, tal como agua, etanol o propilenglicol, un agente de suspensión, tal como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de sorbitol polioxi-etileno y éster de sorbitán polioxi-etileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar o goma arábiga como componente transportador.

Cuando una formulación de un producto cosmético de la presente divulgación es un limpiador que contiene tensioactivo, como componente transportador, se puede utilizar un sulfato de alcohol alifático, éter sulfato de alcohol alifático, monoéster del ácido sulfosuccínico, isetionato, un derivado de imidazolinio, metiltaurato, sarcosinato, éter sulfato de amida de ácidos grasos, alquilamidobetaina, alcohol alifático, glicérido de ácidos grasos, dietanolamida de ácidos grasos, aceite vegetal, derivado de lanolina o éster de ácido graso de glicerol etoxilado.

Los componentes incluidos en la composición cosmética pueden incluir componentes utilizados convencionalmente en composiciones cosméticas, además de un péptido y un componente transportador como principios activos, por ejemplo, adyuvantes convencionales tales como antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, pigmentos y saborizantes.

La expresión "mejora del estado de la piel" como se usa en el presente documento abarca un proceso de tratamiento, alivio o mitigación del daño a la piel causado por factores intrínsecos o extrínsecos de la piel o su efecto. Por ejemplo, la expresión puede significar aliviar o mejorar la inflamación en la piel, pero no se limita a esto.

También se describe en el presente documento un uso de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 para mejorar el estado de la piel.

La mejora del estado de la piel puede ser una mejora de las arrugas, regeneración de la piel, mejora de la elasticidad de la piel, inhibición del envejecimiento de la piel, regeneración de heridas, mejora del acné, regeneración de la piel o blanqueamiento de la piel, pero no se limita a estos.

También se describe en el presente documento un uso de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 para prevenir o tratar dermatopatías.

La dermatopatía puede ser psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis no alérgica y xerodermia, pero no se limita a estas.

El péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 es el mismo que los descritos anteriormente.

El término "péptido" como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula lineal formada mediante la unión de restos de aminoácidos entre sí por enlaces peptídicos. Los péptidos de la presente divulgación pueden prepararse mediante métodos de síntesis química conocidos en la técnica, en particular técnicas de síntesis en fase sólida (solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2.^a ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)) o tecnología de síntesis en fase líquida (patente de EE.UU. n.º 5.516.891).

El término "estabilidad" como se utiliza en el presente documento significa no solo estabilidad *in vivo* sino también estabilidad durante el almacenamiento (p. ej., estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente).

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz", como se utiliza en el presente documento, significa una cantidad

suficiente para lograr la eficacia o actividad de los péptidos descritos anteriormente.

Efectos ventajosos de la divulgación

- 5 La presente divulgación se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene actividad de mejora del estado de la piel, una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que incluye el péptido, una composición cosmética para mejorar el estado de la piel que incluye el péptido y una composición alimenticia para mejorar el estado de la piel que incluye el péptido.

10 Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- 15 La FIG. 2 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 3 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- La FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- 20 La FIG. 5 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- La FIG. 6 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 7 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- 25 La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la proliferación de queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- La FIG. 9 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK (eliminación de AKT) en fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- 30 La FIG. 10 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK (eliminación de AKT) en fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 11 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK y AKT en fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- La FIG. 12 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK y AKT en fibroblastos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- 35 La FIG. 13 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK (eliminación de AKT) en queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- La FIG. 14 es una imagen que muestra los resultados de la medición del nivel de fosforilación de MAPK (eliminación de AKT) en queratinocitos de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- 40 La FIG. 15 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- La FIG. 16 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 17 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
- 45 La FIG. 18 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- La FIG. 19 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de AQP3 (Acuaporina 3) de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- 50 La FIG. 20 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de SIRT1 de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- La FIG. 21 es una imagen que muestra los resultados de RT-PCR de AQP3 (Acuaporina 3) de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 22 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de colágeno 1a de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- 55 La FIG. 23 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de fibronectina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- La FIG. 24 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
- 60 La FIG. 25 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de colágeno 1a de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 26 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de fibronectina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- La FIG. 27 es una imagen que muestra los resultados de la medición de una cantidad de expresión de elastina de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
- 65 La FIG. 28 es una imagen que muestra los resultados de ELISA de procolágeno 1a de un péptido que consiste en

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;

La FIG. 29 es una imagen que muestra los resultados de ELISA de procolágeno 1a de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

La FIG. 30 es una imagen que muestra los resultados de ELISA de procolágeno 1a de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

La FIG. 31 es una imagen que muestra los resultados de ELISA de procolágeno 1a de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; y

La FIG. 32 es una imagen que muestra los resultados de ELISA de HA de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

Ejemplos

Ejemplo de síntesis 1: Síntesis de péptido

Se colocaron 70 g de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTC, Nova biochem Cat n.º 01-64-0021) en un recipiente de reacción y se añadieron al mismo 490 ml de cloruro de metileno (MC) y se agitó durante 3 minutos. A continuación, se eliminó la solución, se le añadieron 490 ml de dimetilformamida (DMF), se agitó la mezcla durante 3 minutos y después se retiró el disolvente. Se añadieron al reactor 700 ml de solución de diclorometano y se le añadieron 200 mmol de Fmoc-Tyr(tBu)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA), seguido de agitación y disolución. La reacción se llevó a cabo con agitación durante 1 hora. Después del lavado, se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en diclorometano (DCM), se dejaron reaccionar durante 10 minutos y se lavó con exceso de DCM/DMF (1:1). A continuación, se eliminó la solución, se le añadieron 490 ml de dimetilformamida (DMF), se agitó la mezcla durante 3 minutos y después se retiró el disolvente. Se añadieron 700 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20 %/DMF) al recipiente de reacción, se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se eliminó la solución. Se le añadió la misma cantidad de una solución desprotectora y la reacción se mantuvo durante 10 minutos. A continuación, se eliminó la solución y se lavó tres minutos cada una de dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF para preparar de este modo la resina Tyr(tBu)-CTC.

A otro reactor se añadieron 700 ml de una solución de DMF y a este se añadieron 200 mmol de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt y 200 mmoles de HBTu, seguido de disolución con agitación. El reactor se cargó con 400 mmol de DIEA en dos porciones y se agitó durante al menos 5 minutos hasta que todos los sólidos se disolvieron. La solución de la mezcla de aminoácidos disuelta se colocó en un recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se eliminó la solución de reacción y la mezcla se agitó con solución de DMF tres veces durante 5 minutos y a continuación se eliminó. Se extrajo una pequeña cantidad de la resina de reacción y se comprobó el grado de reacción mediante una prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). La resina Arg(Pbf)-Tyr(tBu)-CTC se preparó mediante la misma reacción de desprotección dos veces como se ha descrito anteriormente usando la solución de desprotección. Después de lavar a fondo con DMF y MC y realizar una vez más una prueba de Kaiser, se llevó a cabo el siguiente experimento de adhesión como se ha descrito anteriormente. Se secuenciaron Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH según la secuencia de aminoácidos seleccionada. El grupo protector de Fmoc se hizo reaccionar dos veces con la solución desprotectora durante 10 minutos, seguido de lavado para eliminar la solución. La resina peptídica se lavó tres veces con cada uno de DMF, MC y metanol, se secaron lentamente haciendo fluir aire con nitrógeno y después se secaron completamente al vacío a presión reducida en P₂O₅, seguido de la adición de 1.900 ml de una solución desodorante (ácido trifluoroacético 81,5 %, agua destilada 5,0 %, tioanisol 5,0 %, fenol 5,0 %, etanoditiol (EDT) 2,5 % y triisopropilsilano (TIS) 1,0 %). A continuación, la mezcla se agitó a temperatura ambiente y la reacción se mantuvo durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con una pequeña cantidad de solución de TFA y a continuación se combinó con el líquido madre. Se añadieron 2.090 ml del líquido madre combinado con éter frío para inducir la precipitación y el precipitado se recogió mediante centrifugación y se lavó dos veces con éter frío. El líquido madre se eliminó y se secó lo suficiente bajo nitrógeno para sintetizar 79,8 g del péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1 antes de la purificación (rendimiento: 97,0 %). El peso molecular fue de 822,9 (valor teórico: 822,9) cuando el peso molecular se midió usando un analizador de peso molecular.

Un péptido que consistía en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 se sintetizó de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Tabla 1

SEQ ID NO.	Listado de secuencias	Valor de análisis (analizador de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	KWGGGRY	822,9	822,9
2	ILGRWCG	803,9	803,9
3	GPVH	408,4	408,4
4	EDEFKPPAAGR	1216,3	1216,3

Ejemplo 1. Evaluación de la promoción de la proliferación de fibroblastos

Se sembraron fibroblastos de ratón NIH3T3 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían suero al 0,05 %. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, bFGF 100 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y se cultivaron durante 3 días.

- 5 A continuación, se realizó un tratamiento con solución de MTT 4 mg/ml y la reacción se llevó a cabo durante 4 horas. A continuación, el formazán resultante se disolvió mediante tratamiento con dimetilsulfóxido (denominado en lo sucesivo en el presente documento "DMSO") y se midió la absorbancia a 560 nm usando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en las FIGS. 1 a 4 y la tabla 2.

10

Tabla 2				
Proliferación de fibroblastos (%)				
FIG. 1	Control	SEQ ID NO: 1		bFGF (100 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	170	194	279
FIG. 2	Control	SEQ ID NO: 2		bFGF (100 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	188	253	400
FIG. 3	Control	SEQ ID NO: 3		bFGF (100 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	194	261	386
FIG. 4	Control	SEQ ID NO: 4		bFGF (100 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	114	193	386

Como se muestra en las FIGS. 1 a 4 y la tabla 2, se descubrió que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 promueve la proliferación de fibroblastos.

15

Ejemplo 2. Evaluación de la promoción de la proliferación de queratinocitos

Se sembraron queratinocitos humanos HaCaT en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían suero al 0,05 %. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, EGF 10 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y se cultivaron durante 3 días. A continuación, se realizó un tratamiento con solución de MTT 4 mg/ml y la reacción se llevó a cabo durante 4 horas. A continuación, el formazán resultante se disolvió mediante tratamiento con dimetilsulfóxido (denominado en lo sucesivo en el presente documento "DMSO") y se midió la absorbancia a 560 nm usando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en las FIGS. 5 a 8 y la tabla 3.

20

25

Tabla 3				
Proliferación de queratinocitos (%)				
FIG. 5	Control	SEQ ID NO: 1		EGF (10 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	120	136	142
FIG. 6	Control	SEQ ID NO: 2		EGF (10 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	111	119	152
FIG. 7	Control	SEQ ID NO: 3		EGF (10 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	183	197	187
FIG. 8	Control	SEQ ID NO: 4		EGF (10 nM)
		10 μ M	50 μ M	
	100	113	142	187

Ejemplo 3. Medición del nivel de fosforilación de MAPK y AKT

30

3-1. Fibroblastos

Se sembraron fibroblastos de ratón NIH3T3 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, bFGF 100 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y se cultivaron durante 30 minutos. A continuación, las células se recogieron para preparar el lisado celular. A continuación, se realizó transferencia Western utilizando P-MAPK (p-Erk, p-JNK, p-p38) y p-Akt o anticuerpo de actina (Santacruz

35

Biotechnology, EE. UU.). Los resultados de la comparación de los aspectos de fosforilación de los mismos se muestran en las FIGS. 9 a 12.

Como se muestra en las FIGS. 9 a 12, se descubrió que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 presenta efectos de promoción de la proliferación mediante la activación de MAPK (ERK, p38 y JNK) y AKT, es decir, factores de señalización implicados en la proliferación de fibroblastos.

3-2. Queratinocitos

Se sembraron queratinocitos humanos HaCaT en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, EGF 10 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 y se cultivaron durante 30 minutos. A continuación, las células se recogieron para preparar el lisado celular. A continuación, se realizó transferencia Western utilizando P-MAPK (p-Erk, p-JNK, p-p38) y anticuerpo p-Akt (Santacruz Biotechnology, EE. UU.). Los resultados de la comparación de los aspectos de fosforilación de los mismos se muestran en las FIGS. 13 a 14.

Como se muestra en las FIGS. 13 y 14, se descubrió que el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 presenta efectos de promoción de la proliferación mediante la activación de ERK y p38, es decir, factores de señalización implicados en la proliferación de queratinocitos humanos.

Ejemplo 4. RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina

Se sembraron fibroblastos de ratón NIH3T3 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %, seguido de cultivo durante 4 horas. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, IGF-1 100 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se cultivaron y recogieron para aislar el ARN. El ADNc se sintetizó utilizando un kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea) después de la cuantificación del ARN y la PCR se llevó a cabo utilizando cebadores de cada una de la premezcla de PCR (Intron, Corea) y colágeno 1a, fibronectina, elastina, GAPDH en la tabla 4. A continuación, las células se procesaron en gel de agarosa al 5 % y se compararon los grados de expresión de ARNm de los factores de crecimiento en cada condición de tratamiento con péptidos. Los resultados se muestran en las FIGS. 15 a 18.

Tabla 4

N.º de ID de secuencia	Cebador	Secuencia (5'-3')
5	Colágeno 1a_F	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC
6	Colágeno 1a_R	AGACGGCTGAGTAGGGAACA
7	Fibronectina_F	CCAGGAACCGAGTACACCAT
8	Fibronectina_R	ATACCCAGGTTGGGTGATGA
9	Elastina_F	GGACCCCTGACTCGCGACCT
10	Elastina_R	GGGGAGGTGGGACTGCCCAA
11	GAPDH_F	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG
12	GAPDH_R	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT

Como se muestra en las FIGS. 15 a 18, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 muestra efectos de aumento de la expresión de ARNm de colágeno, fibronectina y elastina como constituyentes de la MEC mediante la promoción de la actividad de los fibroblastos, respectivamente.

Ejemplo 5. RT-PCR de AQP3 (acuaporina 3) y SIRT1

Se sembraron queratinocitos humanos HaCaT en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %, seguido de cultivo durante 4 horas. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, EGF 100 nM y 10 μ M o 50 μ M del péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se cultivaron y recogieron para aislar el ARN. El ADNc se sintetizó utilizando un kit de síntesis de ADNc (Intron, Corea) después de la cuantificación del ARN y la PCR se llevó a cabo utilizando cebadores de cada una de la premezcla de PCR (Intron, Corea) y AQP3, SIRT1 y GAPDH en la tabla 5. A continuación, las células se procesaron en gel de agarosa al 5 % y se compararon los grados de expresión de ARNm de los factores de crecimiento en cada condición de tratamiento con péptidos. Los resultados se muestran en las FIGS. 19 a 21.

Tabla 5

N.º de ID de secuencia	Cebador	Secuencia (5'-3')
13	AQP3_F	CCTTCTTGGGTGCTGGAATA
14	AQP3_R	ACACGATAAGGGAGGCTCTG
15	SIRT1_F	TCAGTGGCTGGAACAGTGAG
16	SIRT1_R	TCTGGCATGTCCCACTATCA

Como se muestra en las FIGS. 19 a 21, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 muestra efectos de aumento de la expresión de AQP3, que es una proteína relacionada con la mejora de la barrera cutánea mediante la promoción de la activación de los queratinocitos.

Ejemplo 6. RT-PCR de colágeno 1a, fibronectina y elastina

Se sembraron fibroblastos de ratón NIH3T3 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios sin suero al 0,05 %. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, EGF 100 nM y el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 y se cultivaron durante 24 horas. A continuación, las células se fijaron durante 30 minutos usando paraformaldehído al 4 %. A continuación, después de lavar 3 veces, se hicieron reaccionar las células con Triton X-100 al 0,5 % durante 15 minutos y se lavaron de nuevo 3 veces. A continuación, se bloqueó la BSA al 3 % durante 1 hora y se hizo reaccionar el anticuerpo primario (1:100) para colágeno 1a, fibronectina y elastina durante una noche a 4 °C. A continuación, el anticuerpo secundario (1:500) se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, se tiñó con tinción DAPI y se realizó observación con un microscopio de fluorescencia. Los resultados de la misma se muestran en las FIGS. 22 a 27.

Como se muestra en las FIGS. 22 a 27, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 2 muestra efectos de aumento de la expresión de proteínas de colágeno, fibronectina y elastina como constituyentes de la MEC mediante la promoción de la actividad de los fibroblastos, respectivamente.

Ejemplo 7. ELISA de procolágeno 1a

Se sembraron fibroblastos de ratón NIH3T3 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. A continuación, los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %, seguido de cultivo durante 4 horas. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, IGF-1 100 nM y el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 y se cultivaron durante 72 horas. A continuación, se recogieron los medios. La cantidad en el medio se midió utilizando un kit de ELISA de procolágeno 1a (Usbiological Lifescience, EE. UU.). Los resultados se muestran en las FIGS. 28 a 31 y la tabla 6.

Tabla 6

Expresión de procolágeno 1a (%)				
FIG. 28	Control	SEQ ID NO: 1		IGF-1 (100 nM)
		10 µM	50 µM	
	100	98	157	140
FIG. 29	Control	SEQ ID NO: 2		IGF-1 (100 nM)
		10 µM	50 µM	
	100	145	146	140
FIG. 30	Control	SEQ ID NO: 3		IGF-1 (100 nM)
		10 µM	50 µM	
	100	138	143	113
FIG. 31	Control	SEQ ID NO: 4		IGF-1 (100 nM)
		10 µM	50 µM	
	100	122	141	113

Como se muestra en las FIGS. 28 a 31 y la tabla 6, tras el tratamiento con el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, se encontró que la expresión de la proteína pro-colágeno 1a aumenta en los fibroblastos.

Ejemplo 9. ELISA de HA

Se sembraron queratinocitos humanos HaCaT en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo y después se cultivaron durante una noche. Los medios se cambiaron a medios que contenían FBS al 0,05 %, seguido de cultivo durante 4 horas. A continuación, se realizó tratamiento con el control positivo, es decir, IGF-1 100 nM y el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y se cultivaron durante 72 horas. A continuación, se recogieron los medios. Se usó un kit de ELISA de HA (Echelon, EE. UU.) para medir una cantidad de

la misma. Los resultados del mismo se muestran en la FIG. 32 y la tabla 7.

Tabla 7

Expresión de HA (ng/ml)				
FIG. 32	Control	SEQ ID NO: 2	IGF-1	
		10 μ M	50 μ M	(100 nM)
	251	286	292	280

- 5 Como se muestra en la FIG. 32 y la tabla 7, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 muestra efectos de aumento de la expresión de HA, que es una proteína relacionada con la mejora de la barrera cutánea mediante la promoción de la activación de los queratinocitos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que tiene actividad de mejora del estado de la piel.
2. El péptido de la reivindicación 1, en donde la mejora del estado de la piel es la mejora de las arrugas, regeneración de la piel, mejora de la elasticidad de la piel, inhibición del envejecimiento de la piel, regeneración de heridas, mejora del acné o blanqueamiento de la piel.
- 10 3. Una composición para mejorar el estado de la piel que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde dicha composición es una composición cosmética o una composición alimenticia.
- 15 4. La composición de la reivindicación 3, en donde la mejora del estado de la piel es la mejora de las arrugas, regeneración de la piel, mejora de la elasticidad de la piel, inhibición del envejecimiento de la piel, regeneración de heridas, mejora del acné o blanqueamiento de la piel.
- 20 5. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento de dermatopatías que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
6. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la dermatopatía es psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis no alérgica o xerodermia.

FIG. 1

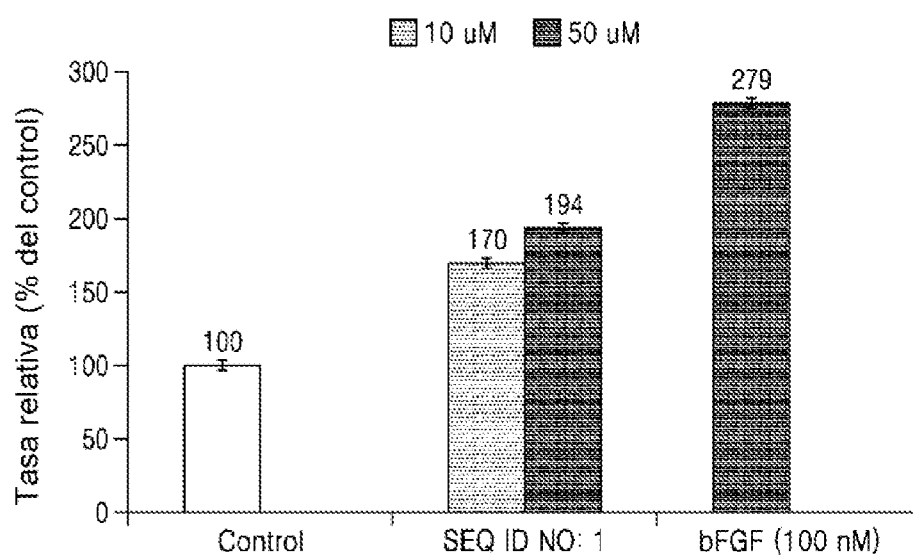


FIG. 2

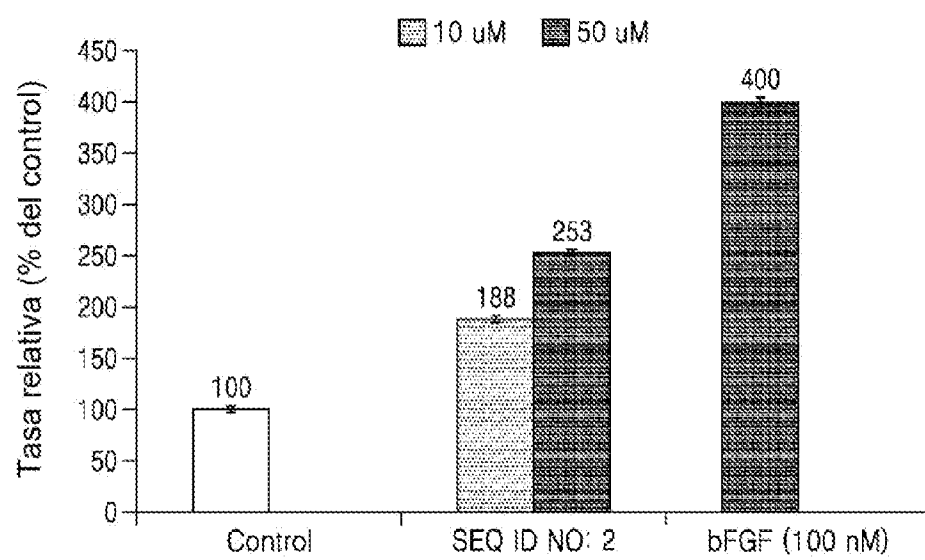


FIG. 3

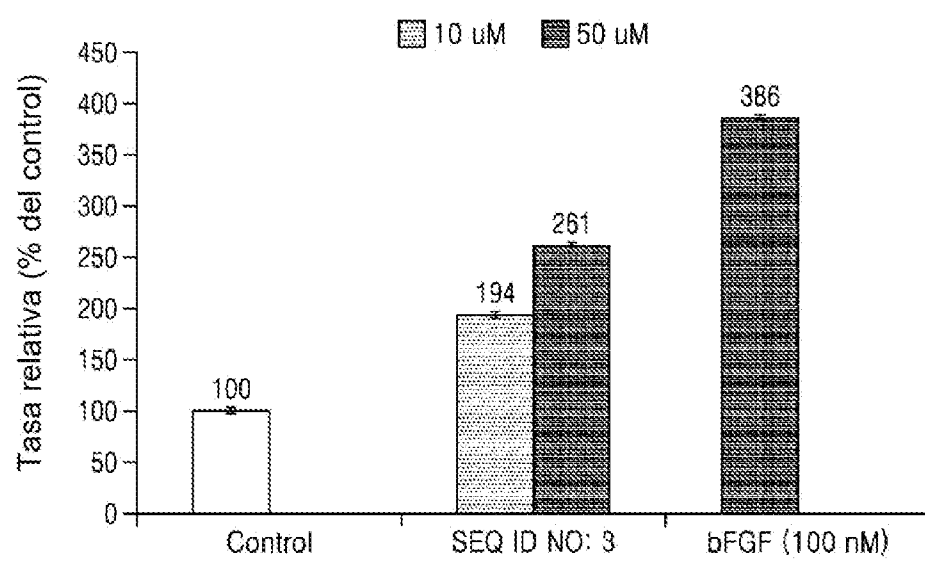


FIG. 4

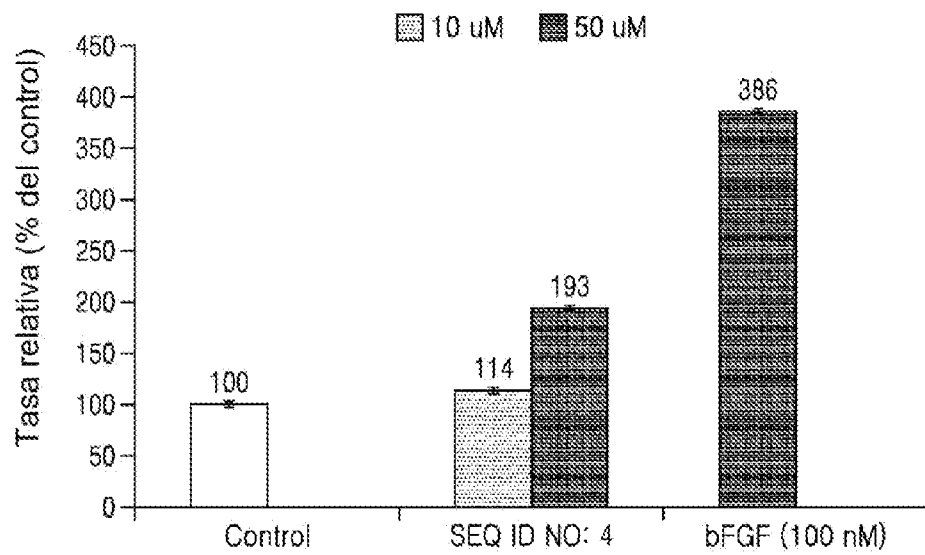


FIG. 5

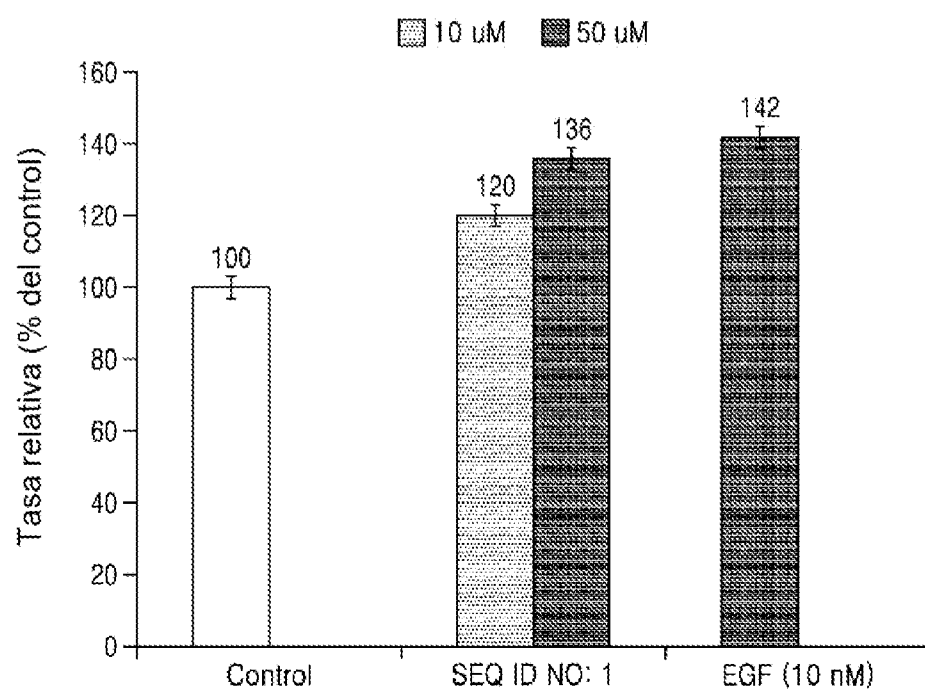


FIG. 6

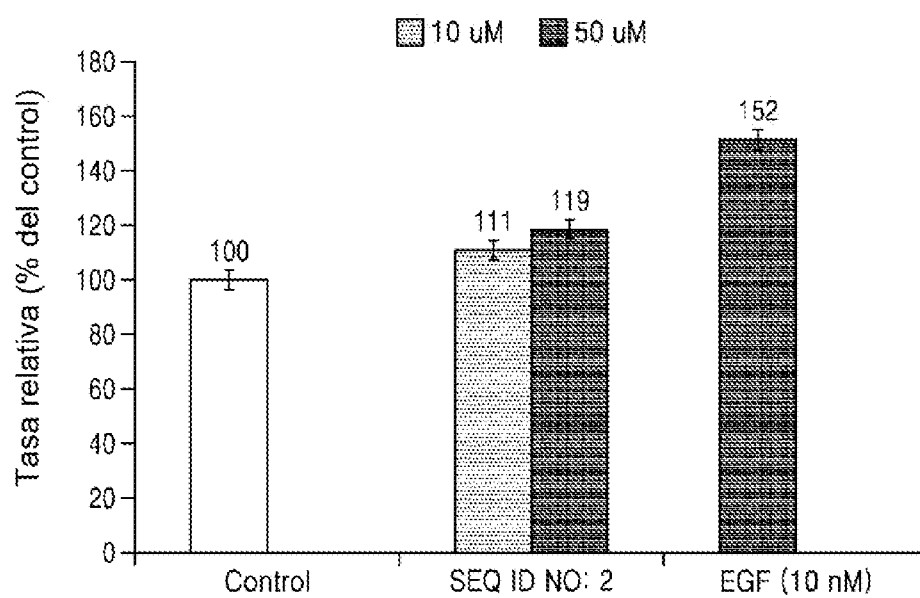


FIG. 7

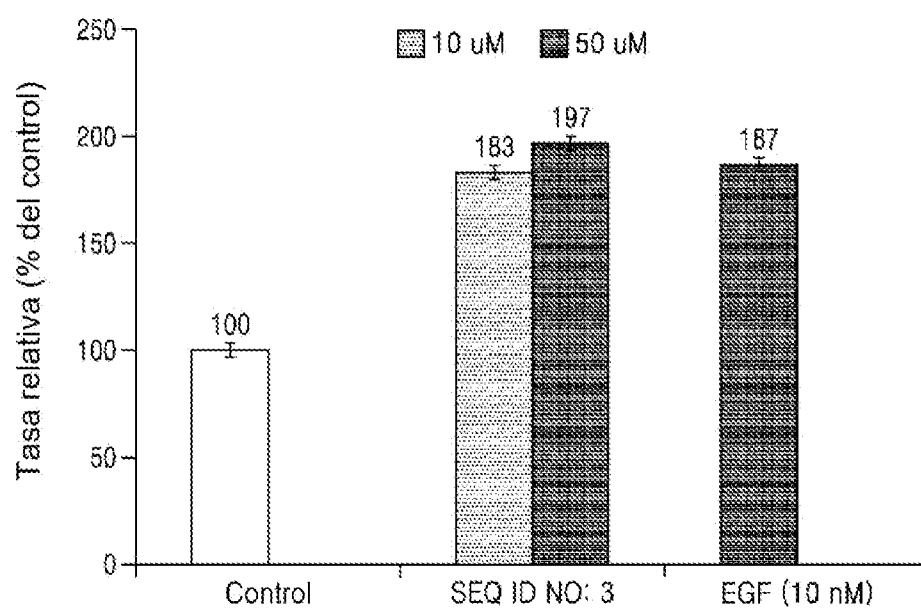


FIG. 8

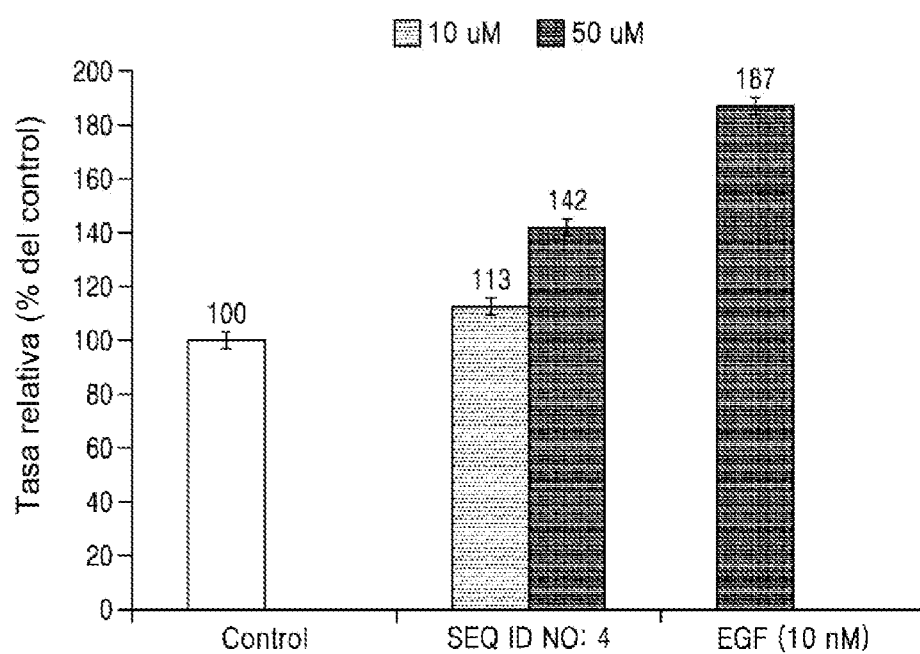


FIG. 9

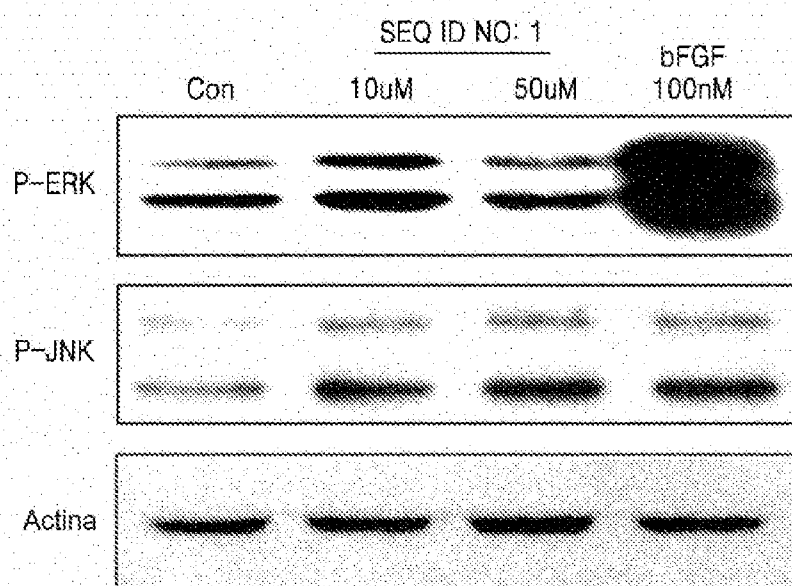


FIG. 10

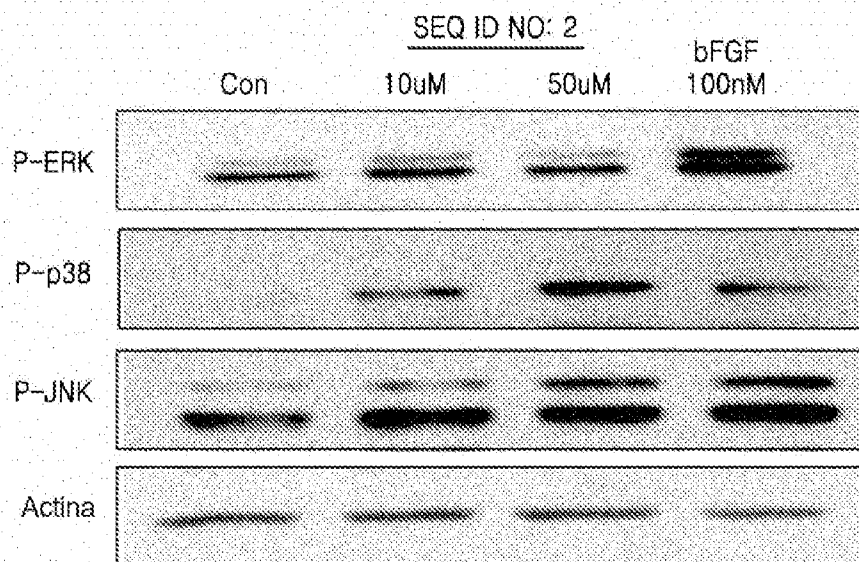


FIG. 11

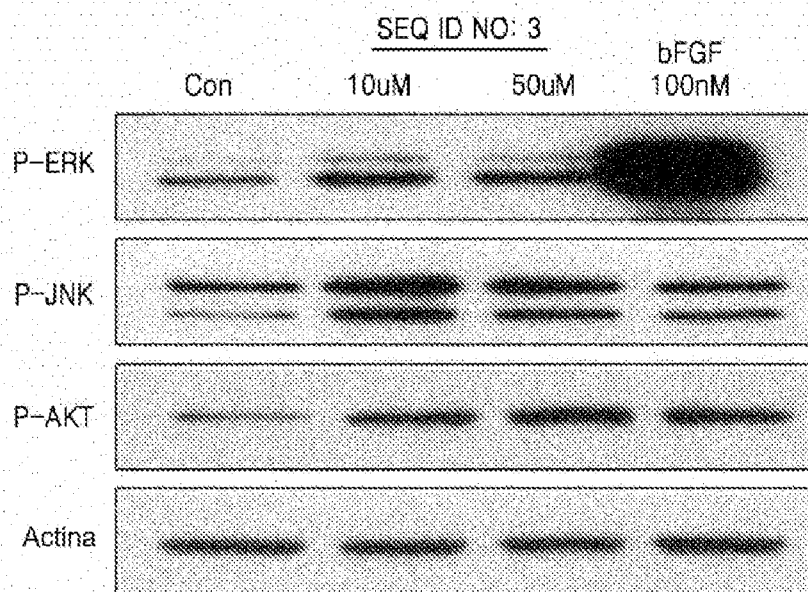


FIG. 12

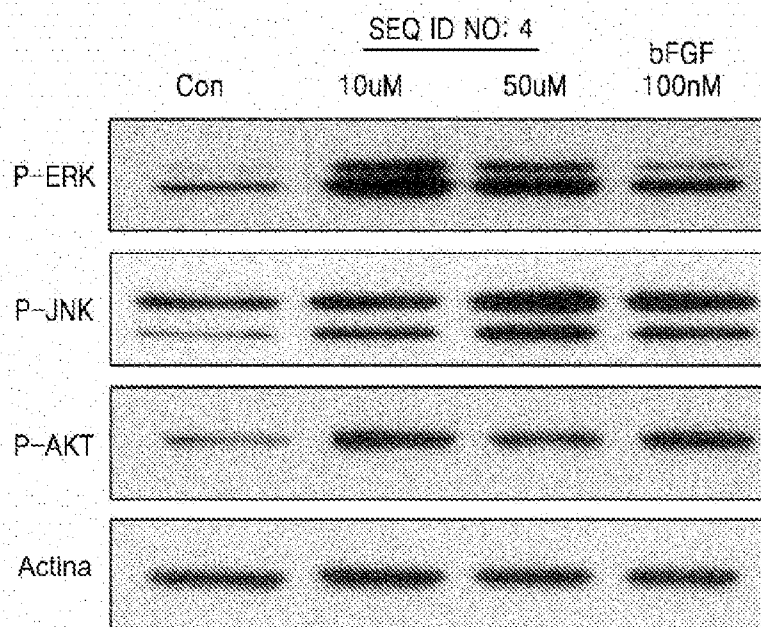


FIG. 13

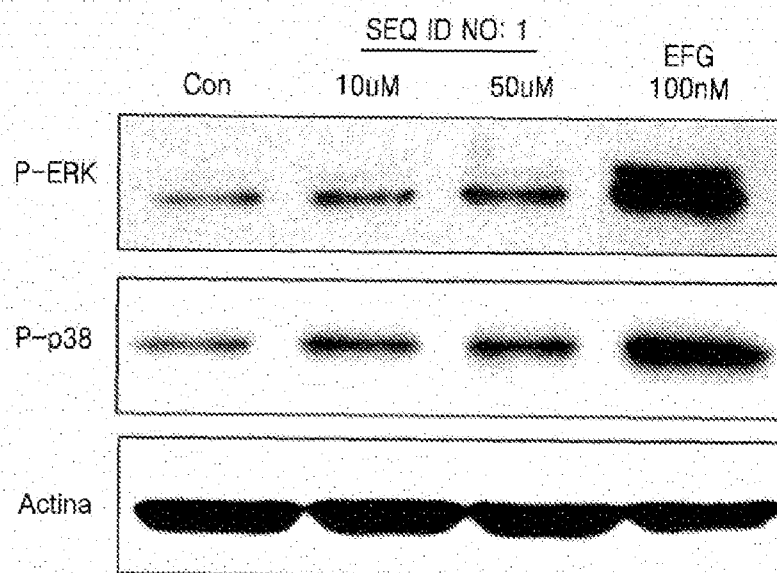


FIG. 14

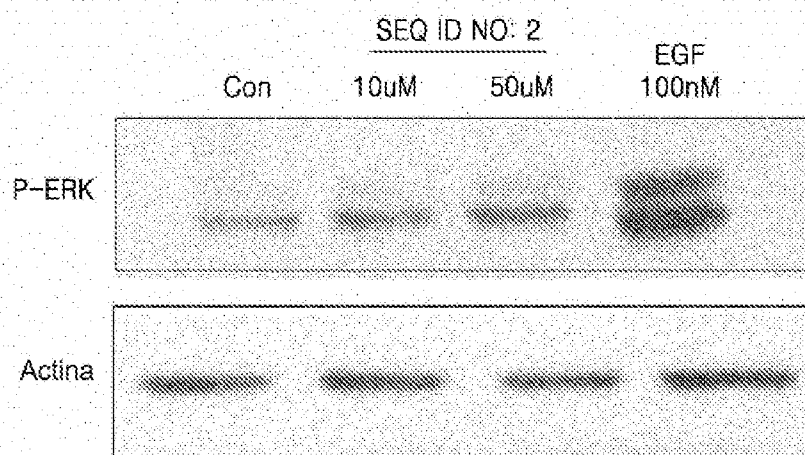


FIG. 15

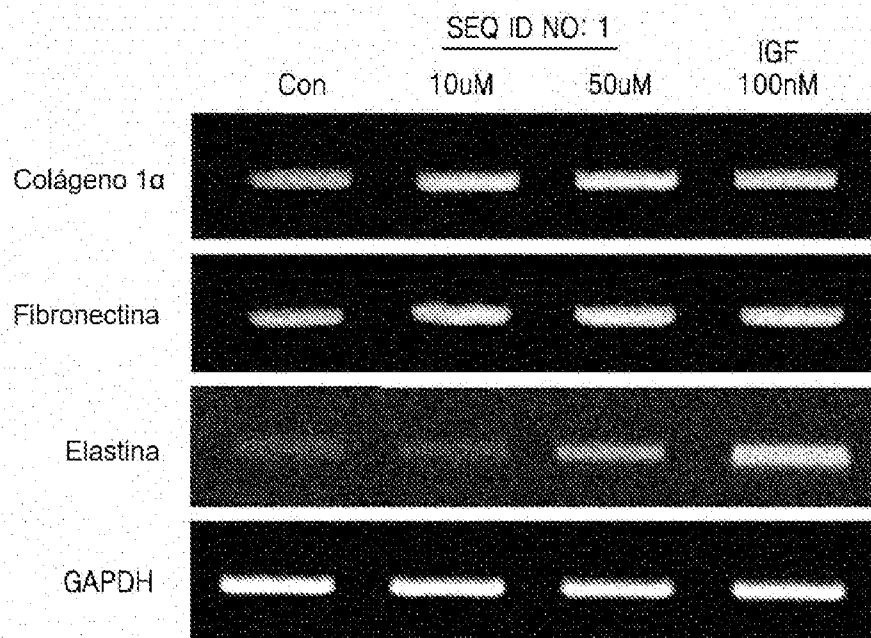


FIG. 16

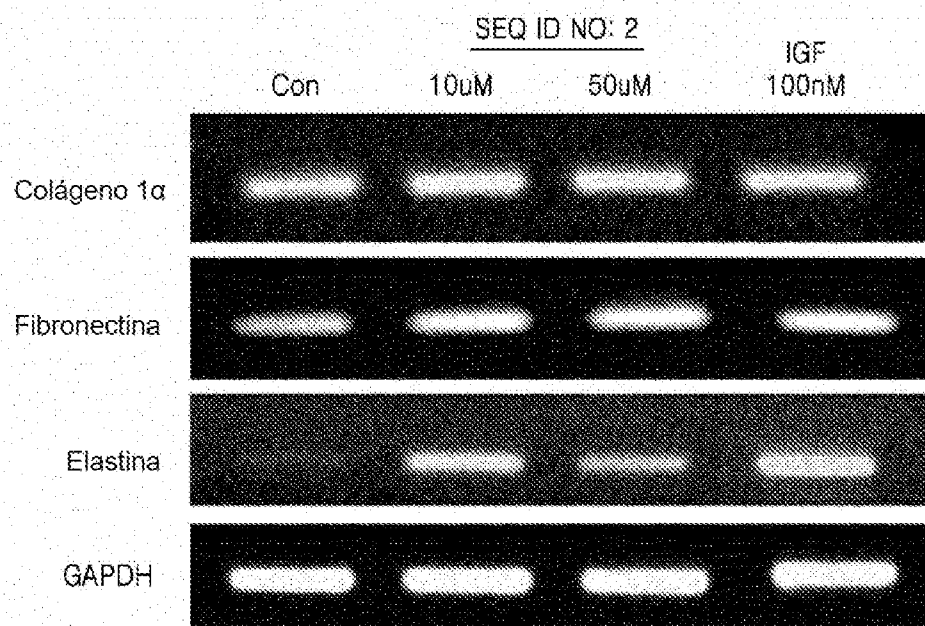


FIG. 17

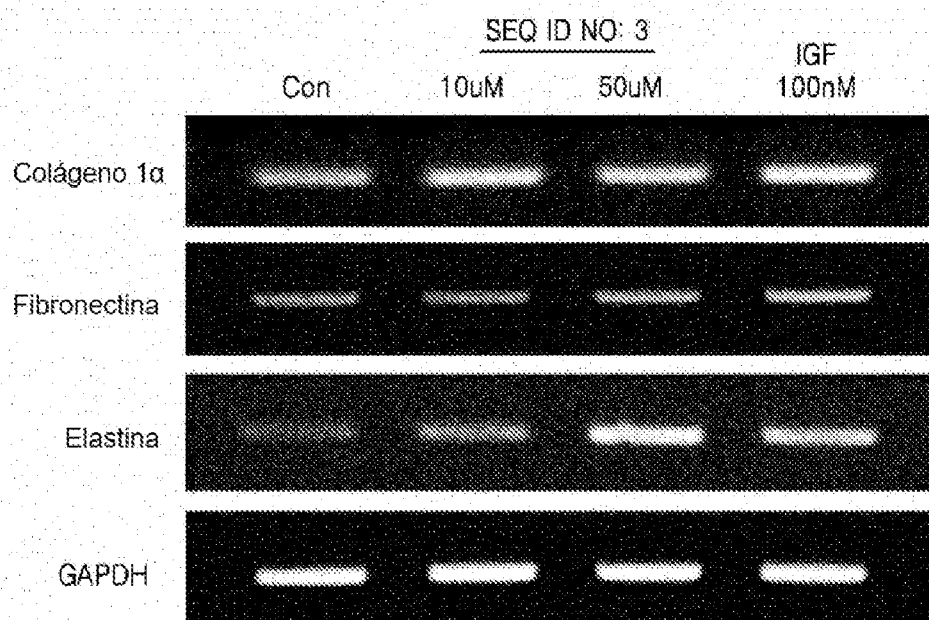


FIG. 18

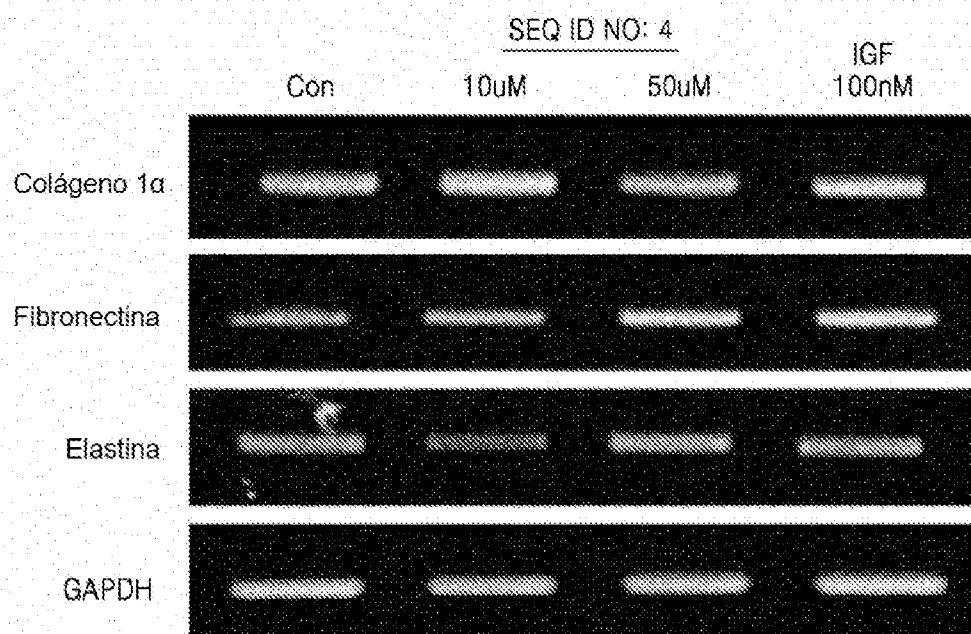


FIG. 19

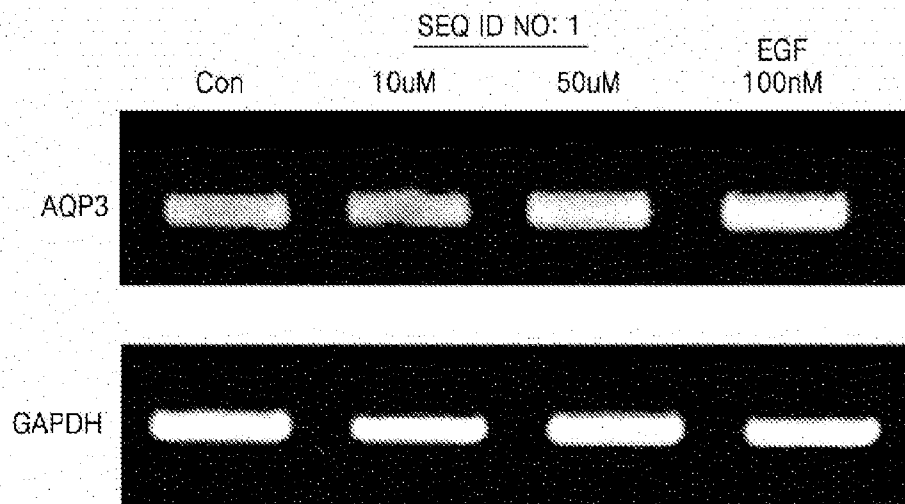


FIG. 20

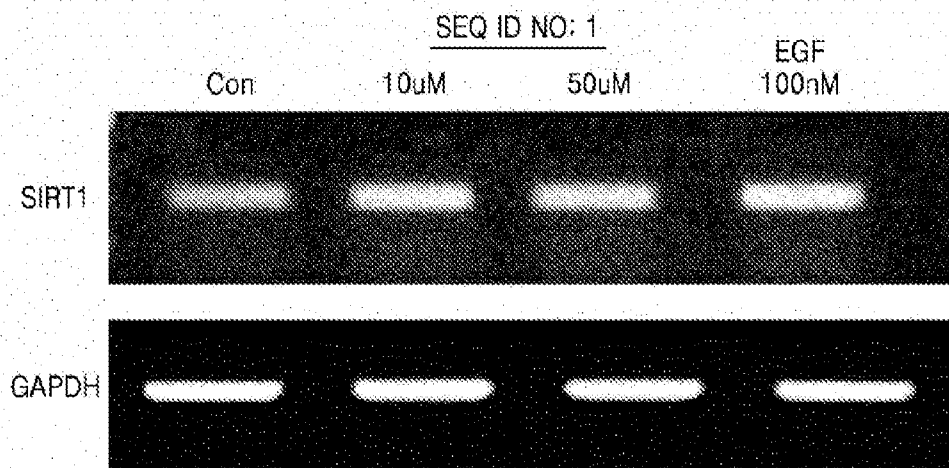


FIG. 21

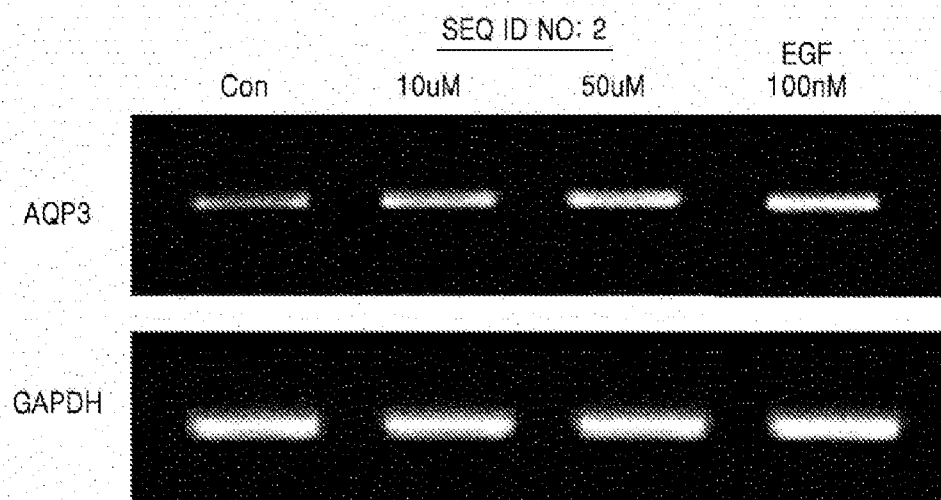


FIG. 22

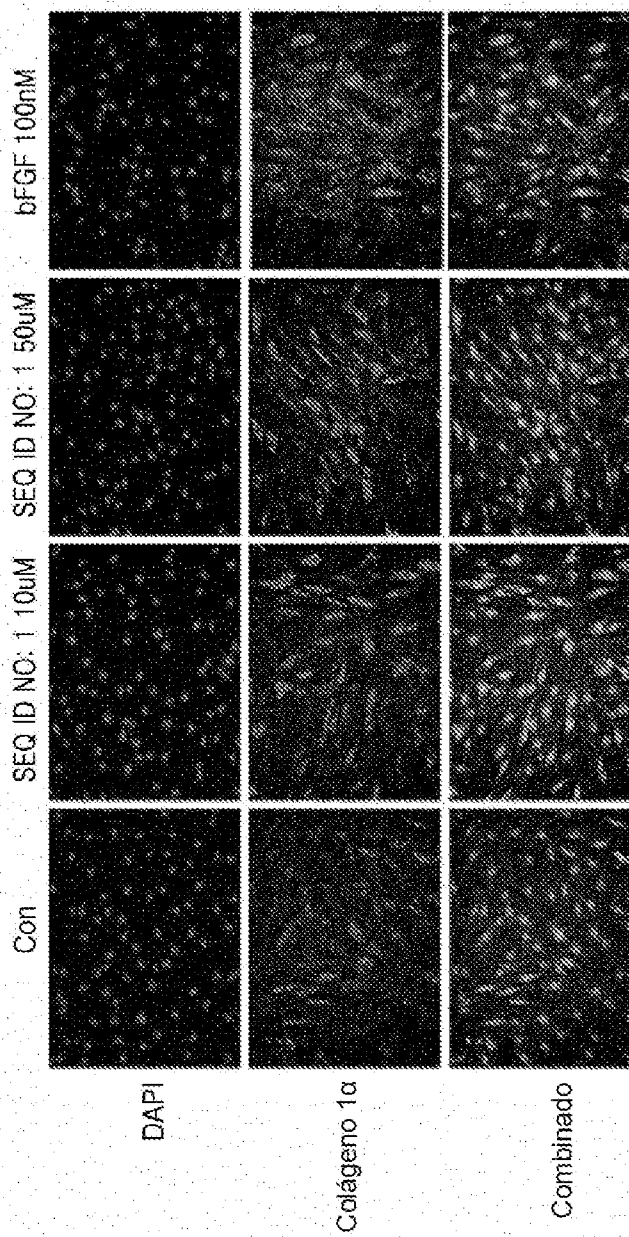


FIG. 23

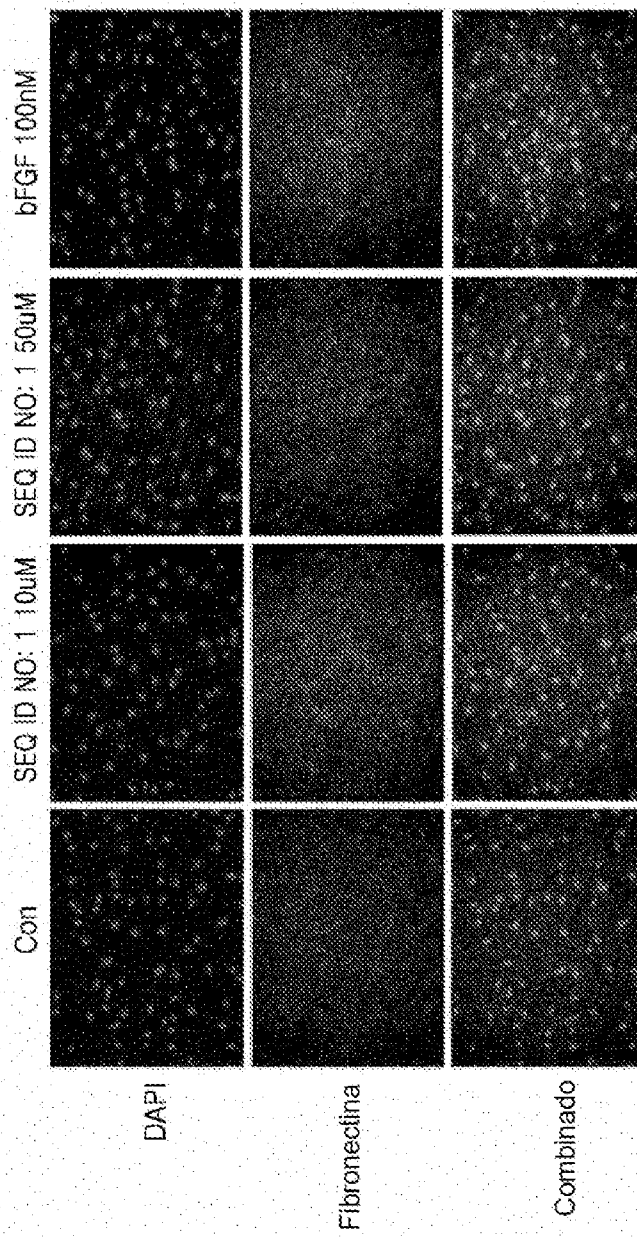


FIG. 24

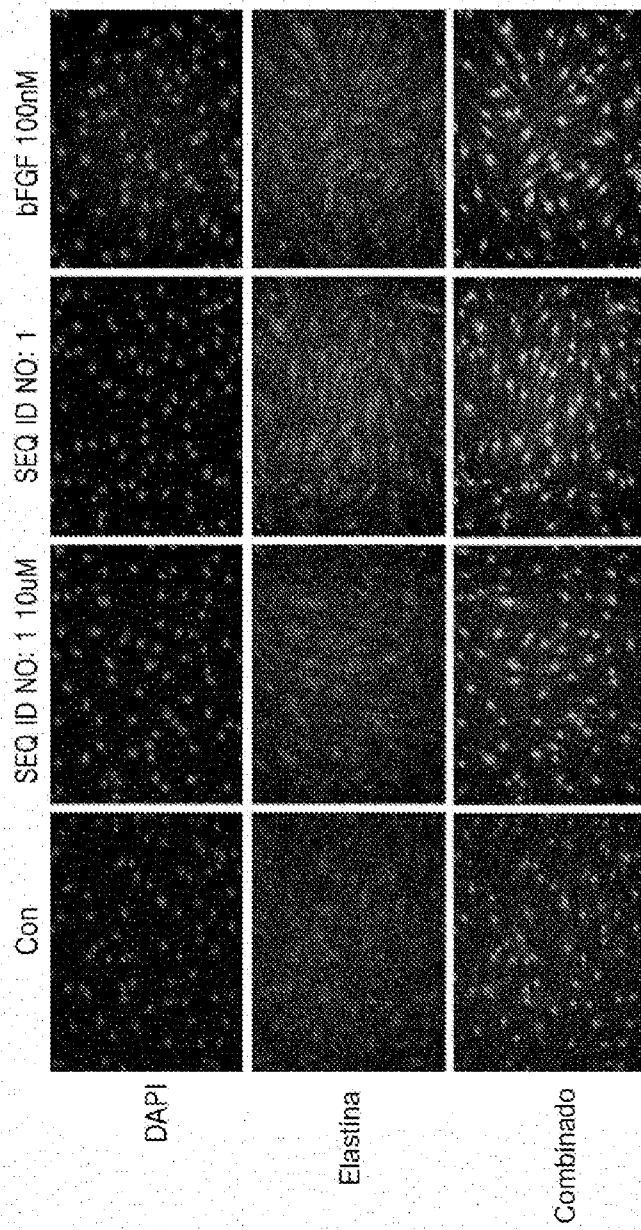


FIG. 25

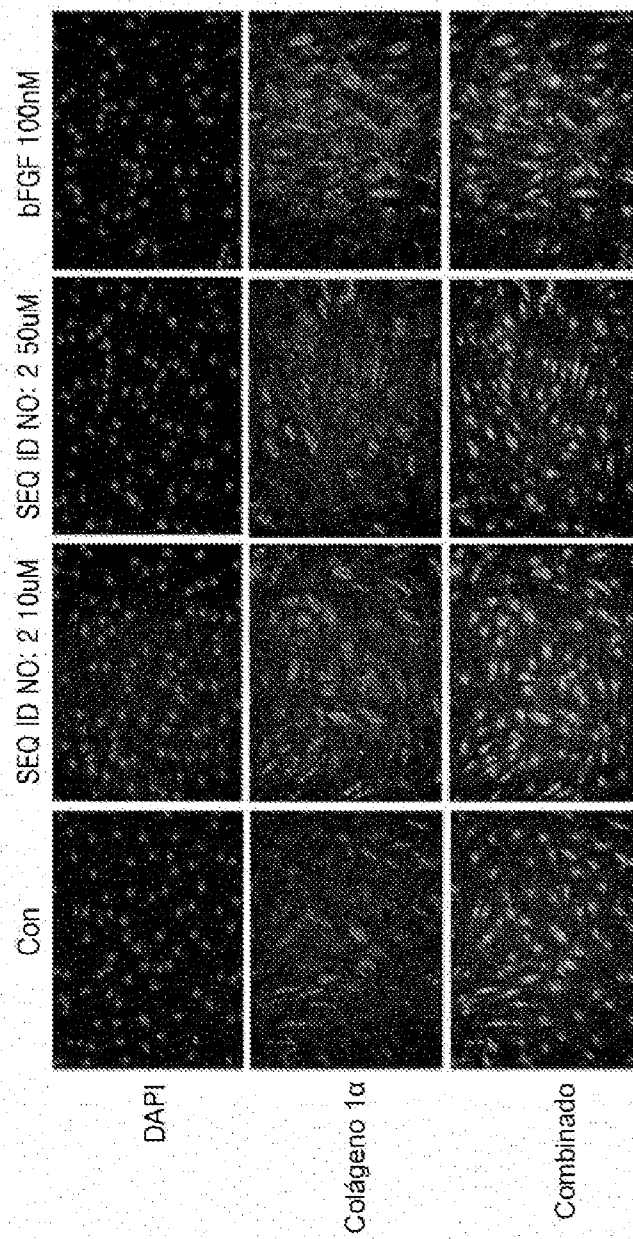


FIG. 26

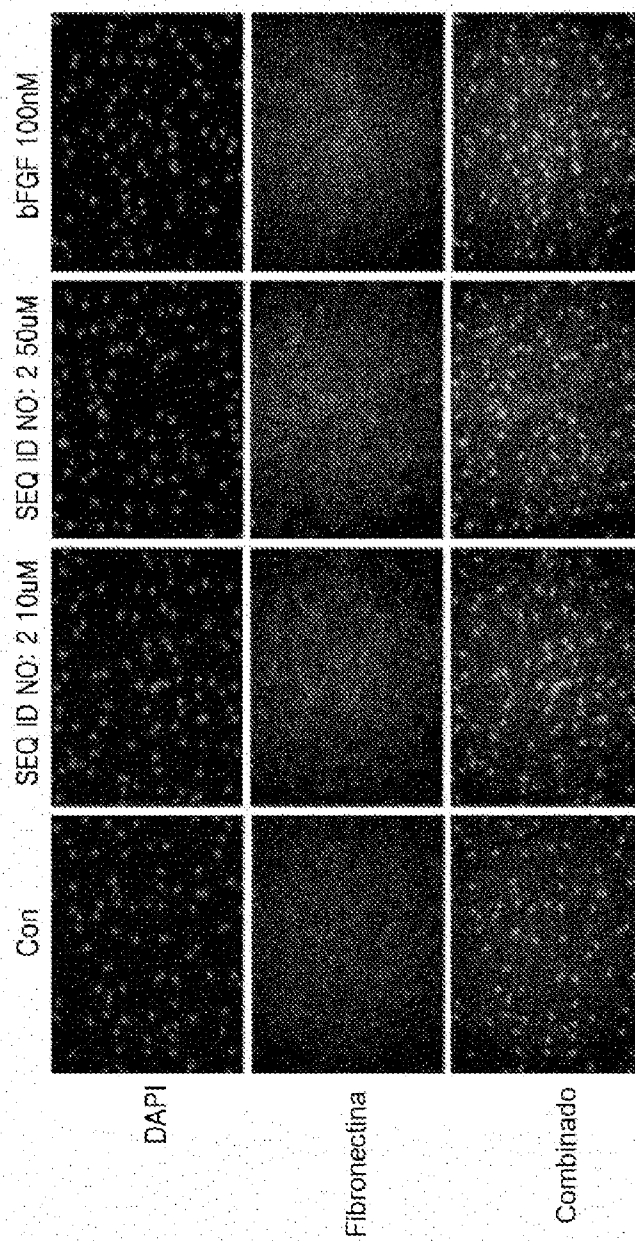


FIG. 27

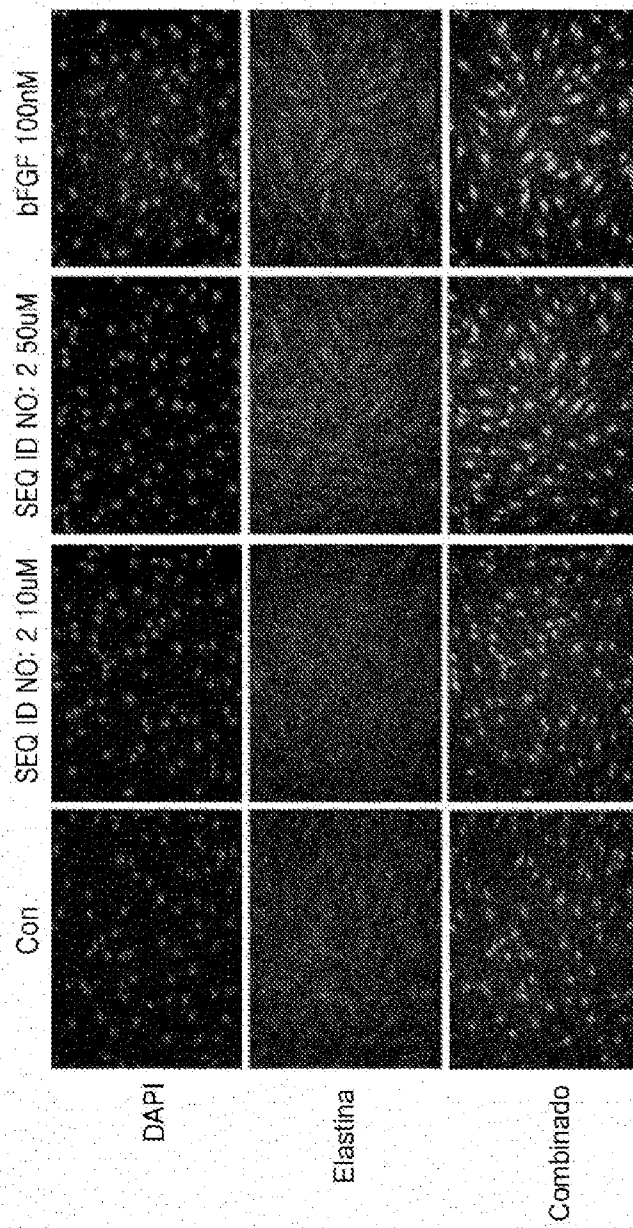


FIG. 28

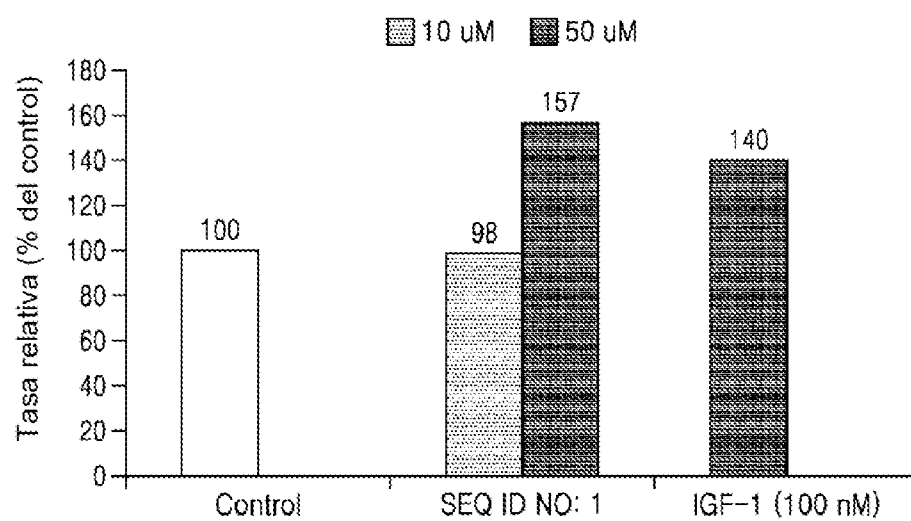


FIG. 29

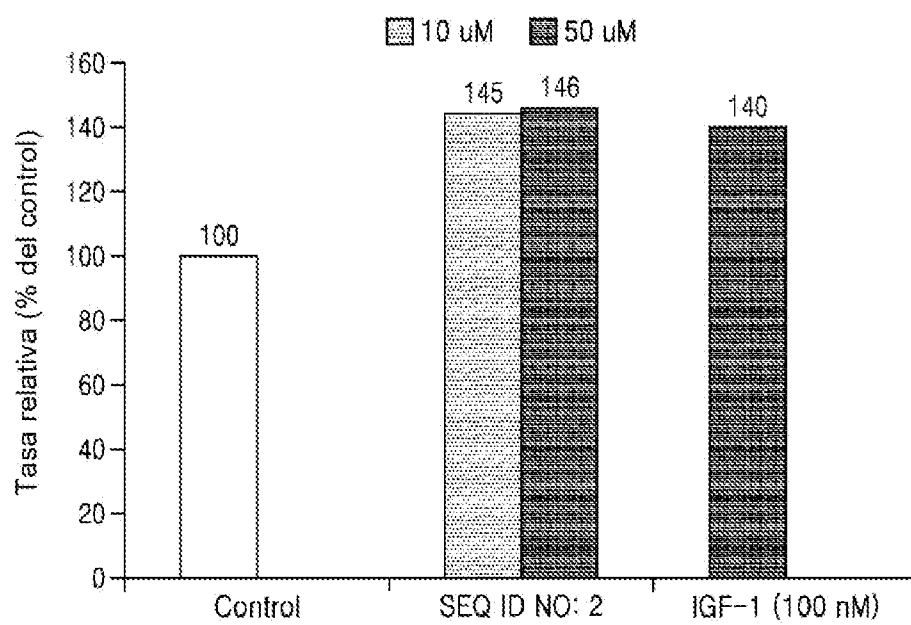


FIG. 30

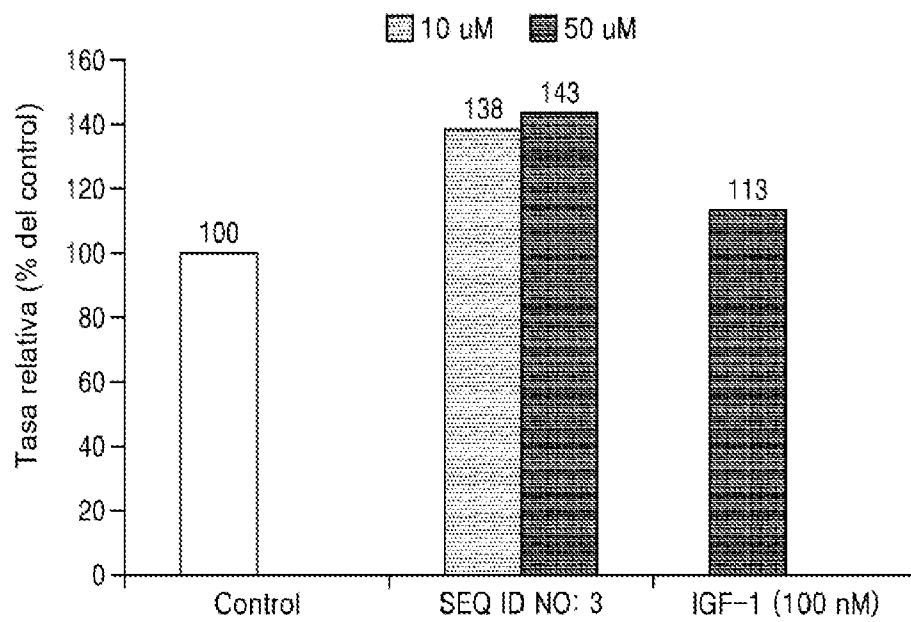


FIG. 31

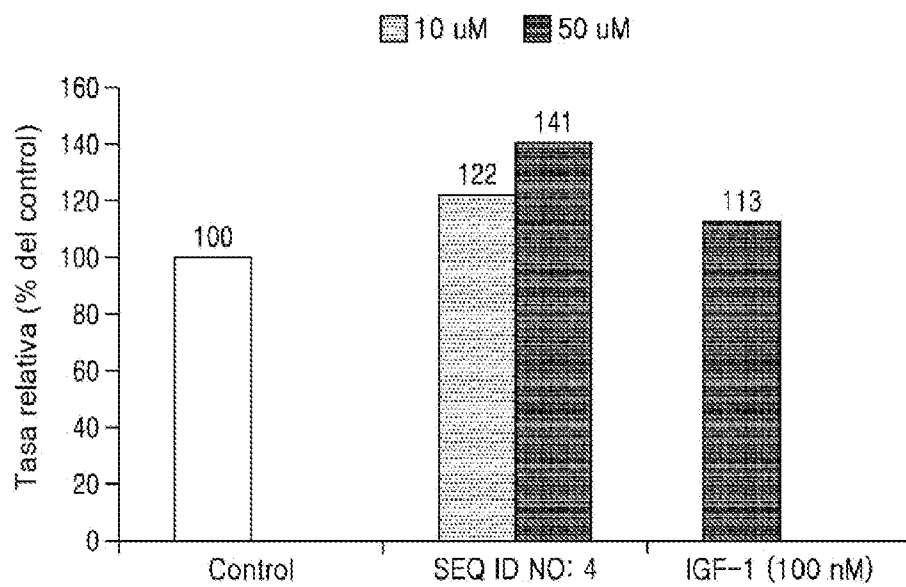


FIG. 32

