

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 076**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61P 5/24	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2014 PCT/KR2014/005508**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14204281**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2014 E 14814647 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3011967**

54 Título: **Regulador de la secreción hormonal, composición que lo contiene y procedimiento para controlar la secreción hormonal mediante su uso**

30 Prioridad:

21.06.2013 EP 13173219

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

25.02.2021

73 Titular/es:

**GEMVAX & KAEL CO., LTD. (50.0%)
58, Techno 11-ro, Yuseong-gu
Daejeon 34036, KR y
KIM, SANG JAE (50.0%)**

72 Inventor/es:

KIM, SANG JAE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 808 076 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

Regulador de la secreción hormonal, composición que lo contiene y procedimiento para controlar la secreción hormonal mediante su uso

Antecedentes

5 1. Campo

Una o más realizaciones de la presente invención se refieren a un modulador de la secreción hormonal que incluye un péptido procedente de la telomerasa, más en particular, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la secuencia de aminoácidos, o una composición farmacéutica que comprende el modulador de la secreción hormonal, para su uso en un procedimiento de tratamiento, alivio o prevención de enfermedades o síntomas como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

2. Descripción de la técnica relacionada

Las hormonas relacionadas con la generación, el desarrollo y el envejecimiento de los órganos reproductivos de los seres humanos se denominan hormonas sexuales y los ejemplos representativos de las hormonas sexuales incluyen la testosterona, el estrógeno, la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH).

La testosterona es una de las principales hormonas sexuales producidas en los cuerpos tanto de hombres como de mujeres. La testosterona se produce principalmente en células intersticiales (células de Leydig) de los testículos en los hombres y en los ovarios y la placenta en las mujeres. Además, se produce testosterona en la corteza suprarrenal tanto en hombres como en mujeres. Una de las funciones principales de la testosterona es el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, por ejemplo, aumento de masas de músculos, huesos y vello.

LH es una hormona glucoproteica compuesta por dos subunidades. Las subunidades alfa de LH son similares a las de FSH, gonadotropina coriónica humana (hCG) y hormona estimulante del tiroides (TSH). Las subunidades beta de LH son diferentes de las de otras hormonas glucoproteicas y proporcionan especificidad bioquímica a LH. La LH es secretada por la hipófisis anterior y, en los hombres, la LH se secreta después de reaccionar con la GnRH secretada por el hipotálamo. La LH también se conoce como hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH) y la secreción de LH está regulada por un equilibrio de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que incluyen un eje hipotalámico-hipofisario, órganos reproductivos, una hipófisis y hormonas esteroideas sexuales. LH y la otra gonadotropina hipofisaria y FSH, desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la función normal de los aparatos reproductores masculino y femenino.

La FSH es una hormona glucoproteica compuesta por dos subunidades. Las subunidades alfa de FSH son similares a las de LH, hCG y TSH. Las subunidades beta de FSH son diferentes de las de otras hormonas glucoproteicas y confieren especificidad bioquímica. La FSH es secretada por la hipófisis anterior en respuesta a la GnRH secretada por el hipotálamo. Tanto en hombres como en mujeres, la secreción de FSH está regulada por un equilibrio de mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que implican el eje hipotalámico hipofisario, los órganos reproductivos y las hormonas esteroideas sexuales e hipofisarias. FSH y LH y la otra gonadotropina hipofisaria desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la función normal de los aparatos reproductores masculino y femenino.

El estrógeno es una hormona esteroidea femenina, que se produce principalmente en los ovarios, y se produce una pequeña cantidad de estrógeno en la corteza suprarrenal, la placenta y los testículos masculinos. El estrógeno ayuda a controlar y guiar el crecimiento sexual, incluyendo los cambios físicos asociados con la pubertad. También influye en la evolución de la ovulación en el ciclo menstrual mensual, la lactancia después del embarazo, aspectos del estado de ánimo y el proceso de envejecimiento. La producción de estrógeno cambia de manera natural a lo largo de la vida de la mujer, alcanzando niveles adultos con el inicio de la pubertad (menarquia) y disminuyendo en la mediana edad hasta el inicio de la menopausia. La deficiencia de estrógenos puede conducir a la falta de menstruación (amenorrea), dificultades persistentes asociadas con la menopausia (tales como cambios de humor y sequedad vaginal) y osteoporosis en la edad avanzada. En casos de deficiencia de estrógenos, se pueden recetar preparaciones de estrógenos naturales y sintéticas. El estrógeno también es un componente de muchos anticonceptivos orales. Un exceso de estrógenos en los hombres provoca el desarrollo de caracteres sexuales secundarios femeninos (feminización), tales como agrandamiento del tejido mamario.

Las hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH) (gonadoliberina) son una familia de péptidos que desempeñan un papel fundamental en la reproducción. La función principal de la GnRH es actuar sobre la hipófisis para estimular la síntesis y secreción de hormonas luteinizantes y foliculoestimulantes, pero GnRH también actúa en el cerebro, la retina, el sistema nervioso simpático, las gónadas y la placenta en determinadas especies. Parece que hay al menos tres formas de GnRH. La segunda forma se expresa en el mesencéfalo y parece estar muy extendida. La tercera forma se ha encontrado hasta ahora solo en peces. GnRH es un decapeptido amidado C-terminal procesado a partir de una proteína precursora mayor. Cuatro de los diez restos están perfectamente conservados en todas las especies en las que se ha secuenciado GnRH.

Técnica anterior

[Patentes]

US 20020042401 A1
US 20120277290 A1

5 **[No patentes]**

Christoph Eisenegger y col., Trends in Cognitive Sciences junio 2011, vol. 15, n.º 6.

Sumario

10 Según una o más realizaciones de la presente invención, se proporciona un modulador de la secreción hormonal que comprende un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos para su uso en un procedimiento de tratamiento, alivio o prevención de enfermedades o síntomas relacionados con los niveles de hormonas sexuales que inducen síntomas de enfermedades o niveles de hormonas sexuales que afectan a las enfermedades o la progresión de las enfermedades, en el que las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, miomas uterinos, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños y una combinación de las mismas, en el que el péptido actúa como un agonista de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH).

20 Según una realización, la hormona sexual se selecciona del grupo que consiste en la testosterona, el estrógeno, la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la GnRH y una combinación de las mismas. Según una realización, el estrógeno es estrona, estradiol o estriol. Según una realización, la hormona sexual es la GnRH.

Según una realización, el péptido consiste en la SEQ ID NO: 1.

25 Según una o más realizaciones de la presente invención, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento, alivio o prevención de enfermedades o síntomas relacionados con los niveles de hormonas sexuales que inducen síntomas de enfermedades o niveles de hormonas sexuales que afectan a las enfermedades o la progresión de las enfermedades, en el que la composición comprende el modulador de la secreción hormonal definido en una cualquiera de las realizaciones anteriores y un aditivo farmacéuticamente aceptable, en el que las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, mioma uterino, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños y una combinación de las mismas, en el que el péptido actúa como un agonista de GnRH.

30 Según una realización, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante.

Según una realización, el adyuvante es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

Aplicabilidad industrial

35 Se demostró que un regulador de la secreción hormonal para el uso según una realización de la presente invención no tiene efectos secundarios o tiene efectos secundarios insignificantes. En consecuencia, el regulador de la secreción hormonal según una realización de la presente invención puede usarse como un agonista de GnRH de acuerdo con las reivindicaciones para 1) un tratamiento antineoplásico de cáncer sensible a hormonas, tal como cáncer de mama, 2) tratamiento de la interrupción de la producción de estrógenos en las mujeres, tal como menorragia, endometriosis, miomas uterinos y quistes fibróticos uterinos, 3) tratamiento de la infertilidad en mujeres y hombres y 4) tratamiento de la pubertad precoz en niños.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La fig. 1 es un gráfico que muestra el ciclo de modulación hormonal de la testosterona, el estrógeno, FSH, LH y GnRH en órganos reproductivos de hombres y mujeres;

La fig. 2 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de testosterona en la sangre de ratones machos en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

45 La fig. 3 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de testosterona en la sangre de ratones hembras en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

La fig. 4 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de estradiol (E2) en la sangre de ratones machos en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

50 La fig. 5 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de estradiol (E2) en la sangre de ratones hembras en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

La fig. 6 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de FSH en la sangre de ratones machos en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

La fig. 7 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de FSH en la sangre de ratones hembras en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

La fig. 8 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de LH en la sangre de ratones machos en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

La fig. 9 es un gráfico que muestra los cambios en las concentraciones de LH en la sangre de ratones hembras en los que se administró PEP-1 repetidas veces, según el tiempo;

Las figs. 10 y 11 son gráficos que muestran niveles relativos de expresiones de ARNm de GnRH en ratones machos y hembras después de la administración de PEP-1;

La fig. 12 es un gráfico que muestra los niveles de proliferación celular en líneas celulares mesenquimatosas (WPMY-1) de modelos animales de hiperplasia prostática benigna tratados con PEP-1 (GV1001); y

La fig. 13 es un gráfico que muestra los niveles de proliferación celular en líneas celulares epiteliales (RWPE-1) de modelos animales de hiperplasia prostática benigna tratados con PEP-1 (GV1001).

Descripción detallada

Según una realización de la presente invención, se proporciona un péptido para la modulación de la secreción hormonal, comprendiendo el péptido una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento peptídico de la misma para el uso expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

Los péptidos desvelados en el presente documento pueden incluir un péptido que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos por encima del 80 %, por encima del 85 %, por encima del 90 %, por encima del 95 %, por encima del 96 %, por encima del 97 %, por encima del 98 % o por encima del 99 %. Por otro lado, los péptidos desvelados en la presente invención pueden incluir un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o sus fragmentos y un péptido con 1 aminoácido transformado/sustituido, 2 aminoácidos transformados/sustituidos o 3 aminoácidos transformados/sustituidos.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "homología" e "identidad de secuencia" se pueden usar indistintamente para indicar la superposición entre dos aminoácidos (o, de manera similar, ácidos nucleicos) en una secuencia.

A menos que se use una expresión diferente para "identidad de secuencia" de un péptido o un ácido nucleico, la identidad de secuencia se calcula usando $(nref-ndif) * 100/nref$, en la que, cuando dos secuencias están alineadas para obtener el mayor número de coincidencias, ndif representa un número total de restos no idénticos entre las dos secuencias y nref representa un número total de restos de una secuencia más corta entre las dos secuencias. Por ejemplo, una identidad de secuencia entre agtgcagc y aatcaatc calculada a partir de la fórmula anterior es del 75 % ($nref = 8$, $ndif = 2$).

Según un aspecto de la presente invención, la identidad de secuencia se determinó mediante procedimientos convencionales descritos a continuación. Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, utilizando el algoritmo CLUSTAL W de Thompson y col., 1994, Nucleic Acids Res 22: 467380, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group). También se puede utilizar el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990, Mol. Biol. 215: 403-10) para el que se puede obtener software a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Al usar cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, los parámetros predeterminados para la longitud de "Ventana", penalización por hueco, etc.

Según una realización de la presente invención, los cambios en una secuencia de aminoácidos pertenecen a la modificación de las características físicas y químicas del péptido. Por ejemplo, se puede realizar transformación de aminoácidos mejorando la estabilidad térmica del péptido, alterando la especificidad del sustrato y cambiando el pH óptimo.

Además, el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o el fragmento de la misma tiene baja toxicidad en las células y, por tanto, tiene alta seguridad *in vivo*.

SEQ 1: EARPALLTSRLRFIPK

Según otra realización de la presente invención, se proporciona un modulador de la secreción hormonal que incluye un péptido, que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma para el uso expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

Según una realización de la presente invención, la hormona es una hormona sexual, que puede seleccionarse del grupo que consiste en testosterona, estrógeno, FSH, LH, GnRH y una combinación de las mismas.

Según una realización de la presente invención, la hormona es testosterona.

La testosterona (4-androsteno-17 β -ol-3-ona) es una hormona esteroidea C19, que es un andrógeno importante para los hombres. La testosterona es modulada por LH, que es una hormona de la hipófisis. La LH es secretada por una

hipófisis anterior y actúa directamente sobre células intersticiales de los testículos para modular la producción de testosterona. La testosterona estimula la maduración de los órganos reproductivos externos, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y el crecimiento de vello en la cara, las axilas y las regiones genitales.

5 En el sistema circulatorio, la medición de los niveles de LH y testosterona son útiles para la identificación del hipogonadismo. Las bajas concentraciones de testosterona están provocadas por hipogonadismo, disfunción testicular, niveles elevados de prolactina, disfunción hipofisaria o enfermedades renales o hepáticas. Las mujeres tienen niveles mucho menores de testosterona que los hombres y los niveles altos de testosterona en las mujeres pueden provocar síndrome de ovario poliquístico e hiperplasia suprarrenal. El exceso de testosterona puede provocar infertilidad, hirsutismo, amenorrea u obesidad.

10 La testosterona se une fuertemente a proteínas plasmáticas tales como las globulinas de unión a hormonas sexuales (SHBG) y globulinas de unión a testosterona-estradiol (TeBG) y se une débilmente a globulinas de unión a cortisol (CBG) y albúmina. Solo menos del 2,5 % de la testosterona circula libremente en el cuerpo.

En una realización de la presente invención, la hormona es estrógeno, que puede ser estrona (E1), estradiol (E2) o estriol (E3).

15 Tres estrógenos primarios producidos de manera natural en las mujeres son estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3). El estradiol es el estrógeno predominante durante los años reproductivos, tanto con respecto a los niveles absolutos en suero como con respecto a la actividad estrogénica. Se usa medición de estradiol (E2) para evaluar la función ovárica y tiene un uso importante en la supervisión del desarrollo del folículo en el protocolo de reproducción asistida. E2 promueve el crecimiento de los órganos reproductivos femeninos, estimula la caracterización sexual secundaria, además de tener un papel esencial en el ciclo menstrual. Habitualmente, en mujeres que no están embarazadas, el estradiol es secretado principalmente por la interacción entre las células de la teca y la granulosa durante el desarrollo del folículo y el cuerpo lúteo. Durante el embarazo, la placenta se convierte en el sitio principal de secreción de estradiol. Dentro del estradiol secretado en la sangre, 1-3 % existe libremente sin unirse a ninguna proteína, aproximadamente 40 % existe en forma unida a la globulina (SHBG) y el resto existe en una forma unida a la albúmina. La función principal del estradiol es estimular el crecimiento de los órganos reproductivos femeninos y desarrollar caracteres sexuales secundarios.

20 El estradiol (E2) es necesario en los ciclos menstruales femeninos. En el comienzo de la producción de folículos, el estradiol (E2) se mantiene a un nivel bajo. Después de aproximadamente 7 días, la maduración de los folículos está modulada por el nivel de estradiol (E2) y el nivel de estradiol (E2) aumenta. Un mayor nivel de estradiol (E2) induce un fuerte aumento en el nivel de LH y un nivel suprimido de FSH. Se produce ovulación normal después de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 12 horas después del máximo del nivel de LH y de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas después del nivel máximo de estradiol (E2). Durante una fase lútea, el nivel de estradiol (E2) aumenta y alcanza su pico (el nivel máximo) 8 días después de la ovulación. Dicho aumento del nivel de estradiol (E2) representa la regresión del cuerpo lúteo. Cuando no se implanta un óvulo fertilizado, el nivel de estradiol (E2) disminuye, lo que actúa como una señal para el inicio de la siguiente fase.

35 El nombre 'prueba de estradiol-6' procede de una respuesta de antígeno-anticuerpo que se produce en un sexto sitio de unión de estradiol (E2), que muestra buena especificidad de prueba, y los resultados de la prueba pueden usarse de diversas maneras.

40 Según una realización de la presente invención, la hormona es la FSH. La FSH es una hormona glucoproteica compuesta de una subunidad α similar a LH, TSH, hCG y subunidad β que expresa las características bioquímicas de FSH y, junto con LH, tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones normales de los aparatos reproductores tanto en hombres como en mujeres. La FSH se libera de la hipófisis anterior estimulada por la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo. Tanto en hombres como en mujeres, la FSH mantiene la homeostasis mediante mecanismos de retroalimentación relacionados con la ruta hipotálamo-hipofisaria, órganos reproductivos, hipófisis, hormonas sexuales, etc.

45 Los sitios de acción de la FSH son como se muestran a continuación en hombres y mujeres, respectivamente.

Tabla 1.

Sexo	Sitio de acción	Acción
Mujer	Folículos ováricos	Estimulación de la producción de estradiol y estrógenos y desarrollo folicular durante un ciclo menstrual Estimulación de la ovulación con LH
Hombre	Células de Sertoli (en túbulos seminíferos de los testículos)	Estimulación de la espermatogénesis

50 Un mayor nivel de FSH representa la menopausia en las mujeres y el hipogonadismo primario en hombres y mujeres. Una disminución del nivel de FSH está relacionada con el hipogonadismo primario. En mujeres que padecen síndrome de ovario poliquístico, el nivel de FSH es normal o disminuido.

En una realización de la presente invención, la hormona es la LH.

5 La hormona luteinizante (LH) es una hormona glucoproteica con dos subunidades. Se compone de una subunidad α similar a FSH, TSH, hCG y la subunidad β que expresa las características bioquímicas de LH que son diferentes de otras hormonas glucoproteicas. La LH se libera de la hipófisis anterior estimulada por la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo. En hombres, la LH se denomina en ocasiones hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH). Tanto en hombres como en mujeres, los niveles de LH se controlan mediante mecanismos de retroalimentación relacionados con la ruta hipotálamo-hipofisaria, órganos reproductivos, hipófisis, hormonas sexuales, etc. La LH, así como la gonadotropina hipofisaria y FSH, entre otras, tienen papeles muy importantes en los aparatos reproductores masculinos y femeninos.

Las dianas de LH en hombres y mujeres y sus funciones se muestran en la tabla 2 a continuación.

10

Tabla 2.

Sexo	Sitio de acción	Acción
Mujer	Células foliculares de los folículos ováricos	Estimula la producción de andrógeno que media en la transformación de FSH en estradiol durante la maduración folicular
	Folículo de Graaf	Estimula la ovulación con FSH durante una fase intermedia
	Cuerpo lúteo	Estimula la producción del cuerpo lúteo después de la ovulación y la secreción de progesterona
Hombre	Células tisulares intersticiales de túbulos seminíferos de los testículos	Estimula la secreción de testosterona

Un nivel anómalo de LH está relacionado con mayores niveles de FSH, estrógeno y progesterona. Un aumento de la concentración de LH indica menopausia, síndrome de ovario poliquístico e hipogonadismo primario en mujeres e hipogonadismo primario en hombres. Por otro lado, una disminución de la concentración de LH indica hipogonadismo primario.

15 Según una realización de la presente invención, la hormona es la GnRH.

El péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o el fragmento de la misma actúa como un agonista de GnRH.

20 El agonista de GnRH puede usarse para tratar las enfermedades o los síntomas expuestos en las reivindicaciones adjuntas, tales como determinadas enfermedades relacionadas con los esteroides (por ejemplo: cáncer de mama y cáncer de ovario) y determinadas enfermedades asociadas con la hipofunción de la endocrinología reproductiva (p. ej.: pubertad precoz), el control de los periodos de ovulación en la fecundación *in vitro* (p. ej.: los periodos de ovulación pueden controlarse opcionalmente mediante la administración de agonistas de GnRH). En consecuencia, dicho uso de la presente invención en el campo de la medicina puede lograrse usando el agonista de GnRH, que puede usarse para aumentar los efectos de la GnRH, y la modulación puede usarse de acuerdo con las
25 reivindicaciones adjuntas como 1) un tratamiento antineoplásico de cáncer sensible a hormonas, tal como cáncer de mama, 2) tratamiento de la interrupción de la producción de estrógenos en las mujeres, tal como menorragia, endometriosis, miomas uterinos, 3) tratamiento de la infertilidad en mujeres y hombres y 4) tratamiento de la pubertad precoz en niños

30 En consecuencia, se desvela un análogo de GnRH que incluye un péptido, que incluye una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma.

35 Según otra realización de la presente invención, también permite una composición para la modulación de la secreción hormonal, incluyendo la composición un modulador de la secreción hormonal para el uso según la presente invención.

Según otra realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para el uso según las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo la composición farmacéutica un modulador de la secreción hormonal según se ha definido.

40 Según una realización de la presente invención, la composición puede contener de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a aproximadamente 1 mg/mg , específicamente de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a aproximadamente 0,5 mg/mg , de manera más específica de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a aproximadamente 0,1 mg/mg de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma. Cuando el péptido está contenido en el intervalo mencionado anteriormente, tanto la seguridad como la estabilidad de la composición
45 pueden ser adecuadas y satisfactorias en el aspecto de la rentabilidad.

Según una realización de la presente invención, la composición puede tener aplicaciones para todos los animales, incluyendo seres humanos, perros, pollos, cerdos, vacas, ovejas, cobayas y monos.

Según una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede incluir un péptido compuesto por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento peptídico del mismo como componente activo.

5 Según una realización de la presente invención, una composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, rectal, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intramedular, epidural o subcutánea.

10 El modulador de la secreción hormonal para su uso según la presente invención actúa como el agonista de GnRH y la composición farmacéutica que incluye el modulador de la secreción hormonal es particularmente útil para el tratamiento de un sujeto (humano u otros) que tiene enfermedades o síntomas relacionados con niveles hormonales inductores de síntomas de enfermedades desveladas en el presente documento o niveles hormonales que afectan a enfermedades o a la progresión de las enfermedades. En consecuencia, la composición farmacéutica para su uso según la presente invención proporciona tratamiento, alivio o prevención de enfermedades provocadas por hormonas, más en particular niveles excesivos o deficientes de hormonas sexuales seleccionadas del cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, mioma uterino, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños o una combinación de las mismas. La composición farmacéutica puede formularse en una formulación farmacéutica convencional conocida en la técnica. La composición farmacéutica puede administrarse como cualquier formulación para administración oral, inyección, supositorio, administración dérmica y administración nasal, pero la composición farmacéutica no está limitada a las mismas y puede formularse preferentemente como una formulación para administración oral.

20 Las formulaciones de administración oral pueden ser, pero sin limitación, comprimidos, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, soluciones o emulsiones. Las formulaciones de administración no oral pueden ser, pero sin limitación, inyecciones, goteros, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorios, parches o aerosoles.

25 La composición farmacéutica contiene aditivos, tales como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, agentes colorantes, aromáticos o edulcorantes. La composición farmacéutica puede prepararse mediante procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

30 Según una realización de la presente invención, el componente activo de la composición farmacéutica puede variar según la edad del paciente, el sexo, el peso, el estado y la gravedad de la de patología, la vía de administración o el criterio de un médico prescriptor. La dosis puede ser determinada por un experto en la materia en función de los factores mencionados anteriormente y la dosis diaria puede ser, pero sin limitación, de aproximadamente 0,1 µg/kg/día a aproximadamente 1 g/kg/día, específicamente de aproximadamente 1 µg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, más específicamente de aproximadamente 10 µg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día y más específicamente de aproximadamente 50 µg/kg/día a aproximadamente 100 µg/kg/día. Según una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar, pero sin limitación, de 1 a 3 veces al día.

35 También se desvela una composición alimenticia para modular los niveles hormonales. La composición alimenticia puede incluir un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma.

40 Una composición alimenticia no está limitada con respecto a sus formulaciones, sino que la composición alimenticia puede ser gránulos, polvo, formulaciones líquidas o preparaciones sólidas. Además de los principios activos, cada formulación puede prepararse con ingredientes utilizados habitualmente en la industria y elegidos adecuadamente por los expertos en la materia, y los efectos de la formulación pueden aumentar cuando la formulación se aplica simultáneamente con otros ingredientes.

45 La determinación de una dosificación del principio activo mencionado anteriormente puede ser conocida por un experto en la materia y una dosificación diaria puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg/día a aproximadamente 1 g/kg/día, y más específicamente de aproximadamente 1 µg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, más específicamente de aproximadamente 10 µg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día y más específicamente de aproximadamente 50 µg/kg/día a aproximadamente 100 µg/kg/día. Sin embargo, la dosis diaria no se limita a estos números y puede variar según otros factores diversos, tales como la edad, el estado de salud y complicaciones del sujeto de administración.

50 Según una realización, el péptido para el uso según una realización de la presente invención puede administrarse en combinación con un adyuvante. En consecuencia, la composición farmacéutica, para el uso según una realización de la presente invención puede incluir un adyuvante. El adyuvante puede incluir cualquier adyuvante inmunológico conocido en la técnica, por ejemplo, un adyuvante inorgánico, tal como sal de aluminio, y un adyuvante orgánico, como un adyuvante a base de aceite, virosoma o escualeno. El adyuvante orgánico puede ser una emulsión, un adyuvante procedente de microorganismos, un adyuvante sintético o una citocina, pero no se limita a los mismos. Se conocen 9 tipos de adyuvantes de citocinas en la técnica. Un ejemplo es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que activa granulocitos y macrófagos maduros y se usa principalmente como vacuna contra la hepatitis B, VIH y cáncer [J Biomed Biotechnol. 2012; 2012: 831486. Publicado en línea el 13 de marzo de 2012].

Una dosis adecuada del adyuvante ya se conoce en la técnica y, por tanto, el adyuvante puede administrarse según el patrón conocido en la técnica. La determinación de una dosis del adyuvante puede ser conocida por un experto en la materia y una dosis diaria puede ser de aproximadamente 1 µg/kg/día a aproximadamente 10 g/kg/día, más específicamente de aproximadamente 10 µg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día y más específicamente de aproximadamente 50 µg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, pero la dosis no está limitada a las mismas y puede variar dependiendo de diversos factores tales como la edad, el estado de salud y complicaciones del sujeto de administración. Por ejemplo, puede administrarse por vía subcutánea una dosis de aproximadamente 7 mg a aproximadamente 700 mg de GM-CSF de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 150 minutos antes, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 80 minutos antes o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos antes de la administración del péptido desvelado en el presente documento. El tiempo de administración puede ser de aproximadamente al menos 1 minuto antes, al menos 3 minutos antes, al menos 5 minutos antes, al menos 7 minutos antes, al menos 8 minutos antes, al menos 9 minutos antes o al menos 10 minutos antes de la administración del péptido. Además, el tiempo de administración puede administrarse al menos 150 minutos antes, al menos 130 minutos antes, al menos 110 minutos antes, al menos 100 minutos antes, al menos 90 minutos antes, al menos 80 minutos antes, al menos 70 minutos antes, al menos 60 minutos antes, al menos 50 minutos antes, al menos 40 minutos antes, al menos 30 minutos antes, al menos 20 minutos antes o al menos 15 minutos antes de la administración del péptido. La dosis puede ser de aproximadamente 7 mg o más, aproximadamente 10 mg o más, aproximadamente 20 mg o más, aproximadamente 30 mg o más, aproximadamente 40 mg o más, aproximadamente 50 mg o más, aproximadamente 60 mg o más o aproximadamente 70 mg o más. Además, la dosis puede ser de aproximadamente 700 mg o menos, aproximadamente 600 mg o menos, aproximadamente 500 mg o menos, aproximadamente 400 mg o menos, aproximadamente 300 mg o menos, aproximadamente 200 mg o menos, aproximadamente 100 mg o menos, aproximadamente 90 mg o menos o aproximadamente 80 mg o menos.

También se desvela un kit para la modulación de la secreción hormonal que incluye una composición farmacéutica según una realización; y un prospecto.

El prospecto puede desvelar componentes activos, contenido, características, eficacia, régimen de dosis, almacenamiento, periodo de uso, el vendedor, el fabricante, fecha de fabricación, efectos secundarios y/o contraindicaciones de la composición farmacéutica.

También se desvela el uso del modulador de la secreción hormonal según una realización de la presente invención para la fabricación de un medicamento para modular la secreción hormonal.

Las descripciones detalladas del medicamento para la secreción hormonal pueden ser iguales que la descripción de la composición farmacéutica para modular la secreción hormonal según una realización de la presente invención.

También se desvela un procedimiento para modular los niveles hormonales, incluyendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un modulador de la secreción hormonal según una realización a un sujeto que necesite un tratamiento de la modulación hormonal.

También se desvela un procedimiento para modular los niveles hormonales, incluyendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica para modular la secreción hormonal a un sujeto que necesite un tratamiento de la modulación hormonal.

Las descripciones detalladas del procedimiento de modulación de los niveles hormonales pueden ser iguales que la descripción del modulador de la secreción hormonal y la composición farmacéutica según una realización de la presente invención.

El procedimiento para modular los niveles hormonales incluye aumentar o disminuir los niveles hormonales para alcanzar niveles hormonales normales o para tratar, aliviar o prevenir enfermedades inducidas por las hormonas. El procedimiento puede variar según los tipos de enfermedades inducidas por las hormonas. Las hormonas para el procedimiento de modulación de los niveles hormonales pueden seleccionarse del grupo que consiste en testosterona, estrógeno, FSH, LH, GnRH o una combinación de las mismas.

El procedimiento de modulación de los niveles hormonales puede ser determinado adecuadamente por un experto en la materia y se puede aplicar un procedimiento de administración de la composición farmacéutica a una realización de la presente invención.

Una realización del procedimiento de modulación de los niveles hormonales puede incluir la administración del modulador de la secreción hormonal o la composición farmacéutica para modular la secreción hormonal una vez al día.

El procedimiento de modulación de los niveles hormonales puede tratar, aliviar o prevenir enfermedades relacionadas con niveles excesivos o deficientes de hormonas sexuales. En una realización del modulador hormonal o de la composición farmacéutica para el uso según la presente invención, las enfermedades relacionadas con los niveles excesivos o deficientes de hormonas sexuales pueden ser cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, mioma uterino, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños o una combinación de las mismas,

También se desvela un uso de análogos de GnRH según una realización para fabricar un medicamento para modular los efectos de GnRH.

La descripción detallada del medicamento para modular los efectos de GnRH puede ser igual que la descripción para la composición farmacéutica para modular los efectos de GnRH.

- 5 También se desvela un procedimiento para modular los efectos de GnRH, incluyendo el procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un análogo de GnRH según una realización a un sujeto que necesite un tratamiento de la modulación hormonal.

10 El procedimiento para modular los efectos de GnRH incluye aumentar o disminuir los niveles hormonales para alcanzar niveles hormonales normales o para tratar, aliviar o prevenir enfermedades inducidas por las hormonas. El procedimiento puede variar según los tipos de enfermedades inducidas por las hormonas.

En el procedimiento de modulación de los efectos de GnRH, el procedimiento puede incluir la administración del análogo de GnRH o una composición farmacéutica que incluye el análogo de GnRH una vez al día.

15 El procedimiento de modulación de los efectos de la GnRH puede tratar, aliviar o prevenir enfermedades relacionadas con niveles excesivos o deficientes de hormonas sexuales. En una realización, las enfermedades relacionadas con niveles excesivos o deficientes de hormonas sexuales pueden seleccionarse de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, mioma uterino, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños, hipertrofia prostática o una combinación de las mismas, pero las enfermedades no se limitan a las mismas.

[Modo de la invención]

20 **1. Procedimientos de síntesis y análisis de péptidos**

Ejemplo 1: síntesis de péptidos

25 Se preparó un péptido que incluía la SEQ ID NO: 1, un péptido que tenía una identidad de secuencia de 80 % o mayor con el péptido o un fragmento peptídico del mismo según una síntesis de péptidos en fase sólida conocida en la técnica. En mayor detalle, los péptidos se sintetizaron acoplado cada aminoácido a partir de un extremo C mediante síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc (SPPS) usando ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon ROK). Se usaron péptidos con su primer aminoácido en el extremo C unido a resina y fueron los siguientes:

NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-resina de tritilo
 NH₂-Ala-2-cloro-resina de tritilo
 NH₂-Arg(Pbf)-2-cloro-resina de tritilo

30 Todos los materiales de aminoácidos utilizados para sintetizar los péptidos estaban protegidos por Fmoc en el extremo N y los restos de aminoácidos estaban protegidos por Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil dihidro-benzofuran-5-sulfonilo), o similares, que pueden eliminarse mediante un ácido. Los ejemplos incluyen:

35 Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH y ácido Trt-mercaptoacético.

Se utilizaron HBTU [hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetametilaminio]/HOBt [N-hidroxibenzotriazol]/NMM [4-metilmorfolina] como los reactivos de acoplamiento. Se usó piperidina en DMF al 20 % para eliminar Fmoc. Para eliminar la protección de un resto o separar los péptidos sintetizados de la resina, se utilizó un cóctel de escisión [ácido trifluoroacético (TFA)/trioisopropilsilano (TIS)/etanoditiol (EDT)/H₂O = 92,5/2,5/2,5/2,5].

40 El péptido se sintetizó utilizando el armazón de fase sólida combinado con el aminoácido inicial con la protección de aminoácidos, haciendo reaccionar los aminoácidos correspondientes por separado, lavando con solvente y desprotegiendo, y repitiendo el procedimiento. Después de cortar el péptido sintetizado de la resina, se purificó mediante HPLC y se verificó la síntesis por MS, y después se liofilizó.

45 Se describen a continuación procedimientos detallados con referencia a un ejemplo de Pep 1 (EARPALLTSRLRFIPK) que consiste en la SEQ ID NO: 1.

1) Acoplamiento

50 Los aminoácidos protegidos (8 equivalentes) y el agente de acoplamiento HBTU (8 equiv.)/HOBt (8 equiv.)/NMM (16 equiv.) se fundieron en DMF y después se añadieron a NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-resina de tritilo. Se dejó reaccionar un producto resultante obtenido de los mismos a temperatura ambiente durante 2 horas y después se lavó un producto que había reaccionado obtenido del mismo con DMF, MeOH y DMF, en el orden indicado.

2) Desprotección de Fmoc

Se añadió piperidina al 20 % en DMF a la mezcla resultante obtenida de 1) y se hizo reaccionar dos veces a temperatura ambiente durante 5 minutos cada una. Después, se lavó un producto resultante obtenido de la misma con DMF, MeOH y DMF, en el orden indicado.

- 5 3) Los procedimientos en 1) y 2) se repitieron para formar un marco básico de péptido (NH₂-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-cloro-resina de tritilo).
- 4) Escisión: se añadió un cóctel de escisión a la resina acoplada a los péptidos completamente sintetizados y los péptidos se separaron de la resina.
- 5) Se añadió éter dietílico de enfriamiento a una mezcla obtenida a partir de 4) y después se precipitaron los péptidos usando centrifugación.
- 10 6) Después de la purificación por Prep-HPLC, se verificaron los pesos moleculares de los péptidos usando CL/EM y los péptidos se liofilizaron para producir polvo.

Ejemplo 2: Procedimientos de preparación y análisis de materiales

(1) Preparación del agente de prueba, PEP-1

- 15 Se disolvió PEP-1 (péptido de la SEQ ID NO: 1), polvo blanco liofilizado, obtenido según el procedimiento mencionado en el ejemplo 1, en 0,9 % de solución salina, teniendo en cuenta el factor de corrección de PEP-1 (pureza: 94,13 %, contenido: 92,36 %, factor de corrección: 1,15). La solución de reserva 50 mg/ml se diluyó adicionalmente en 20 mg/ml, 2 mg/ml y 1 mg/ml con solución salina al 0,9 % y se almacenó a 4 °C durante una semana hasta el uso.

(2) Preparación de materiales

- 20 El fin de este ejemplo es confirmar el cambio de las hormonas sexuales en la sangre de ratas SD con 7 días de administración diaria repetida del péptido de la SEQ ID NO: 1, PEP-1. Este experimento siguió el Reglamento de Ética de los Ensayos con Animales de KAMSI Inc. (Instituto de Ciencia Médica Animal de Corea). Además, este experimento, experimento sin GLP, se remite a la notificación del MFDS (Ministerio de Seguridad de Alimentos y Medicamentos); Agente 2013-40 (5 de abril de 2013), Principles of Good Laboratory Practice (1997).

- 25 Las ratas SPF (Crlj:CD(SD)) se adquirieron de ORIENTBio Inc. (Mokdong-ri, Buk-myeon, Gapyeong-gun, Gyeonggi-do, República de Corea). Se supervisaron 75 ratas macho (6,5 semanas y 190 ~ 210 g) y 75 ratas hembra (6,5 semanas y 160 ~ 180 g) durante 4 días y se seleccionaron 64 ratas macho y hembra (cada una) para el experimento. Las condiciones de cría son las siguientes; 23 ± 3 °C de temperatura, 5 ± 15 % de humedad relativa, 10-20 veces/hora de número de cambios de aire, 12 horas (8:00 ~ 20:00) de iluminación con 150-300 lux de intensidad.

- 30 Las condiciones en la instalación animal tales como temperatura-humedad, el número de cambios de aire y la intensidad de la iluminación se midieron con regularidad. El pienso para animales (fabricado por Cargill Agri Purina. Inc.) se adquirió de DreamBios Co., Ltd (507, Gwangnaru-ro, Gwangjin-gu, Seúl, República de Corea) y, dado el uso del sistema de alimentación, se permitió a las ratas comer libremente. Se proporcionó agua purificada utilizando botellas de agua de policarbonato y el lecho para las jaulas de las ratas se adquirió de SaeronBio Inc. (800-17, Cheonggye-dong, Uiwang, Gyeonggi-do, República de Corea). Se criaron un máximo de 5 ratas en cada jaula de policarbonato (An 170 x L 235 x Al 125 mm) durante los procedimientos de aclimatación, inspección y administración. El agua, el lecho y las jaulas se reemplazaron más de una vez por semana.

(3) Grupos de animales y vías de administración

- 40 Se dividieron 64 ratones machos y hembras (mencionados anteriormente) en 8 grupos. El régimen de administración, por ejemplo, fármacos, vías, dosis y volúmenes fueron los siguientes:

Tabla 3.

Grupos	Fármacos (agente)	Dosis (mg/kg)	Volumen (ml/kg)	Intervalo de administración	Número de administraciones	Sexo	Número de ratones	N.º
G1	Vehículo	-	5	1/día	7	M	8	M01-08
G2		-		1/día	7	F	8	F01-08
G3	PEP-1	5		1/día	7	M	8	M09-16
G4		5		1/día	7	F	8	F09-16
G5		10		1/día	7	M	8	M17-24
G6		10		1/día	7	F	8	F17-24
G7		10		2/día	4	M	8	M25-32
G8		10		2/día	4	F	8	F25-32
G9		10		*2/semana	2	M	8	M33-40

(continuación)

Grupos	Fármacos (agente)	Dosis (mg/kg)	Volumen (ml/kg)	Intervalo de administración	Número de administraciones	Sexo	Número de ratones	N.º
G10		10		*2/semana	2	F	8	F33-40
G11		100		1/día	7	M	8	M41-48
G12		100		1/día	7	F	8	F41-48
G13		100		*2/semana	2	M	8	M49-56
G14		100		*2/semana	2	F	8	F49-56
G15		250		1/día	7	M	8	M57-64
G16		250		1/día	7	F	8	F57-64

*Días de administración: primer y séptimo día

El régimen de administración detallado es el siguiente; una vez al día, dos veces al día y dos veces a la semana en cada grupo experimental. La inyección se inició a las 10:00 todos los días y cada rata recibió inyección a intervalos de un minuto. Las ratas en los grupos 9, 10, 13 y 14 recibieron inyecciones dos veces por semana. La administración del agente de prueba de dosis alta precedió a la de dosis baja. El volumen de inyección se calculó usando el peso de las ratas medido recientemente y fue de 5 ml/kg. La inyección subcutánea se realizó de la siguiente manera; el asistente inclinó la espalda de la rata hacia arriba y el experimentador esterilizó la espalda de la rata con un alcohol al 70 %, seguido de inyección subcutánea de agente de prueba con jeringa 26G.

(4) Extracción de sangre

Se recogieron 1,4 ml de muestra de sangre (0,7 ml de suero) después de medir el peso (día 0). Al día siguiente (día 1), se recogieron 1,4 ml de muestra de sangre (0,7 ml de suero) dos veces después de la inyección del agente de prueba (4 horas y 8 horas después de la administración del agente de prueba). Durante los siguientes 6 días (día 2 ~ día 7), se extrajeron 1,4 ml de sangre una vez cada día (4 horas después de la inyección del agente de prueba). La dosis y el volumen del agente de prueba de cada grupo siguieron la tabla 3 y la zona horaria de inyección fue la misma todos los días. Se extrajo sangre de la vena yugular y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El suero se separó usando centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos) y se almacenó a -70 ± 5 °C en una cámara de ultracongelado hasta su uso. Se realizó extracción de sangre de cada sujeto en la misma zona horaria todos los días.

(5) Procedimiento de análisis hormonal

Se usó un equipo de CLIA (ensayo inmunológico de quimioluminiscencia) para analizar la testosterona, el estradiol E2, la FSH (hormona foliculoestimulante) y la LH (hormona luteinizante). El análisis se completó en las primeras 48 horas después de la extracción de sangre (Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario Chung-Ang) y el procedimiento detallado es el siguiente; Se utilizó ANOVA de *un factor* para verificar la comparación entre el vehículo y PEP-1 y entre diferentes dosis de PEP-1. Para un análisis más detallado, se utilizó la *prueba de Duncan* como prueba paramétrica y la *prueba de Dunnett* como prueba no paramétrica. $p < 0,05$ representa la significación estadística y todo el análisis estadístico se llevó a cabo con SPSS 10.1.

I. Análisis de hormonas

Ejemplo 3: Análisis de testosterona

La testosterona se analizó utilizando las muestras preparadas a partir del ejemplo 2. Se usaron 15 µl de suero para el análisis. El fundamento del análisis es el inmunoensayo competitivo basado en quimioluminiscencia directa. Como se menciona en el ejemplo

2, se usó el equipo de CLIA (ensayo inmunológico de quimioluminiscencia) para el análisis de testosterona, siguiendo el protocolo del fabricante. El resultado es el siguiente; el nivel de testosterona en todos los grupos antes de la inyección de PEP-1 y/o vehículo fue de 1-3 ng/dl. El día 1, el nivel de testosterona aumentó hasta 6-10 ng/dl en todos los grupos en los que se inyectó PEP-1 excepto el grupo de vehículo. El día 2, el nivel de testosterona fue el mayor en G3, G5, G11 y G15 que recibieron un régimen de inyección una vez al día. Después del día 3, el nivel de testosterona disminuyó y no hubo diferencias significativas entre PEP-1 y el vehículo, lo que implica que el nivel de testosterona aumentó junto con el nivel de LH al comienzo, seguido de un retorno al nivel normal. En grupos de hembras, la medida inicial de testosterona era demasiado baja para realizar hallazgos significativos. Además, a diferencia del grupo de machos, el nivel de testosterona antes de la inyección de PEP1 y/o vehículo estaba por debajo de 0,2 ng/dl en el grupo de hembras y se redujo adicionalmente a 0,05 ng/dl después de la inyección de PEP-1 seguido de un retorno al nivel normal el día 3. Según esto, se podría concluir que PEP-1 no tiene un efecto significativo sobre el nivel de testosterona en ratas hembras (tabla 4 y figuras 2 y 3).

Tabla 4.

Cambio en el nivel de testosterona en sangre de rata después de la administración de PEP-1 (ng/dl, n = 8)										
Grupos	Sexo	Tiempo								
		pre	4 h	8 h	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
G1	Hembra	1,57	1,28	1,54	2,05	1,23	1,21	0,99	1,41	1,45
G3		1,22	8,38	7,08	4,95	1,8	1,01	1,7	2,68	2,91
G5		1,15	6,87	6,59	3,56	1,57	0,67	0,81	1,8	2,1
G7		2,6	9,85	8,78	1,14	3,63	0,58	1,31	0,72	2,68
G9		2,3	7,92	7,57	0,9	1,05	1,21	1,73	1,67	9,43
G11		1,79	7,73	7,41	3,92	1,55	0,63	0,55	1,01	1,25
G13		1,71	7,48	6,34	0,97	1,65	1,25	1,3	2,54	12,35
G15		1,65	6,27	8,2	3,77	2,09	0,8	0,75	1,27	1,52
G2	Macho	0,07	0,11	0,07	0,01	0,05	0,1	0,13	0,13	0,14
G4		0,2	0,12	0,06	0,04	0,06	0,15	0,13	0,19	0,19
G6		0,13	0,15	0,01	0,01	0,05	0,12	0,1	0,12	0,11
G8		0,17	0,12	0,04	0,01	0,07	0,05	0,18	0,08	0,12
G10		0,15	0,16	0,02	0	0,06	0,17	0,08	0,1	0,13
G12		0,18	0,08	0,01	0,01	0,05	0,17	0,11	0,12	0,12
G14		0,13	0,07	0,01	0,01	0,13	0,17	0,13	0,14	0,15
G16		0,18	0,11	0,03	0	0,08	0,18	0,09	0,14	0,12

Ejemplo 4: Análisis de estradiol E2

5 El estradiol E2 se analizó utilizando las muestras preparadas a partir del ejemplo 2. Se usaron 75 µl de suero para el análisis. El fundamento del análisis es el inmunoensayo competitivo basado en quimioluminiscencia directa. Como se ha mencionado en el ejemplo 2, se usó el equipo de CLIA (ensayo inmunológico de quimioluminiscencia), siguiendo el protocolo del fabricante. El nivel promedio de estradiol E2 en sangre de ratas machos fue menor que el de las hembras y el nivel inicial de estradiol E2 (antes de la inyección de PEP-1), 15-20 pg/ml, permaneció igual hasta el día 7, lo que muestra que PEP-1 no tiene ningún efecto sobre el nivel de estradiol E2. Sin embargo, en el grupo de hembras, el nivel de estradiol E2 disminuyó de 20-50 pg/ml (basal) a 16-30 pg/ml en todos los grupos en los que se inyectó PEP-1 y/o vehículo el día 1. Este nivel permaneció igual hasta el día 3 y desde el día 4 el nivel de estradiol E2 en G4, G10 y el grupo de vehículo aumentó hasta 40-50 pg/ml seguido de un retorno al nivel normal (tabla 5, figura 4, 5). Para concluir, PEP-1 inhibió el nivel de estradiol E2 al principio en el grupo de hembras, pero el nivel se recuperó desde el día 3-4, especialmente el número de inyecciones y la dosis del agente de prueba parecen correlacionarse con la inhibición del nivel de estradiol E2.

Tabla 5.

Cambio en el nivel de estradiol E2 en sangre de rata después de la administración de PEP-1 (pg/dl, n = 8)										
Grupo	Sexo	Tiempo								
		Pre	4 h	8 h	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
G1	Macho	16,49	16,25	15,13	14,34	15,57	17,78	15,06	18,76	14,59
G3		17,08	14,37	17,39	16,06	15,28	16,16	16,66	19,44	14,31
G5		15,64	17,97	16,26	18,52	14,46	18,61	16,24	18,96	15,85
G7		19,7	18,94	18,63	14,91	17,36	16,63	16,92	21,72	15,81
G9		17,9	18,9	15,62	15,6	16,83	17,69	16,85	20,63	19
G11		17,91	17,13	17,41	15,75	16,47	17,86	17,89	21,73	17,72
G13		16,84	14,6	18,64	15,94	14,67	20,51	16,58	21,31	18,68
G15		17,09	15,79	17,19	15,53	15,98	18,71	16,98	16,33	18,3
G2	Hembra	45,5	28,16	24,52	26,55	21,29	41,61	39,84	42,39	25,99
G4		50,83	23,89	21,93	17,92	18,19	24,17	22,11	22,5	22,94
G6		21,41	18,79	20,11	16,84	18,59	22,32	20,87	21,27	23,14
G8		29,99	16,35	18,29	19,01	20,14	25,68	20,65	21,28	23,61
G10		22,91	17,27	16,1	16,39	27,35	45,55	35,5	21,45	22,39
G12		36,62	15,87	15,05	18,05	19,94	28,48	20,35	20,92	22,61
G14		21,46	16,4	18,96	15,46	28,33	53,29	29,31	25,87	26,45
G16		30,05	15,85	16,93	17,41	18,76	25,38	15,15	18,98	24,08

Ejemplo 5: Análisis de FSH

La FSH se analizó utilizando las muestras preparadas a partir del ejemplo 2. Se usaron 100 µl de suero para el análisis. El fundamento del análisis es el inmunoensayo de tipo sándwich de dos sitios basado en quimioluminiscencia directa. Como se ha mencionado en el ejemplo 2, se usó el equipo de CLIA (ensayo inmunológico de quimioluminiscencia), siguiendo el protocolo del fabricante.

- 5 Como resultado del análisis, hubo un ligero aumento, (el día 1, 4 horas y 8 horas después de la inyección) en particular con la administración de dosis altas (de los grupos G11 a G16) en el nivel de FSH tanto en machos como en hembras con la administración de PEP-1, en comparación con la medida inicial (antes de la inyección) (tabla 6, figura 6, 7). El día 1, el nivel de FSH de G6 y G14 aumentó en comparación con el del vehículo.

Tabla 6.

Cambio en el nivel de FSH en sangre de rata después de la administración de PEP-1 (mUI/ml, n = 8)										
Grupo	Sexo	Tiempo								
		pre	4 h	8 h	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
G1	Macho	0,20	0,22	0,17	0,19	0,14	0,24	0,38	0,11	0,22
G3		0,15	0,16	0,18	0,14	0,13	0,18	0,24	0,12	0,10
G5		0,31	0,24	0,25	0,22	0,20	0,28	0,09	0,17	0,12
G7		0,32	0,16	0,24	0,19	0,23	0,23	0,16	0,12	0,13
G9		0,28	0,29	0,28	0,22	0,17	0,37	0,25	0,14	0,15
G11		0,17	0,27	0,36	0,17	0,14	0,23	0,21	0,12	0,15
G13		0,38	0,21	0,23	0,24	0,19	0,26	0,37	0,19	0,14
G15		0,38	0,26	0,35	0,44	0,12	0,23	0,25	0,1	0,12
G2	Hembra	0,20	0,27	0,24	0,32	0,25	0,25	0,28	0,19	0,2
G4		0,20	0,17	0,30	0,32	0,12	0,17	0,21	0,13	0,17
G6		0,31	0,31	0,48	0,31	0,20	0,17	0,19	0,1	0,16
G8		0,26	0,26	0,21	0,28	0,18	0,13	0,16	0,15	0,21
G10		0,31	0,26	0,44	0,37	0,21	0,18	0,32	0,23	0,28
G12		0,21	0,23	0,25	0,28	0,19	0,15	0,21	0,1	0,12
G14		0,17	0,48	0,4	0,23	0,17	0,14	0,24	0,17	0,22
G16		0,19	0,27	0,3	0,34	0,20	0,12	0,19	0,18	0,08

10 **Ejemplo 6: Análisis de LH**

La LH se analizó utilizando las muestras preparadas a partir del ejemplo 2. Se usaron 50 µl de suero para el análisis. El fundamento del análisis es el inmunoensayo de tipo sándwich de dos sitios basado en quimioluminiscencia directa. Como se ha mencionado en el ejemplo 2, se usó el equipo de CLIA (ensayo inmunológico de quimioluminiscencia), siguiendo el protocolo del fabricante.

- 15 Como resultado del análisis, PEP-1 parece estimular la secreción de LH tanto de los machos como de las hembras y especialmente el nivel de LH aumentó con la dosis alta y la inyección frecuente de PEP-1. El nivel de LH de los machos antes de la administración de PEP-1 fue de 0,1 mUI/ml y aumentó hasta 0,5-1,5 mUI/ml en todos los grupos excepto en el vehículo a las 4 horas. El nivel de LH fue mayor en G5, G11 y G15 que tenían un régimen de administración diario. Después de 8 h, el nivel de LH disminuyó rápidamente y se mantuvo en el nivel normal hasta el final. En ratas hembras, el nivel de LH también aumentó a las 4 horas, pero el alcance del aumento no fue grande aparte de los de G12, G14 y G16 que tenían un régimen de dosis alta. De nuevo, después de 8 horas, el nivel de LH volvió al nivel normal (tabla 7, figura 8, 9).

Tabla 7.

Cambio en el nivel de LH en sangre de rata después de la administración de PEP-1 (mUI/ml, n = 8)										
Grupo	Sexo	Tiempo								
		pre	4 h	8 h	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
G1	Macho	0,1	0,13	0,14	0,12	0,12	0,12	0,11	0,09	0,14
G3		0,12	0,42	0,16	0,24	0,17	0,12	0,13	0,16	0,13
G5		0,12	0,82	0,18	0,29	0,21	0,15	0,17	0,18	0,18
G7		0,12	0,48	0,14	0,12	0,27	0,14	0,18	0,13	0,17
G9		0,12	0,62	0,14	0,12	0,12	0,13	0,14	0,11	0,67
G11		0,1	1,16	0,18	0,28	0,23	0,18	0,19	0,21	0,21
G13		0,12	1,52	0,21	0,11	0,11	0,14	0,13	0,11	0,99
G15		0,12	1,4	0,29	0,28	0,2	0,19	0,2	0,21	0,23

(continuación)

Grupo	Sexo	Tiempo								
		pre	4 h	8 h	2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
G2	Hembra	0,13	0,12	0,28	0,17	0,12	0,13	0,12	0,11	0,13
G4		0,12	0,16	0,24	0,19	0,13	0,13	0,14	0,14	0,16
G6		0,12	0,41	0,26	0,22	0,19	0,15	0,15	0,17	0,16
G8		0,13	0,22	0,15	0,17	0,28	0,13	0,23	0,15	0,28
G10		0,25	0,25	0,23	0,17	0,14	0,13	0,15	0,12	0,26
G12		0,13	0,3	0,17	0,22	0,22	0,23	0,23	0,28	0,27
G14		0,12	0,44	0,18	0,17	0,14	0,09	0,12	0,11	0,57
G16		0,11	0,42	0,2	0,23	0,22	0,23	0,26	0,28	0,28

Ejemplo 7: Análisis de GnRH

(1) Inyección de PEP-1 en ratones

- Las ratas Sprague-Dawley (SD) se adquirieron de Orient Bio (Gyronggi-do, Corea del Sur) y se utilizaron ratas de siete semanas para el estudio. Las ratas se agruparon en 4 (G1-G4) como se muestra en la tabla 8, a continuación.
- 5 Se administró a las ratas mediante inyección subcutánea (sc) PEP-1 (100 mg/kg) dos veces (el día 1 y el día 7) durante el periodo de estudio de siete días. Se recogieron muestras de sangre (1,4 ml) el día 0 (antes de la administración de PEP-1), el día 1 (4 horas y 8 horas después de la inyección) y el día 7 (4 horas después de la inyección). Se utilizaron muestras de suero obtenidas de la sangre para el experimento. Se utilizaron para el experimento muestras de suero preparadas a partir de la sangre recogida el día 1 (4 horas después de la inyección).
- 10 El cuidado y los procedimientos de los animales fueron aprobados y de conformidad con el IACUC del Instituto de Ciencia Médica Animal de Corea (KAMSI).

Tabla 8.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Sexo	N
1	(-)	Macho	8
2	(-)	Hembra	8
3	100	Macho	8
4	100	Hembra	8

(2) qPCR en tiempo real

- 15 Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc a partir de las muestras de suero. El control externo, control de adición de suero/plasma miRNeasy, se añadió en cada muestra de suero antes de la extracción de ARN. El ARN total se extrajo y se purificó a partir de muestras de suero utilizando el equipo de suero/plasma miRNeasy (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sintetizaron muestras de ADNc de primera cadena a partir de ARN totales usando el sistema de transcripción inversa (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

(3) Experimento de qPCR en tiempo real

- 20 Se realizó qPCR en tiempo real utilizando el equipo RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) con un sistema CFX96 en tiempo real (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Los datos se analizaron mediante el programa informático CFX Manager™ V3.0 usando el procedimiento $\Delta\Delta Ct$.

Tabla 9.

Nombre del gen		Secuencia
GnRHR	S	5'- CCCTCTTCTCATCATGCTAATCT -3'
	AS	5'- TGATTGACTGGCTCTGACAC -3'
GNRH	S	5'- GTTCTGTTGACTGTGTGTTTGG -3'
	AS	5'- ATCTTCTTCTGCCAGCTTC -3'
LH	S	5'- GGTCAGGGATAGAATGAGACAC -3'
	AS	5'- CGAACCATGCTAGGACAGTAG -3'
FSH	S	5'- CACCAGGGATCTGGTGTATAAG -3'
	AS	5'- ATTTACCGAAGGAGCAGTAG -3'

(4) Nivel de GnRH en suero

Las muestras de suero de rata obtenidas de la sangre recogida a las 4 horas después de la administración de PEP-1 (100 mg/kg) el primer día del experimento se analizaron para determinar la expresión de ARNm de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH). Como se muestra en las figuras 10 y 11, la administración de PEP-1 aumentó la expresión relativa de ARNm de GnRH en ratas tanto machos como hembras. El aumento en los niveles de GnRH observado en las muestras de suero estuvo de acuerdo con la explosión inicial temprana de los niveles de LH y FSH a las 4 horas después de la inyección, El día 1, como se muestra en las figuras 6 a 9. Los resultados que muestran que PEP-1 regula positivamente los niveles de ARNm de GnRH respaldan las posibles aplicaciones terapéuticas de PEP-1 como agonista y/o análogo de GnRH.

Mediante el análisis de dichas hormonas, se muestra que el modulador de las hormonas sexuales según una realización de la presente invención tiene efectos de modulación sobre las hormonas sexuales, incluyendo la testosterona, el estrógeno, la FSH, la LH y la GnRH.

III. Efectos del tratamiento del modulador hormonal

Ejemplo 8: Análisis de testosterona en línea celular de próstata

Cuando se inyecta testosterona en el cuerpo, la testosterona se convierte en dihidrotestosterona (DHT) debido a la 5 α -reductasa, que estimula la proliferación de células prostáticas e induce hiperplasia prostática benigna (BPH). Basándose en estos hechos, se realizó un experimento de inyección de PEP-1 (GV1001) para la inhibición de la proliferación de células prostáticas de la siguiente manera: Las líneas celulares eran líneas celulares mesenquimatosas (WPMY-1) y líneas celulares epiteliales (RWPE-1) de próstatas obtenidas de modelos animales de BPH. Se sembraron WPMY-1 (2,5 x 10³ células) y RWPE-1 (1 x 10⁴ células) en una placa de 96 pocillos y se observaron cambios en la proliferación en grupos experimentales en la tabla 10 a continuación. Se realizó observación de los cambios en la proliferación aspirando un medio de cultivo, añadiendo 10 μ l de solución CCK-8 a cada pocillo y midiendo una densidad óptica a 450 nm durante 1 hora a aproximadamente 4 horas.

Entre los grupos que no fueron tratados con DHT (grupos 1 a 3), un grupo al que no se administró PEP-1 (GV1001) (grupo 1) y grupos a los que se administró PEP-1 (GV1001) (grupos 2 y 3) no mostraron una diferencia sustancial en las densidades ópticas tanto en líneas celulares mesenquimatosas (WPMY-1) como en líneas celulares epiteliales (RWPE-1). Entre los grupos tratados con DHT (grupos 4 a 6), un grupo al que no se administró PEP-1 (GV1001) (grupo 4) y grupos a los que se administró PEP-1 (GV1001) (grupos 5 y 6) mostraron un diferencia sustancial en los efectos de inhibición sobre la proliferación, en la que los grupos tratados con PEP-1 (GV1001) mostraron efectos de inhibición sustanciales sobre la proliferación (véase tabla 10 y figuras 12 y 13). En consecuencia, PEP-1 puede tener efectos sobre la inhibición de la proliferación celular de la próstata, lo que afecta a la BPH provocada por DHT.

Tabla 10.

Tratamiento de líneas celulares según los grupos	
Grupos (comunes a WPMY-1 y RWPE-1)	Tratamientos
1 (CTRL)	Línea celular sola
2 (100)	Tratamiento de la línea celular con 100 μ M de GV1001
3 (200)	Tratamiento de la línea celular con 200 μ M de GV1001
4 (DHT25)	Tratamiento simultáneo de las líneas celulares con 25 nM de DHT
5 (100)	Tratamiento simultáneo de las líneas celulares con GV1001 (100 μ M) y DHT (25 nM)
6 (200)	Tratamiento simultáneo de las líneas celulares con GV1001 (200 μ M) y DHT (25 nM)

Mediante experimentos celulares de los moduladores hormonales, se puede concluir que el modulador hormonal según una realización de la presente invención tiene efectos sobre el tratamiento, alivio o prevención de enfermedades provocadas por niveles excesivos o deficientes de hormonas, tales como BPH.

<110> KAEL-GEMVAX CO., Ltd. KIM, SANG JAE

<120> Un modulador de la secreción hormonal, composición que lo comprende y un procedimiento para la modulación hormonal mediante su uso

<130> px047156

<150> EP 13173219.0

<151> 21/06/2013

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 808 076 T3

<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys
5	1				5					10					15	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un modulador de la secreción hormonal que comprende un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % con la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la secuencia de aminoácidos para su uso en un procedimiento de tratamiento, alivio o prevención de enfermedades o síntomas relacionados con los niveles de hormonas sexuales que inducen síntomas de enfermedades o niveles de hormonas sexuales que afectan a las enfermedades o la progresión de las enfermedades, en el que las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, miomas uterinos, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños y una combinación de las mismas, en el que el péptido actúa como un agonista de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH).
- 10
2. El modulador de la secreción hormonal para el uso de la reivindicación 1, en el que la hormona sexual se selecciona del grupo que consiste en testosterona, estrógeno, hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), GnRH y una combinación de las mismas.
- 15
3. El modulador de la secreción hormonal para el uso de la reivindicación 2, en el que el estrógeno es estrona, estradiol o estriol.
4. El modulador de la secreción hormonal para el uso de la reivindicación 2, en el que la hormona sexual es GnRH.
5. El modulador de la secreción hormonal para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido consiste en la SEQ ID NO: 1.
- 20
6. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de tratamiento, alivio o prevención de enfermedades o síntomas relacionados con los niveles de hormonas sexuales que inducen síntomas de enfermedades o niveles de hormonas sexuales que afectan a las enfermedades o la progresión de las enfermedades, en el que la composición comprende el modulador de la secreción hormonal definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un aditivo farmacéuticamente aceptable, en el que las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, menorragia, endometriosis, adenomiosis, mioma uterino, infertilidad femenina o masculina, pubertad precoz en niños y una combinación de las mismas, en el que el péptido actúa como un agonista de GnRH.
- 25
7. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 6, que comprende además un adyuvante.
8. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 7, en la que el adyuvante es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

FIG. 1

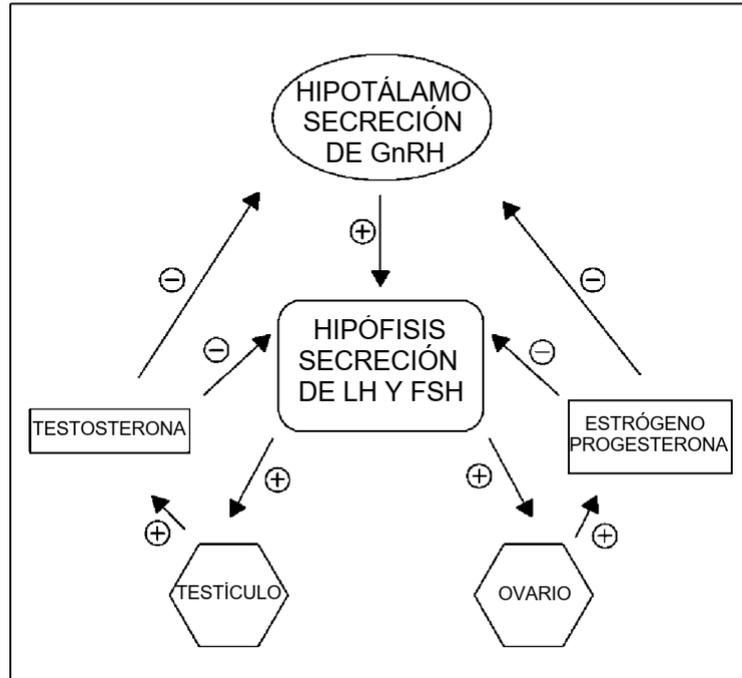


FIG. 2

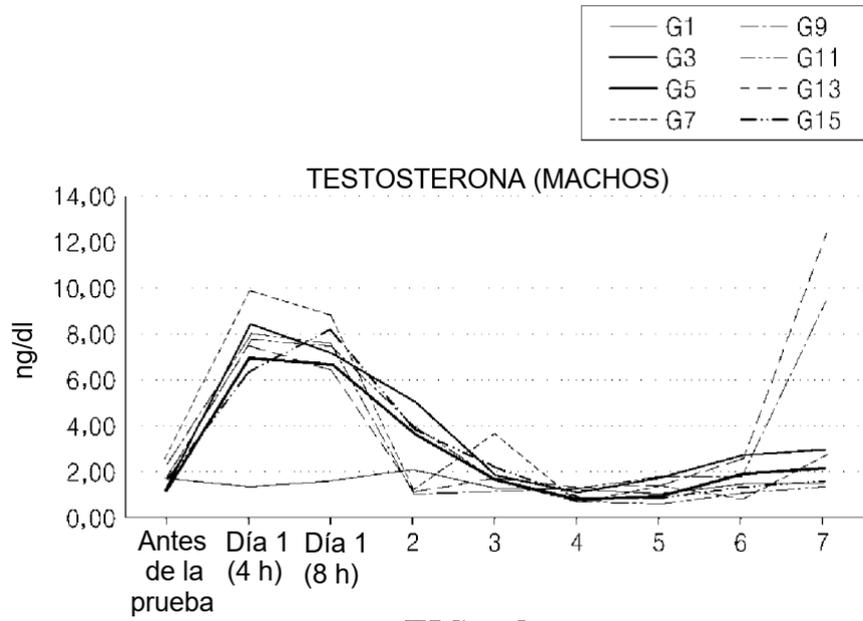


FIG. 3

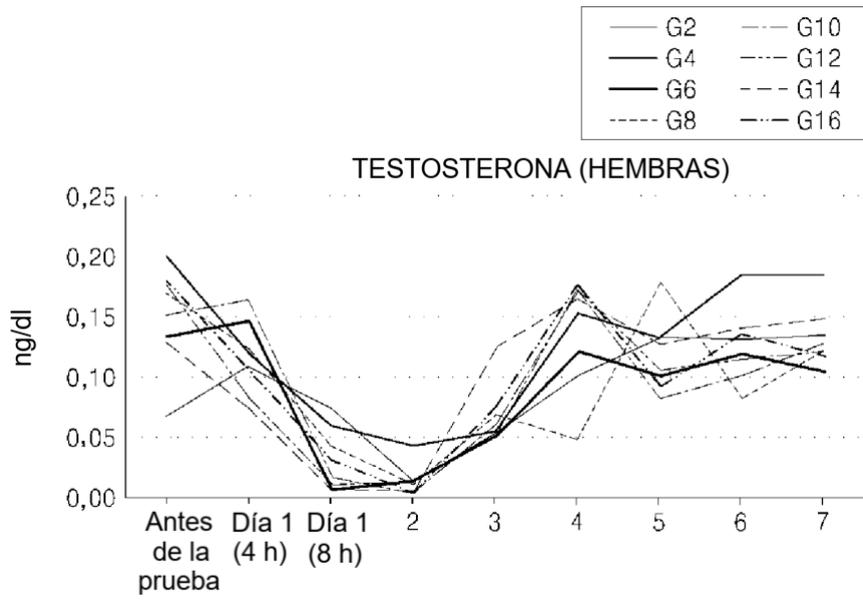


FIG. 4

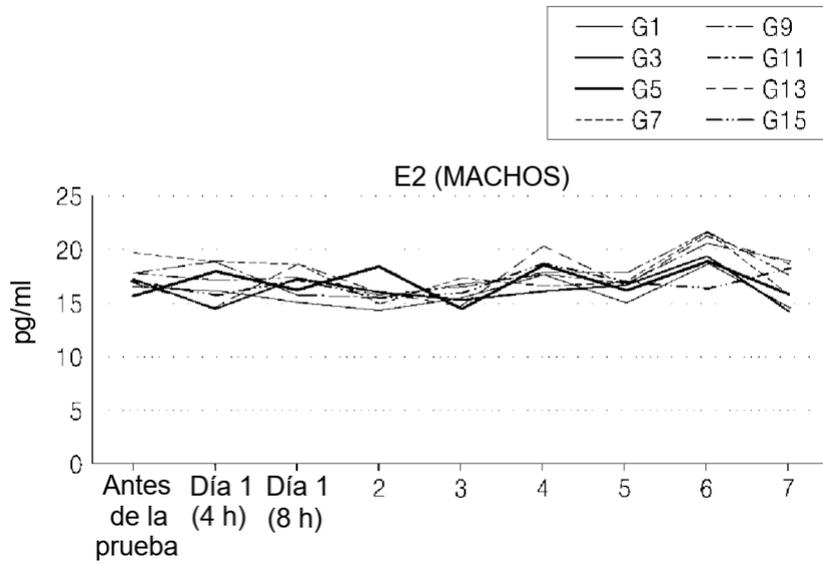


FIG. 5

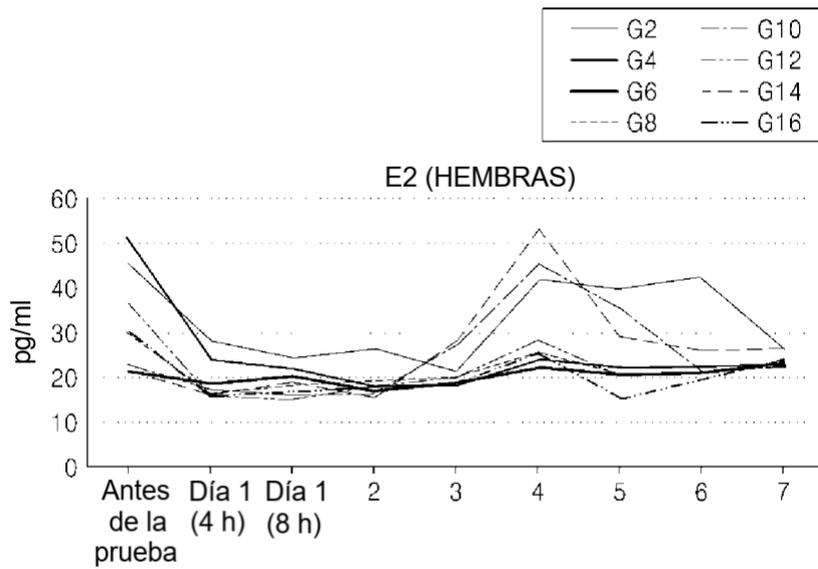


FIG. 6

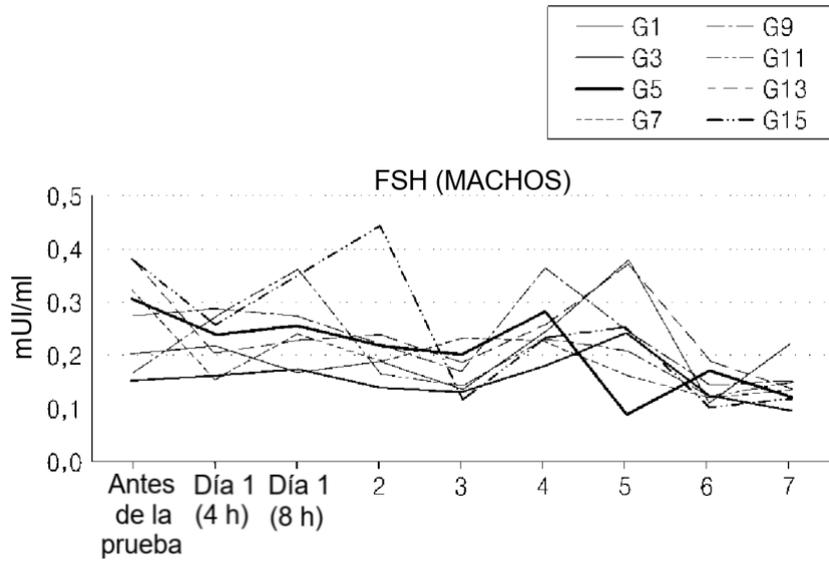


FIG. 7

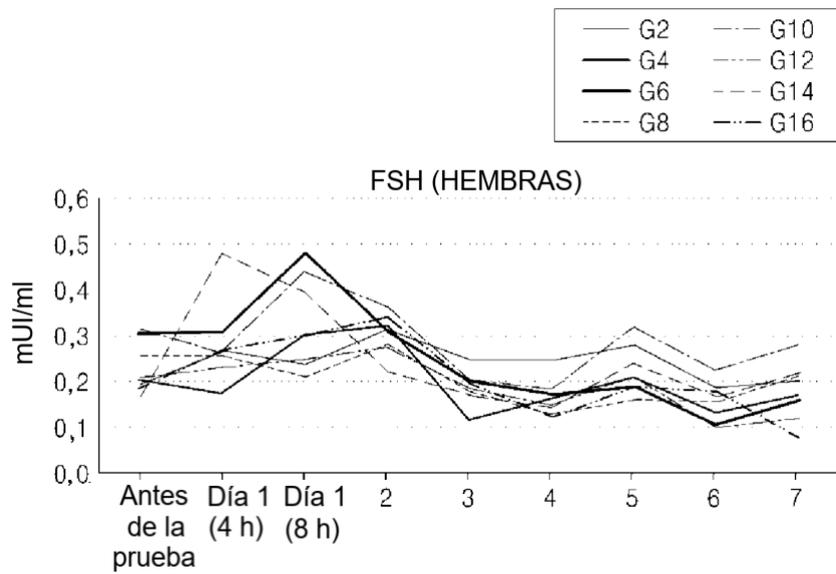


FIG. 8

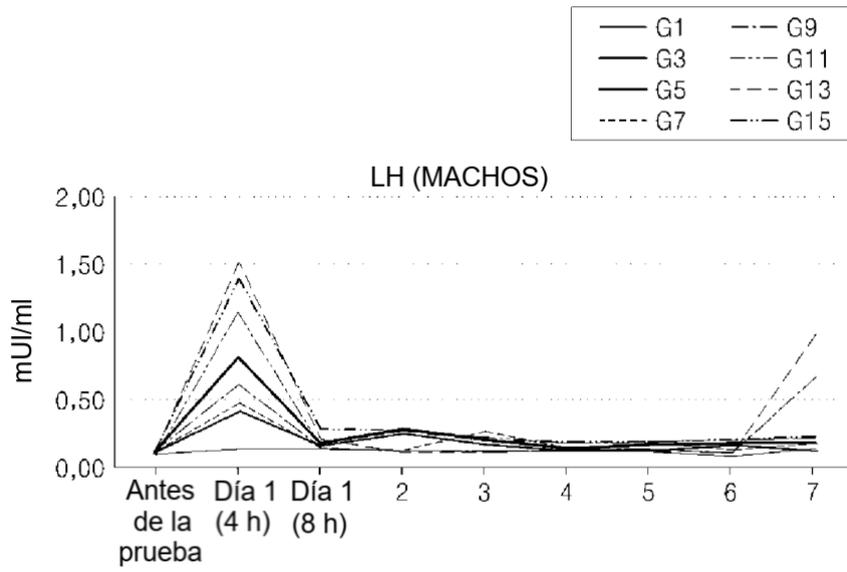


FIG. 9

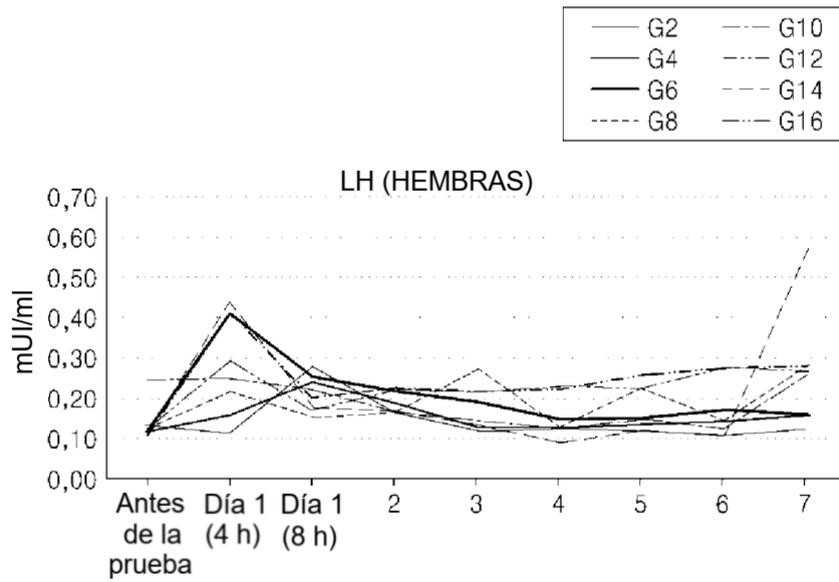


FIG. 10

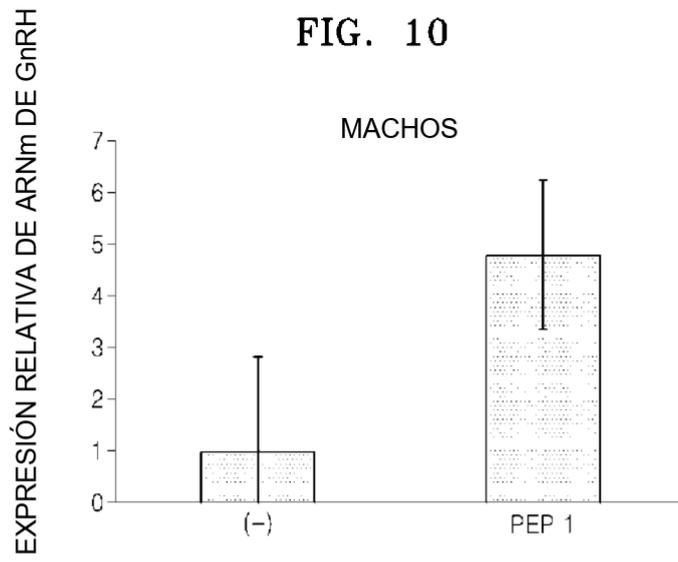


FIG. 11

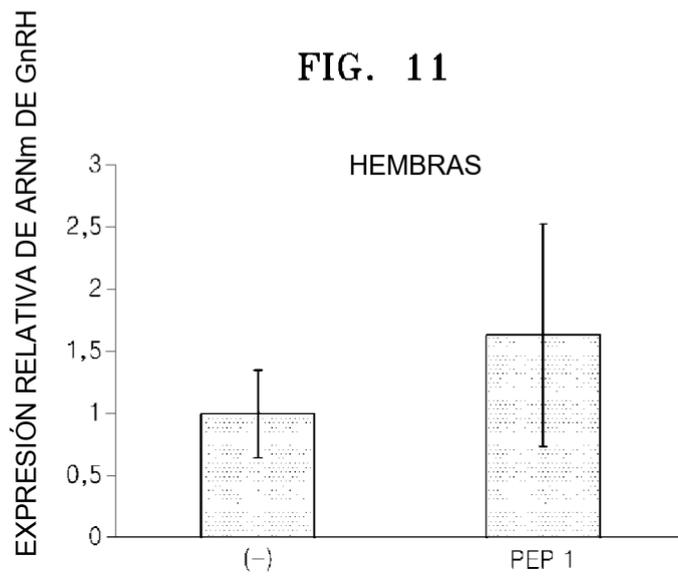


FIG. 12

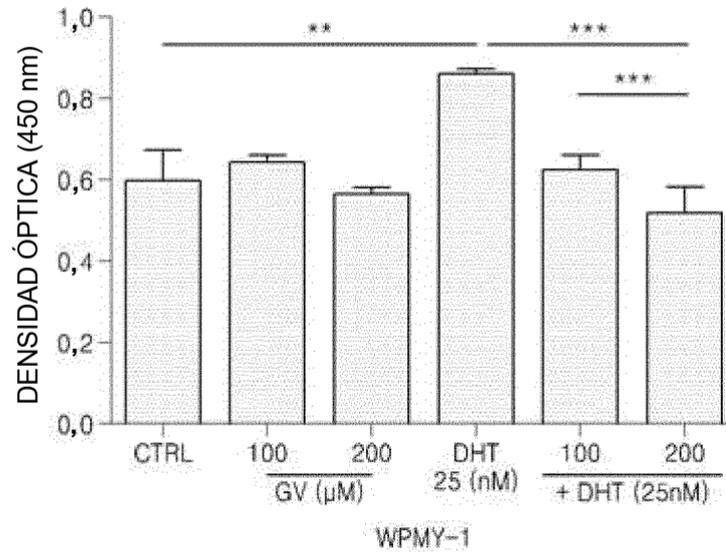


FIG. 13

