

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 897**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014 E 18161516 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3360887**

54 Título: **Péptido que tiene actividades antiinflamatoria, osteogénica y de fomento del crecimiento del pelo, y uso del mismo**

30 Prioridad:

13.05.2014 KR 20140057191

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

19.04.2021

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 431-848, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI;
KIM, EUN MI;
LEE, EUNG JI;
CHO, KYOUNG MI y
HAN, A REUM**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 819 897 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 tiene actividades antiinflamatoria, osteogénica y de fomento del crecimiento del pelo, y uso del mismo

Campo técnico

5 La presente solicitud de patente reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente coreana n.º 10-2014-0057191 presentada ante la Oficina de Propiedad Intelectual de Corea el 13 de mayo de 2014.

10 La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antiinflamatoria, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y a un uso del mismo. Además, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades óseas. Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido, como principio activo, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para su uso en la prevención de la caída del pelo o el fomento del crecimiento del pelo y a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 para su uso en la prevención de la caída del pelo o el fomento del crecimiento del pelo. Otros aspectos de la descripción no forman parte de la presente invención.

Antecedentes de la invención

15 El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) lo producen macrófagos activados en una respuesta inmunitaria del huésped para infecciones bacterianas y enfermedades tumorales, y diversas células varias. Esta citocina se ha conocido como un medio importante en la respuesta inflamatoria y es una citocina inflamatoria que desempeña un papel clave en enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, psoriasis y espondilitis anquilosante (EA). Por ejemplo, TNF- α mantiene la inflamación sinovial y destruye de manera continua
20 huesos y cartílagos en la artritis reumática. Por lo tanto, se requiere la inhibición de la actividad biológica específica del TNF- α y, por tanto, se han desarrollado diversas preparaciones biológicas para inhibir el TNF- α con el propósito de prevenir la respuesta celular mediada por TNF- α y ajustar las actividades de citocinas proinflamatorias y los procedimientos regulados por TNF- α .

25 Mientras tanto, el hueso es una de las partes importantes del cuerpo humano que sostiene estructuralmente los músculos u órganos y almacena calcio u otros minerales esenciales, dicho de otro modo, materiales tales como fósforo y magnesio, en el cuerpo. Por tanto, los huesos de adultos después de completarse el crecimiento mantienen el equilibrio de los mismos hasta la muerte sin detenerse, mientras que los procedimientos de generación y absorción de retirar hueso antiguo y sustituirlo por nuevo hueso se repiten de manera muy dinámica y continua.

30 Se sabe que dos clases de células están muy implicadas en la remodelación ósea. Una de las dos clases de células corresponde a los osteoblastos, que generan hueso, y el otro corresponde a los osteoclastos, que destruyen hueso. Los osteoblastos generan un ligando de receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) y un receptor señuelo del mismo, es decir, osteoprotegerina (OPG). Cuando RANKL se une a RANK, que es un receptor en la superficie de las células progenitoras de osteoclastos, las células progenitoras de osteoclastos maduran y se convierten en osteoclastos, lo que da como resultado la resorción ósea. Sin embargo, la unión de OPG a RANKL corta la unión entre
35 RANKL y RANK, suprimiendo de ese modo la formación de osteoclastos, impidiendo así la resorción ósea innecesaria (Theill LE. *et al.*, *Annu Rev Immunol.*, 20:795-823 (2002); Wagner EF. *et al.*, *Curr Opin Genet Dev.*, 11:527-532 (2001)). Los osteoclastos generados en las células sanguíneas (células madre hematopoyéticas) realizan la resorción o destrucción de hueso antiguo, y los osteoclastos practican orificios en los huesos para liberar una pequeña cantidad de calcio a la sangre, y el calcio se usa para mantener las funciones corporales (William J. *et al.*, *Nature.*, 423:337342 (2003)). Mientras tanto, los osteoblastos generados a partir de células óseas rellenan los orificios con colágeno y los cubren con hidroxapatita de calcio y fósforo, creando de ese modo nuevo hueso rígido para reconstruir esqueletos (Stains JP. *et al.*, *Birth Defects Res C Embryo Today.*, 75(1):72-80 (2005)). Se necesitan aproximadamente 100 días para romper hueso antiguo y reconstruir nuevo hueso (Schwarz EM. *et al.*, *Curr Opin Orthop.*, 11:329-335 (2000)).
40 Mientras que el 100% del contenido de calcio en los huesos se cambia en el plazo de un año en un lactante, aproximadamente el 10-30% del esqueleto se reconstruye mediante la remodelación ósea en un adulto cada año. Sólo si la tasa de destrucción ósea y la tasa de formación ósea son iguales, la densidad ósea puede mantenerse como antes. El desequilibrio en huesos importantes puede provocar muchas enfermedades y, en particular, son representativas las enfermedades asociadas con daño óseo debido a osteoporosis y metástasis ósea de células cancerosas.

45 La osteoporosis es un trastorno en el que la masa ósea disminuye por diversas causas y el riesgo de fractura ósea aumenta de manera continua debido a la degeneración de la microestructura en el tejido óseo. La osteoporosis es un estado en el que se ha reducido el contenido de minerales (por ejemplo, calcio) y sustratos del hueso, y se produce osteoporosis cuando la acción de destrucción ósea se vuelve superior a la acción de formación ósea debido al desequilibrio de la remodelación ósea (Iqbal MM., *South Med J.*, 93(1):2-18 (2000)). Mientras que la estructura interna del hueso normal tiene una estructura compacta, tal como una malla, el hueso con osteoporosis muestra un espacio ensanchado entre las estructuras y una microarquitectura más delgada que se vuelve susceptible de fracturas esqueléticas incluso con un impacto leve. Las enfermedades de osteoporosis se clasifican en osteoporosis posmenopáusica, en la que la pérdida ósea (el 2-3% al año) aparece inmediatamente al inicio de la menopausia y

aumenta el riesgo de compresión de la columna y fractura de huesos del carpo; osteoporosis senil, en la que se desarrolla lentamente (el 0,5-1% al año) en hombres y mujeres mayores de más de 70 años e induce una pérdida ósea gradual de los huesos de la cadera y la columna; y osteoporosis secundaria, que se desarrolla por enfermedades (enfermedades endocrinas, enfermedades gastrointestinales y tumores malignos), fármacos (hormonas corticosteroides, quimioterapia contra el cáncer, hormonas tiroideas, anticonvulsivos, antiplaquetarios, metotrexato, ciclosporina y GnRH), alcohol, tabaquismo o accidente, independientemente de la edad (Rosen C.J., *N Engl J Med.*, 353(6):595-603 (2005); Davidson M., *Clinical Reviews.*, 12 (4): 75-82 (2002)).

El cáncer de mama, el cáncer de próstata o el mieloma múltiple suelen ir acompañados de metástasis óseas (Kozlow W. *et al.*, *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*, 10(2):169-180 (2005)), y se sabe que la esperanza de vida de los pacientes que padecen tales cánceres depende de la metástasis ósea. El motivo por el que aumenta la mortalidad de los pacientes que tienen cáncer de mama o de próstata es que las células cancerosas se metastatizan selectivamente en los huesos. La metástasis ósea observada en el cáncer de mama es casi una metástasis osteolítica que conduce a la destrucción ósea, y se sabe que la metástasis osteolítica está provocada por la estimulación de osteoclastos más que por la influencia directa de las células del cáncer de mama sobre los huesos (Boyde A. *et al.*, *Scan Electron Microsc.*, 4:1537-1554 (1986)). Mientras, la metástasis ósea que se encuentra en el cáncer de próstata es una metástasis osteoblástica. También se sabe que la metástasis osteoblástica está estrechamente asociada con la osteólisis. Las células cancerosas que entran en los huesos proliferan en los microentornos circundantes al hueso para estimular la actividad de los osteoclastos u osteoblastos, determinando de ese modo si la metástasis ósea subsiguiente es osteolítica u osteoblástica (Choong P.F. *et al.*, *Clin Orthop Relat Res.*, 415S:S19-S31 (2003)). La metástasis ósea de las células cancerosas se produce en aproximadamente el 80% de los pacientes con cáncer de mama, y las células de cáncer de mama metastatizadas activan osteoclastos (Bendre M., *et al.*, *Clin Orthop Relat Res.*, 415 (Supl.):S39-S45 (2003); Palmqvist P. *et al.*, *J Immunol.*, 169(6):3353-3362 (2002)). Los osteoclastos activados destruyen el equilibrio de los microentornos circundantes al hueso para provocar osteólisis, lo que da como resultado frecuentes fracturas patológicas y también provocan enfermedades relacionadas con los huesos, tales como anemia leucoeritroblástica, deformidad ósea, hipercalcemia, dolor y síndromes de compresión nerviosa (Roodman G.D., *N Engl J Med.*, 350:1655-1664 (2004)).

Según los materiales de pago de gastos médicos de seguros médicos analizados por el Instituto de Pólizas de Seguros Médicos de la Corporación Nacional de Seguros Médicos de Corea desde 2001 hasta 2008, se estima que el número de pacientes de "enfermedades con caída del pelo" fue de 103.000 personas en 2001, de 142.000 en 2005 y de 165.000 personas en 2008. Ha aumentado en un 60% en los últimos siete años. Se estima que el número de pacientes entre los 20 años y los 40 años es de 114.000 personas y representa el 69,5% del total de pacientes. Además, se estima que el número de pacientes en la década de los 10 años es de más de 22.000 personas. Se estima que el número de pacientes de sexo masculino es de 84.000 y de 80.000 de sexo femenino, lo que es un poco más que el de los pacientes de sexo masculino. El número de pacientes de la enfermedad con "caída del pelo" en tratamiento del seguro médico coreano en 2008 son, en orden, alopecia areata (130.000 personas), alopecia cicatricial (20.000 personas), alopecia androgenética (9.000 personas) y otras caídas del pelo sin cicatrización patológica (8.000 personas).

En el extranjero, según datos de los Estudios Internacionales de Pelo y Belleza de junio de 2003, hay 250 millones de pacientes con caída del pelo, y la tasa de prevalencia de pacientes con caída del pelo entre las edades de veinticuatro y cincuenta años es del 30-65%. En China, el número de pacientes con caída del pelo es de 300 millones de personas en 2008. El 30% de los hombres de la década de los 30 años y el 50% de los hombres de la década de los 50 muestran signos de caída del pelo, y el número de pacientes con caída del pelo aumenta en un 10-15% cada año. En Japón, la tasa de prevalencia de la caída del pelo es del 26,5% y se estima que el número de pacientes con caída del pelo es de 12,93 millones de personas.

Actualmente, las preparaciones para tratar la caída del pelo se clasifican principalmente en medicamentos farmacéuticos, productos parafarmacéuticos y cosméticos. El fármaco recetado accesible proporcionado por los médicos es "Propecia", que fue desarrollado y comercializado por Merck (EE.UU.), y su principio activo finasterida ha sido aprobado como fármaco para tratar la caída del pelo por la FDA de los EE.UU. en diciembre de 1997. La finasterida inhibe la 5- α -reductasa que convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), mediante lo cual da como resultado el crecimiento de pelo grueso y largo. Aunque tiene un efecto para aliviar la caída del pelo a corto plazo, se han notificado efectos secundarios tales como impotencia, disfunción sexual y ginecomastia. El minoxidil se ha reconocido por su seguridad y eficacia como fármaco disponible para su compra sin receta médica, y se aprobó por primera vez como fármaco de extensión para el tratamiento de la caída del pelo por la FDA de los EE.UU. fomenta el crecimiento del pelo, pero tiene respuestas locales, tales como picazón, exantema y pulso acelerado.

Los productos parafarmacéuticos para las funciones de prevención de la caída del pelo y crecimiento del pelo aprobados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea incluyen "Mobaeryeok confidence" (CJ lion), "Hair Tonic" (Moracle) y "Moaenmoah" (LG Household & Health Care). Como cosméticos, se han vendido champús o productos usados en el cuero cabelludo y el pelo para mantener o fomentar la salud de la piel y el pelo. El ciclo del pelo humano se divide principalmente en fases de crecimiento (anágena), cese (catágena) y de reposo (telógena). En la fase anágena, la actividad de las papilas capilares está activa, lo que conduce a una división celular activa y, por tanto, el pelo crece rápidamente. La duración de los pelos en la fase anágena oscila entre 3 y 6 años, según la clase de pelo. Los pelos en la fase anágena representan el 80-90% de todo el pelo. Cuando la caída del pelo está en curso,

- una fase anágena más corta y una catágena más larga conducen a la reducción de la proporción del pelo en la fase anágena en todo el pelo. En la fase catágena después de la fase anágena, la generación de pelos se vuelve más lenta y, por tanto, se detienen en última instancia la división y el crecimiento celular. La fase catágena continúa durante 1-1,5 meses y ocupa el 1% del total de pelos. En la fase telógena, que es la última fase de crecimiento, los folículos capilares y las papilas capilares se separan completamente entre sí, y los folículos capilares se contraen gradualmente, las raíces del pelo se empujan hacia arriba y finalmente el pelo se cae. Esta fase dura aproximadamente de 3 a 4 meses y representa del 4 al 14% del total de pelos. Cuando la actividad de las papilas capilares vuelve a estar activa después de que finaliza la fase telógena, se generan las papilas capilares para pelo nuevo y el pelo en la fase telógena se empuja hacia arriba y se retira por completo del cuero cabelludo.
- 10 A lo largo de toda la memoria descriptiva, se hace referencia a muchos artículos y documentos de patente y se representan sus citas. La divulgación de los artículos y documentos de patente citados se incorporan en su totalidad como referencia en la presente memoria descriptiva, y el nivel del campo técnico dentro del cual se enmarca la presente invención y los detalles de la presente invención se explican más claramente.

Descripción detallada de la invención

15 Problema técnico

Los presentes inventores se han esforzado por desarrollar péptidos excelentes que tengan una actividad biológicamente eficaz y, como resultado, los presentes inventores han establecido que un péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 presenta actividades antiinflamatoria y osteogénica, y un péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 tiene una actividad de fomento del crecimiento del pelo, y luego han completado la presente invención. Sólo el péptido con SEQ ID NO 3 forma parte de la presente invención. Cualquier referencia a los péptidos con las secuencias ID NO 1 o NO 2 es sólo con propósitos de referencia.

25 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga una actividad antiinflamatoria.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga una actividad de fomento de la diferenciación osteogénica.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga una actividad de fomento del crecimiento del pelo.

30 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición antiinflamatoria.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para fomentar la diferenciación osteogénica.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición para prevenir la caída del pelo y fomentar el crecimiento del pelo.

35 Otros propósitos y ventajas de la presente divulgación resultarán más obvios con la siguiente descripción detallada de la invención, las reivindicaciones y los dibujos.

Solución técnica

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad antiinflamatoria, que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

40 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad de fomento de la diferenciación osteogénica, que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

45 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene una actividad de fomento del crecimiento del pelo, que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

Según una realización, el péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de la presente invención inhibe la expresión de una citocina inflamatoria y suprime la proliferación de células inflamatorias, presentando como resultado una actividad antiinflamatoria.

50 Según otra realización de la presente invención, el péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de la presente invención aumenta la fosforilación de PI3K, Smad1, Smad5 y Smad8, que están implicadas en la osteogénesis, y aumenta la expresión de ALP, OPG y BSP, lo que fomenta como resultado la diferenciación osteogénica.

Según otra realización de la presente invención, el péptido que se compone de SEQ ID NO: 3 de la presente invención fomenta la proliferación de células del folículo piloso y células endoteliales de la vena umbilical, aumenta la fosforilación de ERK, aumenta la expresión de PI3K, β -catenina, IGF-1, KGF y Wnt3a, que son proteínas implicadas en el crecimiento del pelo y reduce la expresión del gen de caída del pelo DKK-1, presentando como resultado actividades de prevención de la caída del pelo y de fomento del crecimiento del pelo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal en la que los residuos de aminoácido se unen entre sí a través de un enlace peptídico. Los péptidos de la presente invención pueden prepararse mediante un método de síntesis química conocido en la técnica, especialmente, técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963)); Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (patente estadounidense n.º 5.516.891).

Según una realización de la presente invención, puede unirse un grupo protector, que se selecciona del grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenilmetoxicarbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo y polietilenglicol (PEG), al extremo N-terminal o C-terminal del péptido.

La modificación de aminoácidos anterior mejora significativamente la estabilidad del péptido de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente) así como estabilidad "in vivo". El grupo protector anterior protege los péptidos de la presente invención frente al ataque de enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona una composición antiinflamatoria que contiene, como principio activo, el péptido anterior que se compone de SEQ ID NO: 3.

Dado que la composición de la presente invención contiene, como principio activo, el péptido anterior que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, se omitirá el contenido coincidente entre la composición y el péptido para evitar una complicación excesiva de la presente memoria descriptiva.

Tal como se valida en los siguientes ejemplos, el péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de la presente invención es muy eficaz en la prevención o el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias al inhibir la expresión de una citocina inflamatoria, suprimir la proliferación de células inflamatorias y suprimir la respuesta inflamatoria.

Las enfermedades inflamatorias a las que puede aplicarse la composición antiinflamatoria de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: enfermedades inflamatorias agudas o crónicas, tales como enfermedades inflamatorias de la piel (por ejemplo, asma, eccema, psoriasis, alergias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, dermatitis atópica, acné, rinitis atópica (fiebre del heno), dermatitis alérgica (eccema), sinusitis crónica o dermatitis seborreica), enfermedades óseas, gastritis, gota, artritis gotosa, úlceras, bronquitis crónica, lesión pulmonar aguda, inflamación pulmonar, hipersensibilidad de las vías respiratorias, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), espondilitis anquilosante, septicemia, choque séptico, vasculitis y bursitis; enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus, polimialgia reumática, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, arteritis de la temporal, crioglobulinemia y esclerosis múltiple; rechazo de trasplantes; cánceres incluyendo tumores sólidos (por ejemplo, de pulmón, SNC, intestino, riñón y páncreas); enfermedad de Alzheimer; aterosclerosis; infecciones virales (por ejemplo, VIH o influenza); infecciones virales crónicas (por ejemplo, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus del herpes simple); o ataxia-telangiectasia.

Según una realización de la presente invención, la composición antiinflamatoria de la presente invención puede prepararse como una composición farmacéutica o una composición cosmética.

La composición de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica que contiene: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido anterior de la presente invención; y (b) una sal farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr la eficacia o la actividad del péptido anterior.

De manera convencional, se usa el portador farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención para la formulación, y los ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, almíbar, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares, además de los componentes anteriores. Se describen con detalle preparaciones y portadores farmacéuticamente aceptables adecuados en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía oral o por vía parenteral, y los

ejemplos de administración parenteral pueden incluir inyecciones intravenosas, subcutáneas, intramusculares, intraperitoneales, locales y transdérmicas.

5 La dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención varía dependiendo de factores, tales como el método de formulación, el modo de administración, la edad, el peso corporal, el sexo, la morbilidad y la alimentación del paciente, el momento de la administración, la vía de administración, la tasa de excreción y la sensibilidad de respuesta. Un facultativo con experiencia habitual puede determinar y prescribir fácilmente la dosis que es eficaz para el tratamiento o la prevención deseados. Según una realización preferible de la presente invención, la dosis diaria de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,0001-200 µg.

10 Además, la composición farmacéutica de la presente invención se formula en una forma de dosificación unitaria o en un envase multidosis, usando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable según el método que puede realizar fácilmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En este caso, la forma de dosificación puede ser una disolución en un medio acuoso u oleoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula o un gel (por ejemplo, un hidrogel), y puede incluir además un dispersante o un estabilizante.

15 La composición de la presente invención puede usarse como una composición cosmética que contiene: (a) una cantidad cosméticamente eficaz del péptido anterior; y (b) un portador cosméticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad cosméticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es suficiente para lograr la eficacia de la composición de la presente invención descrita anteriormente.

20 La composición cosmética puede formularse en cualquier forma de dosificación que se prepare de manera convencional, y los ejemplos de la misma pueden incluir una disolución, una suspensión, una emulsión, una pasta, un gel, una crema, una loción, un polvo, un jabón, un limpiador que contiene tensioactivo, un aceite, una base de maquillaje en polvo, una base de maquillaje en emulsión, una base de maquillaje de cera y una pulverización, pero no se limita a los mismos. Más específicamente, la composición cosmética de la presente invención puede prepararse en una forma de dosificación de loción emoliente, emulsión nutritiva, crema nutritiva, crema de mensaje, esencia, crema
25 para los ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, mascarilla, pulverización o polvo facial.

En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una pasta, una crema o un gel, el componente de portador de la misma puede incluir fibras animales, fibras vegetales, cera, parafina, almidón, goma tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco u óxido de zinc.

30 En los casos en los que la dosificación de la presente invención es un polvo o una pulverización, el componente de portador del mismo puede incluir lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio o un polvo de poliamida. En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es especialmente una pulverización, la forma de dosificación puede incluir adicionalmente un propulsor, tal como clorofluorohidrocarbano, propano/butano o dimetil éter.

35 En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una disolución o una emulsión, el componente de portador de la misma puede incluir un disolvente, un solubilizante o un emulsionante, por ejemplo, agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, ésteres grasos de glicerol, polietilenglicol o ésteres de ácidos grasos de sorbitano.

40 En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es una suspensión, el componente de portador de la misma puede incluir diluyentes líquidos, tales como agua, etanol y propilenglicol; agentes de suspensión, tales como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietileno-sorbitol y éster de polioxietileno-sorbitano; celulosa microcristalina; hidróxido de aluminio metálico; bentonita; agar; o goma tragacanto.

45 En los casos en los que la forma de dosificación de la presente invención es un limpiador que contiene tensioactivo, el componente de portador del mismo puede incluir sulfato de alcohol alifático, éter-sulfato de alcohol alifático, monoéster de sulfosuccinato, isotinato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, éter-sulfato de amida de ácido graso, alquilamidobetaina, alcohol alifático, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceite vegetal, derivados de lanolina o éster de ácido graso de glicerol etoxilado.

50 Los componentes contenidos en la composición cosmética de la presente invención incluyen composiciones que se usan habitualmente en la composición cosmética, además de los péptidos, como principios activos, y el componente de portador de la misma y, por ejemplo, pueden incluir adyuvantes habituales, tales como un antioxidante, estabilizante, solubilizante, vitaminas, pigmento y sabor.

Según una realización de la presente invención, la composición de la presente invención aumenta la fosforilación de PI3K, Smad1, Smad5 y Smad8, que están implicadas en la diferenciación osteogénica, y aumenta la expresión de los genes OPG, ALP y BSP, que son marcadores de diferenciación osteogénica.

55 Según otra realización de la presente invención, la composición de la presente invención puede usarse en el alivio o el tratamiento de enfermedades óseas.

5 Según una realización de la presente invención, las enfermedades óseas, que pueden aliviarse o tratarse mediante la composición de la presente invención, incluyen osteoporosis, osteoporosis infantil, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, necrosis ósea, raquitismo, osteomielitis, pérdida de hueso alveolar, enfermedad ósea de Paget, hipercalcemia, hiperparatiroidismo primario, enfermedades óseas metastásicas, mieloma, pérdida ósea en la artritis reumatoide, pérdida ósea resultante de cánceres, displasia fibrosa, enfermedad ósea aplásica, enfermedades óseas metabólicas o pérdida de masa ósea con la edad, pero no se limitan a las mismas.

La composición para fomentar la diferenciación osteogénica de la presente invención puede prepararse como una composición farmacéutica.

10 Según otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona una composición para prevenir la caída del pelo o fomentar el crecimiento del pelo, conteniendo la composición, como principio activo, el péptido anterior que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

15 Tal como se valida en los siguientes ejemplos, la composición que contiene, como principio activo, el péptido que se compone de SEQ ID NO: 3 de la presente invención fomenta la proliferación de células del folículo piloso o células endoteliales de la vena umbilical, aumenta la fosforilación de ERK, aumenta la expresión de PI3K, β -catenina, IGF-1, KGF y Wnt3a, que son proteínas implicadas en el crecimiento del pelo, y reduce la expresión del gen de caída del pelo DKK-1, presentando como resultado actividades de prevención de la caída del pelo y fomento del crecimiento del pelo.

La composición para prevenir la caída del pelo o fomentar el crecimiento del pelo de la presente invención puede prepararse como una composición farmacéutica o una composición cosmética.

20 **Efectos ventajosos**

Se resumen a continuación características y ventajas de la presente invención:

(i) La presente invención proporciona un péptido que tiene una actividad antiinflamatoria y una actividad de fomento de la diferenciación osteogénica, que se compone de SEQ ID NO: 3.

25 (ii) La presente invención proporciona un péptido que tiene una actividad de fomento del crecimiento del pelo, que se compone de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

30 (iii) El péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de la presente invención inhibe la expresión de una citocina inflamatoria y suprime la proliferación de células inflamatorias, presentando de ese modo como resultado una actividad antiinflamatoria, y aumenta la fosforilación de PI3K, Smad1, Smad5 y Smad8, que están implicadas en la osteogénesis y aumenta la expresión de ALP, OPG y BSP, fomentando de ese modo como resultado la diferenciación osteogénica.

35 (iv) El péptido que se compone de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de la presente invención fomenta la proliferación de células del folículo piloso o células endoteliales de la vena umbilical, aumenta la fosforilación de ERK, aumenta la expresión de PI3K, β -catenina, IGF-1, KGF y Wnt3a, que son proteínas implicadas en el crecimiento del pelo, y reduce la expresión del gen de caída del pelo DKK-1, presentando de ese modo como resultado efectos de prevención de la caída del pelo y de fomento del crecimiento del pelo.

Breve descripción de los dibujos

40 Las figuras 1a a 1c muestran los resultados obtenidos midiendo la afinidad de unión al receptor de TNF del péptido de la presente invención y dos péptidos adicionales. Cualquier referencia a "los péptidos de la invención" con respecto a las figuras de los ejemplos se refiere al péptido de la invención y también a los péptidos de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, que no forman parte de la invención reivindicada.

Las figuras 2a a 2f muestran los resultados obtenidos midiendo los cambios de proliferación de macrófagos por los péptidos de la presente invención.

45 Las figuras 3a a 3c muestran los resultados obtenidos midiendo los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la translocación nuclear de NF- κ B activado mediante el tratamiento con TNF- α .

Las figuras 4a a 4c muestran los resultados obtenidos midiendo los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la expresión de IL-1 β aumentada mediante el tratamiento con TNF- α .

Las figuras 5a a 5c muestran los resultados obtenidos midiendo los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la expresión de IL-8 aumentada mediante el tratamiento con TNF- α .

50 La figura 6 muestra los resultados obtenidos midiendo los grados de unión al receptor de HGF de los péptidos de la presente invención.

La figura 7 muestra los resultados obtenidos midiendo los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la fosforilación de PI3K aumentada mediante la estimulación de la señal del receptor de HGF.

La figura 8 muestra los resultados midiendo el grado de unión al receptor de BMP del péptido de la presente invención.

5 La figura 9 muestra los resultados obtenidos midiendo el efecto del péptido de la presente invención sobre la fosforilación de Smad1/5/8 aumentada mediante la estimulación de la señal del receptor de BMP.

Las figuras 10a a 10c muestran los resultados obtenidos midiendo los cambios de expresión de ALP de los péptidos de la presente invención.

Las figuras 11a a 11c muestran los resultados obtenidos midiendo la mineralización mediante el fomento de la diferenciación osteogénica de los péptidos de la presente invención.

10 Las figuras 12a a 12c muestran los resultados obtenidos midiendo los cambios en la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica (OPG, ALP y BSP) por los péptidos de la presente invención.

Las figuras 13a y 13b muestran los resultados obtenidos midiendo el cambio en la proliferación de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano por los péptidos de la presente invención.

15 Las figuras 14a y 14b muestran los resultados obtenidos midiendo el cambio en la proliferación de células de la matriz germinal del folículo piloso humano por los péptidos de la presente invención.

Las figuras 15a y 15b muestran los resultados obtenidos midiendo el cambio en la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana por los péptidos de la presente invención.

La figura 16 muestra los resultados obtenidos midiendo los cambios en la fosforilación de ERK, la expresión de PI3K y la expresión de β -catenina por los péptidos de la presente invención.

20 La figura 17 muestra los resultados obtenidos midiendo los cambios en la expresión de IGF-1, KGF y Wnt3a por los péptidos de la presente invención.

La figura 18 muestra los resultados obtenidos midiendo los efectos de los péptidos de la presente invención sobre la expresión de DKK-1 aumentada mediante el tratamiento con DHT.

25 La figura 19 muestra los resultados obtenidos midiendo los cambios en la expresión de Ha3-II y queratina-14 por los péptidos de la presente invención.

La figura 20 muestra los resultados obtenidos midiendo el cambio en el crecimiento de bigotes de ratón por los péptidos de la presente invención.

Modo para llevar a cabo la invención

30 A continuación en el presente documento, se describirá con detalle la presente invención con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos sólo son para ilustrar la presente invención de manera más específica, y resultará evidente para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo de síntesis 1: síntesis de péptidos

35 A 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, n.º de cat. Nova Biochem 01-64-0021) introducida en un reactor se le añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido por agitación durante 3 minutos. Después de retirar la disolución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido por agitación durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el disolvente. Se pusieron en el reactor 10 ml de una disolución en diclorometano (DCM) y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Cys-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmol de diisopropiletilamina (DIEA), después de lo cual se disolvió bien la mezcla con agitación y luego se llevó a cabo la reacción con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se lavó el material resultante y se disolvieron metanol y DIEA (2:1) en DCM, seguido por una reacción durante 10 minutos, y luego se lavó el material resultante con una cantidad en exceso de DCM/DMF (1:1). Después de retirar la disolución, se añadieron 10 ml de DMF, seguido por agitación durante 3 minutos, y luego se eliminó de nuevo el solvente. Se pusieron en el reactor 10 ml de una disolución de desprotección (piperidina al 20%/DMF), seguido por agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se retiró la disolución. Se añadió la misma cantidad de una disolución de desprotección y luego se mantuvo la reacción de nuevo durante 10 minutos, seguido por la retirada de la disolución. Se lavó el material resultante dos veces con DMF, una vez con MC y una vez con DMF, durante 3 minutos cada vez, preparando de ese modo resina Cys-CTL. Se pusieron 10 ml de una disolución en DMF en un nuevo reactor y se añadieron 200 mmol de Fmoc-Pro (Bachem, Suiza), 200 mmol de HoBt y 200 mmol de Bop, y se disolvió bien la mezcla con agitación. Se pusieron por divisiones dos veces en el reactor 400 mmol de N,N-diisopropiletilamina (DIEA) y luego se llevó a cabo la agitación durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos. Se puso la disolución mixta de aminoácidos disueltos en el reactor que contenía la resina

50

desprotegida, seguido por una reacción con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de retirar el líquido de reacción, se llevó a cabo la agitación usando una disolución en DMF tres veces durante 5 minutos cada vez, seguido por la retirada. Se tomó una pequeña cantidad de la resina reaccionada para comprobar el grado de reacción mediante la prueba de Kaiser (prueba de ninhidrina). Usando la disolución de desprotección, se llevó a cabo la reacción de desprotección dos veces de la misma manera que se describió anteriormente, para producir resina Pro-Cys-CTL. Después de un lavado suficiente con DMF y MC, se llevó a cabo de nuevo la prueba de Kaiser, y luego se llevó a cabo la siguiente prueba de unión de aminoácidos de la misma manera que se describió anteriormente. Basándose en la secuencia de aminoácidos seleccionada, se llevó a cabo la reacción en cadena en el orden de Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Ile, Fmoc-Ala, Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Arg(pbf), Fmoc-Cys(Trt) y Fmoc-Ala. Se eliminó el grupo protector Fmoc haciendo reaccionar dos veces con la disolución de desprotección durante 10 min cada vez y luego realizando un buen lavado. Se añadieron anhídrido acético, DIEA e hidroxibenzotriazol (HoBt) para llevar a cabo la acetilación durante 1 hora, y luego se lavó la resina de peptidilo preparada tres veces secuencialmente con DMF, MC y metanol, se secó bajo el flujo de gas nitrógeno y se secó por completo mediante secado a vacío bajo pentóxido de fósforo (P₂O₅). Se añadieron 30 ml de una disolución saliente [el 95% de ácido trifluoroacético (TFA), el 2,5% de agua destilada y el 2,5% de tianisól] y se mantuvo la reacción durante 2 horas mientras se agitaba la mezcla intermitentemente a temperatura ambiente. Se filtró la resina, se lavó con una pequeña cantidad de una disolución y luego se mezcló con la disolución madre. Se llevó a cabo destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, y luego se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación. Después de eso, se recogieron los precipitados por centrifugación, seguido por lavado dos veces con éter frío. Después se retiró la disolución madre, seguido por un secado suficiente en atmósfera de nitrógeno, sintetizando de ese modo 0,79 g de péptido 1 sin purificar, NH₂-Ala-Cys-Arg-Ser-Ala-Ile-Gly-Arg-Pro-Cys-COOH (rendimiento: 87,8%), 0,77 g de péptido 2 sin purificar, NH₂-Ala-Cys-Phe-Thr-Arg-Thr-Ser-His-Ala-Cys-COOH (rendimiento: 85,5%), 0,76 g de péptido 3 sin purificar, NH₂-Ala-Cys-Asp-Gly-Arg-Thr-Gln-Ala-Leu-Cys-COOH (rendimiento: 84,4%). Se determinó el peso molecular de los péptidos 1, 2 y 3 como de 1033,3 Da (valor teórico: 1033,2 Da), 1096,0 Da (valor teórico: 1096,2 Da) y 1036,9 Da (valor teórico: 1037,1 Da) usando un sistema de análisis de peso molecular, respectivamente.

[Tabla 1]

Secuencias y pesos moleculares de péptidos sintetizados

N.º	Secuencia de aminoácidos	Valor de análisis (espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	ACRSAIGRPC	1033,3	1033,2
2	ACFTRTSHAC	1096,0	1096,2
3	ACDGRQALC	1036,9	1037,1

Ejemplo 1: Evaluación de la actividad antiinflamatoria

30 1-1. Ensayo de unión al receptor (TNFR)

En una placa para ELISA, se añadieron y mezclaron 50 µg/25 µl de péptido y 25 µl de un tampón de recubrimiento (fosfato de sodio 20 mM, pH 9,6) y luego se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con PBST (300 µl), se llevó a cabo el bloqueo con 200 µl de un tampón de bloqueo (BSA al 3%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 µl), se añadió TGFR tipo II (R&D Systems) a 0,5 µg/1 ml por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 µl), se diluyó IgG anti-humana-HRP (Santa Cruz Biotechnology) a 1:1.000, que luego se añadió a 100 µl por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 µl), se añadieron 100 µl de disolución de TMB (Sigma Aldrich), seguido por el desarrollo de color. Se añadieron 50 µl de una disolución de parada (H₂SO₄ 3 N) para detener la reacción, y luego se leyó la absorbancia a D.O. 450 nm.

40 Los resultados de las pruebas verificaron una alta afinidad de unión de los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 a TNFR (control positivo: TNF-α) (figuras 1a-1c).

1-2. Ensayo de proliferación

Se sembró la línea celular de macrófagos de ratón, células RAW 264.7, en una placa de 48 pocillos a una densidad de 1x10⁴ células/pocillo. Después de la estabilización durante 24 horas, se incubaron las células en un medio sin suero durante 6 horas y luego se trataron simultáneamente con TNF-α 100 ng/ml y péptido 50 µg/ml, seguido por incubación durante 72 horas. Una vez completada la incubación, se retiró el sobrenadante y se inmovilizaron las células usando etanol, y una vez finalizada la inmovilización celular, se lavaron las células tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de que se retiró la disolución de lavado, se trataron las células con una disolución colorimétrica de SRB y se lavaron suficientemente con ácido acético al 1%. Luego, se observaron las células usando un microscopio para observar las condiciones de las células vivas. Se leyó la absorbancia para la disolución decolorada

con Tris 20 mM con una luz UV de 560 nm, midiendo de ese modo las condiciones de supervivencia de las células.

Los resultados de prueba verificaron que la proliferación de células RAW264.7 aumentada con el tratamiento con TNF- α , se redujo mediante el tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 1 (figuras 2a-2f).

1-3. Inmunotransferencia de tipo Western usando células de la matriz germinal del folículo piloso humano

5 Se sembraron las células de la matriz germinal del folículo piloso humano (queratinocitos), células HaCaT, en una placa de 6 pocillos a 5×10^5 células/pocillo, seguido por incubación durante la noche, y luego se trataron las células con el péptido a diferentes concentraciones, seguido por incubación durante 1 hora. Después de la lisis celular, se realizó inmunotransferencia de tipo Western con respecto a las señales de RANKL-RANK, p-ERK y p-c-Jun, usando anticuerpo anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y anticuerpo anti-p-c-Jun (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

Los resultados de prueba verificaron que la translocación nuclear de NF- κ B activado mediante el tratamiento con TNF- α , se redujo mediante el tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 1 (figuras 3a-3c).

1-4. ELISA de IL-1 β e IL-8

15 Se sembraron los monocitos humanos, células THP-1, en una placa de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo. Después de la incubación durante la noche, se pretrataron las células con las muestras a 10 μ g/ml durante 30 minutos y se trataron con TNF- α 50 ng/ml, seguido por incubación durante 24 horas. Se obtuvo el medio de incubación celular, seguido por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y luego se separó el sobrenadante. Se llevó a cabo ELISA usando el kit para ELISA de IL-1b e IL-8 (R&D Systems).

20 Los resultados de prueba verificaron que la expresión de IL-1b e IL-8 aumentada mediante el tratamiento con TNF- α , se inhibió mediante el tratamiento con los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 a través de ELISA (figuras 4a-4c y 5a-5c).

Ejemplo 2: Evaluación de la capacidad osteogénica

2-1. Ensayo de unión al receptor (HGFR)

25 En una placa para ELISA, se añadieron y mezclaron 50 μ g/25 μ l de péptido y 25 μ l de un tampón de recubrimiento (fosfato de sodio 20 mM, pH 9,6) y luego se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se llevó a cabo el bloqueo con 200 μ l de un tampón de bloqueo (BSA al 3%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se añadió HGFR (R&D Systems) a 0,5 μ g/1 ml por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se diluyó IgG anti-humana-HRP a 1:1.000, que luego se añadió a 100 μ l por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se añadieron 100 μ l de disolución de TMB, seguido por el desarrollo de color. Se añadieron 50 μ l de una disolución de parada (H₂SO₄ 3 N) para detener la reacción, y luego se leyó la absorbancia a D.O. 450 nm.

Los resultados de prueba verificaron una alta afinidad de unión de los péptidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 en HGFR (figura 6).

35 2-2. Inmunotransferencia de tipo Western usando osteoblastos (fosforilación de PI3K)

Se sembraron células MC3T3-E1 (línea de osteoblastos de ratón) en una placa de 6 pocillos a una densidad celular de 2×10^5 células/pocillo, y luego las células incubadas durante la noche se incubaron en un medio sin suero durante 24 horas. Se trataron las células con los péptidos a 50 μ g/ml durante 15 minutos (control positivo: HGF 50 ng/ml). Se trataron las células con el tampón de lisis celular para obtener un lisado, seguido por la cuantificación de proteínas, y luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western con respecto a fosfo-PI3K (P-PI3K) usando anticuerpo anti-pPI3K (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

Pudo verificarse que el tratamiento con los péptidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, que presentan alta afinidad de unión a HGFR, aumentó la fosforilación de PI3K mediante la estimulación de la señal de HGFR (figura 7).

2-3. Ensayo de unión al receptor (BMPR)

45 En una placa para ELISA, se añadieron y mezclaron 50 μ g/25 μ l de péptido y 25 μ l de un tampón de recubrimiento (fosfato de sodio 20 mM, pH 9,6) y luego se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se llevó a cabo el bloqueo con 200 μ l de un tampón de bloqueo (BSA al 3%) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se añadió BMPR-IB (R&D Systems) a 0,5 μ g/1 ml por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se diluyó IgG anti-humana-HRP a 1:1.000, que luego se añadió a 100 μ l por pocillo, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar tres veces con PBST (300 μ l), se añadieron 100 μ l de disolución de TMB,

seguido por el desarrollo de color. Se añadieron 50 μ l de una disolución de parada (H_2SO_4 3 N) para detener la reacción, y luego se determinó la absorbancia a D.O. 450 nm.

Los resultados de prueba verificaron una alta afinidad de unión del péptido de SEQ ID NO: 2 en BMPR (control positivo: BMP4) (figura 8).

5 2-4. Inmunotransferencia de tipo Western usando osteoblastos (fosforilación de Smad1/5/8)

Se sembraron células MC3T3-E1 (línea de osteoblastos de ratón) en una placa de 6 pocillos a una densidad celular de 2×10^5 células/pocillo. Las células incubadas durante la noche se incubaron en un medio sin suero durante 24 horas y luego se trataron con el péptido a 50 μ g/ml durante 15 minutos y 30 minutos (control positivo; BMP4 50 ng/ml). Se trataron las células con el tampón de lisis celular para obtener un lisado, seguido por la cuantificación de proteínas, y luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western con respecto a fosfo-Smad1/5/8 (P-smad1/5/8) usando anticuerpo anti-p-smad1/5/8 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

Pudo verificarse que el tratamiento con el péptido de SEQ ID NO: 2, que presenta una alta afinidad de unión a BMPR, aumentó la fosforilación de Smad1/5/8 mediante la estimulación de la señal de BMPR (figura 9).

2-5. Tinción de ALP

15 Se sembró la línea de osteoblastos de ratón, células MC3T3-E1, en una placa de 24 pocillos a 4×10^4 células/pocillo, y luego se incubaron durante la noche. Después del intercambio por un medio que contenía ácido ascórbico 50 μ g/ml + b-glicerofosfato 10 mM, se trataron las células con cada péptido a concentraciones de 10 μ g/ml y 50 μ g/ml y se incubaron durante 14 días para inducir la diferenciación. En este caso, se repitieron el intercambio de medio cada tres días y el tratamiento con el péptido (control positivo: BMP2 30 ng/ml). Se lavó el pocillo de la placa con incubación completada dos veces con PBS y luego se inmovilizaron las células con un tampón de inmovilización, en el que se mezclaron acetona, formaldehído al 37% y disolución de ácido cítrico, durante 30 segundos. Se llevó a cabo la siguiente tinción usando el kit de tinción de fosfatasa alcalina en leucocitos (SIGMA).

20 Se trataron las células con una mezcla, en la que se mezcló una disolución alcalina de FBB con una disolución de nitrato de sodio a 1:1, durante 2 minutos, y luego se trataron con un tampón que se componía de agua destilada y disolución alcalina de naftol AS-BI, seguido por el desarrollo de color en un incubador a 37°C durante 1 hora.

25 Los resultados de prueba verificaron que el tratamiento de los preosteoblastos MC3T3-E1 con el péptido de SEQ ID NO: 1 a diferentes concentraciones aumentó la expresión de ALP mediante el fomento de la diferenciación (figuras 10a-10c).

2-6. Tinción de rojo de alizarina

30 Se sembraron células MC3T3-E1 (línea de osteoblastos de ratón) en una placa de 24 pocillos a una densidad celular de 4×10^4 células/pocillo. Se intercambió el medio de las células incubadas durante la noche por medio α -MEM que contenía ácido ascórbico 50 μ g/ml y β -glicerofosfato 10 mM, y luego se trataron las células con los péptidos a diferentes concentraciones (10 y 50 μ g/ml), seguido por incubación en un incubador a 37°C durante 14 días. En este caso, se repitieron el intercambio de medio cada tres días y el tratamiento con el péptido (control positivo: rhBMP2 30 ng/ml (Cell Signaling)). Una vez completada la incubación, se lavó el pocillo de la placa dos veces con PBS y se inmovilizaron las células mediante el tratamiento con EtOH al 70% durante 1 hora. Luego, se tiñeron las células con rojo de alizarina S 40 mM (pH 4,2, Sigma Aldrich) durante 10 minutos. Se trataron las células con cloruro de cetilpiridinio al 10% (disuelto en fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0)) durante 15 minutos, y luego se leyó la absorbancia a 560 nm usando un espectrofotómetro (SpectraMax, Molecular Devices).

40 Se verificó mediante tinción con rojo de alizarina que el tratamiento de preosteoblastos MC3T3-E1 con el péptido de SEQ ID NO: 1 a diferentes concentraciones aumentó la mineralización mediante el fomento de la diferenciación (figuras 11a-11c).

2-7. RT-PCR

45 Se sembraron células MC3T3-E1 (línea de osteoblastos de ratón) en una placa de 6 pocillos a una densidad celular de 1×10^5 células/pocillo. Las células incubadas durante la noche se trataron con los péptidos a diferentes concentraciones (10 y 50 μ g/ml), seguido por incubación en un incubador a 37°C durante tres días (control positivo: BMP2 100 ng/ml (Cell Signaling)). Después de recoger las células de incubación completada, se trataron las células con una disolución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) para preparar ARN, y luego se sintetizó el ADNc usando premezcla de RT (Intron). Se llevó a cabo PCR usando cebadores de los marcadores respectivos (OPG, ALP, BSP) y premezcla de PCR (Intron).

50 Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en la PCR para los marcadores de diferenciación osteogénica fueron las siguientes: secuencia de cebador directo de OPG, 5' -CTGCCTGGGAAGAAGATCAG-3' y cebador inverso de OPG, 5' -TTGTGAAGCTGTGCAGGAAC-3' (temperatura de apareamiento, 60°C); secuencia del

cebador directo de ALP, 5'-CCAGCAGGTTTCTCTCTTGG-3' y cebador inverso ALP, 5' -CTGGGAGRCRCATCCTGAGC-3' (temperatura de apareamiento, 60°C); secuencia de cebador directo de BSP, 5' - AAAGTGAAGGAAAGCGACGA-3' y cebador inverso de BSP, 5' - GTTCCTTCTGCACCTGCTTC-3' (temperatura de apareamiento, 60°C).

5 Se cargaron 5 µl de producto de PCR en gel de agarosa al 1%, seguido por electroforesis, y luego se investigaron las bandas usando Gel-Doc.

Se trataron las células de la línea de osteoblastos de ratón MC3T3-E1 con el péptido de SEQ ID NO: 1 y luego se incubaron durante tres días. Como resultado, pudo observarse que la expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica, osteoprotegerina (OPG), fosfatasa alcalina (ALP) y sialoproteína ósea (BSP) aumentaron en todo el grupo de control positivo, el grupo tratado con BMP2 100 ng/ml, y el grupo tratado con el péptido de SEQ ID NO: 1 (figuras 12a-12c).

Ejemplo 3: Evaluación de la capacidad de crecimiento del pelo.

3-1. Observación de la proliferación celular (ensayo de proliferación)

15 Para observar el efecto de proliferación celular sobre células de la papila dérmica del folículo piloso humano, se sembraron células de la matriz germinal del folículo piloso humano y células endoteliales de la vena umbilical humana, que son las principales células ciliadas, cada tipo de células en una placa de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células/pocillo, seguido por incubación en condiciones de 37°C y el 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de intercambiar el medio por el mismo medio de cultivo excluyendo por completo el suero, se trataron las células con los péptidos a diferentes concentraciones (1 µg/ml, 10 µg/ml y 50 µg/ml), seguido por incubación en las mismas condiciones durante 72 horas. Después de retirar el sobrenadante de incubación, se inmovilizaron las células usando etanol y se lavaron tres veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se retiró la disolución de lavado y se tiñeron las células mediante el tratamiento con disolución colorimétrica de SRB. Después de que se lavaron las células lo suficiente con ácido acético al 1%, se observaron las células usando un microscopio para observar el estado de las células vivas. Se leyó la absorbancia con luz UV de 560 nm, midiendo de ese modo las condiciones de supervivencia de las células.

30 Cuando se trataron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano (HFDP), las células de la matriz germinal del folículo piloso humano (HFGMC) y las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) con los péptidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 a diferentes concentraciones y luego se incubaron durante 72 horas, la proliferación aumentó de manera dependiente de la concentración (figuras 13a-13b, figuras 14a-14b y figuras 15a-15b).

3-2. Observación del cambio en el material de señalización celular.

35 Con el fin de observar los cambios en la fosforilación de ERK y la expresión de PI3K, que son los principales materiales de señalización implicados en la proliferación celular en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano, se trataron las células con los péptidos de la presente invención durante 30 minutos y 60 minutos, y luego se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos, observando de ese modo los cambios de pERK y PI3K. Se llevó a cabo la prueba con anticuerpo anti-pERK (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y anticuerpo anti-pPI3K (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

40 Se sembraron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano en una placa de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo, y entonces se estabilizaron mediante incubación durante la noche, y luego se trataron las células con los péptidos a diferentes concentraciones (1 µg/ml y 10 µg/ml) por tiempos (30 minutos y 60 minutos). Se trataron las células con el tampón de lisis celular para obtener un lisado, seguido por la cuantificación de proteínas, y luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western con respecto a fosfo-ERK (pERK), PI3K y β-catenina.

45 Se trataron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano con el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 durante 30 minutos y 60 minutos, y luego se observaron los cambios en los materiales de señalización relacionados con la proliferación celular. Como resultado, aumentó la fosforilación de ERK y el nivel de PI3K, que están implicados en la proliferación celular, y la expresión de β-catenina, que está implicada en la formación del pelo (figura 16).

3-3. Observación de cambios en proteínas implicadas en el crecimiento del pelo.

50 Para observar los cambios en la expresión de IGF1, KGF y Wnt3a, que son proteínas implicadas en el desarrollo de las raíces capilares en las células de la papila dérmica del folículo piloso humano, se trataron las células con los péptidos de la presente invención durante 24 horas., y luego se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos, observando de ese modo los cambios en proteínas relacionadas con el crecimiento del pelo.

Se sembraron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano en una placa de 6 pocillos a una densidad

de 1×10^5 células/pocillo. Se estabilizaron las células mediante incubación durante la noche y luego se trataron con los péptidos a diferentes concentraciones (0,1-50 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas. Se trataron las células con el tampón de lisis celular para obtener un lisado, seguido por la cuantificación de proteínas, y luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western con respecto a IGF-1, KGF y Wnt3a.

- 5 Se llevó a cabo la prueba usando anticuerpo anti-IGF-1 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), anticuerpo anti-KGF (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y anticuerpo anti-Wnt3a (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

Se trataron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano con el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 a diferentes concentraciones durante 24 horas. Como resultado, aumentó la expresión de IGF-1, KGF y Wnt3a, que son proteínas implicadas en el crecimiento del pelo (figura 17).

10 3-4. Observación de cambios en proteínas relacionadas por hormona que provoca la caída del pelo.

Para observar los efectos de los péptidos sobre la dihidrotestosterona (DHT), que es la hormona que provoca la caída del pelo, se trataron las células de la papila dérmica del folículo piloso con DHT 5 $\mu\text{g/ml}$ y los péptidos de la presente invención a diferentes concentraciones, y luego se observó el cambio de expresión de DKK-1, que es una proteína relacionada con la caída del pelo. Se trataron las células con DHT y los péptidos durante 48 horas, y luego se sometieron a inmunotransferencia de tipo Western con respecto a DKK-1 usando anticuerpos específicos, observando de ese modo la expresión de DKK-1.

15 Se sembraron las células de la papila dérmica del folículo piloso humano en una placa de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Se estabilizaron las células mediante incubación durante la noche y luego se trataron con DHT 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich) junto con los péptidos a diferentes concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 horas. Se trataron las células con el tampón de lisis celular para obtener un lisado, seguido por la cuantificación de proteínas, y luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western con respecto a DKK-1 usando anticuerpo anti-DKK-1 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.).

20 Se verificó que el tratamiento de las células de la papila dérmica del folículo piloso humano con la hormona que provoca la caída del pelo, DHT, aumentó la expresión de DKK-1, que es la proteína de caída del pelo; y la expresión de DKK-1 aumentada por DHT, se redujo por el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 (figura 18).

25 3-5. Observación del cambio en la expresión de queratina

Para observar si el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 presenta el efecto de fomento del crecimiento del pelo a través de la inducción de el fomento de la diferenciación de queratinocitos, se midió el cambio en la expresión de queratina, que es un material marcador de diferenciación celular.

30 Se sembraron las células de la línea de queratinocitos en una placa de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo, y luego se incubaron durante la noche. Se trataron las células con los péptidos a diferentes concentraciones (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) y luego se incubaron en un incubador a 37°C durante 24 horas. Después de recoger las células de incubación completada, se trataron las células con una disolución de extracción de ARN (Easy Blue, Intron) para preparar ARN, y luego se sintetizó el ADNc usando premezcla de RT (Intron). Se llevó a cabo RT-PCR usando cebadores de los marcadores respectivos (Ha3-II y queratina 14) y premezcla de PCR (Intron) para medir los cambios en la expresión de los marcadores.

Las secuencias de cebador específicas de diana usadas en la PCR para los marcadores de diferenciación de queratinocitos fueron las siguientes: secuencia del cebador directo de Ha3-II 5' - CAGAAGTATAGCAGTAAGACAG-3' y cebador inverso de Ha3-II, 5' - CAAGAGGAAAGTTTATTAGGC-3' (temperatura de hibridación, 60°C); secuencia del cebador directo de queratina 14, 5' - GGACGCCACCTTTCATCTTC-3' y cebador inverso de queratina 14, 5' - ATCTGGCGGTTGGTGGAGG-3' (temperatura de apareamiento, 60°C).

Se cargaron 5 μl de producto de PCR en gel de agarosa al 1%, seguido por electroforesis, y luego se investigaron las bandas usando Gel-Doc.

45 Se trataron los queratinocitos con el péptido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 a diferentes concentraciones, y luego los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de diferenciación, Ha3-II y queratina 14. Como resultado, se verificó que el dos péptidos presentaban el efecto de fomento de la diferenciación de queratinocitos (figura 19).

3-6. Observación de la tasa de crecimiento de bigotes de ratón

50 Se aislaron las raíces capilares alrededor de bigotes de ratones y luego se trataron con los péptidos a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, seguido por incubación en condiciones de 37°C y el 5% de CO_2 durante ocho días. Los días 5 y 8, se investigaron los efectos de los péptidos observando la longitud de los pelos.

Como resultado de observar el cambio en el crecimiento del pelo mediante el tratamiento con los péptidos, se observó que el crecimiento del pelo era más rápido en los grupos de tratamiento que en el grupo de control (figura 20).

Aunque la presente invención se ha descrito con detalle, con referencia a las características específicas, resultará evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es sólo para una realización y no limita el alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención quedará definido por las reivindicaciones adjuntas.

5

Lista de secuencias

<110> CAREGEN Co. LTD.

10

<120> Péptidos que tienen actividades antiinflamatoria, de formación ósea y estimulación del crecimiento del pelo y usos de los mismos

<130> PP1400622-EP

<150> Documento KR 2014/0057191

<151> 13-05-2014

<160> 13

15

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido 1

<400> 1

Ala Cys Arg Ser Ala Ile Gly Arg Pro Cys
 1 5 10

<210> 2

25

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 2

30

<400> 2

Ala Cys Phe Thr Arg Thr Ser His Ala Cys
 1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 3

<400> 3

	Ala	Cys	Asp	Gly	Arg	Thr	Gln	Ala	Leu	Cys	
	1				5					10	
	<210> 4										
	<211> 20										
	<212> ADN										
5	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> Cebador directo de OPG										
	<400> 4										
	ctgcctggga agaagatcag										20
10	<210> 5										
	<211> 20										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
15	<223> Cebador inverso de OPG										
	<400> 5										
	ttgtgaagct gtgcaggaac										20
	<210> 6										
	<211> 20										
20	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
	<220>										
	<223> Cebador directo de ALP										
	<400> 6										
25	ccagcagggtt tctctcttgg										20
	<210> 7										
	<211> 20										
	<212> ADN										
	<213> Secuencia artificial										
30	<220>										
	<223> Cebador inverso de ALP										
	<400> 7										
	ctgggagr cr catcctgagc										20
	<210> 8										
35	<211> 20										
	<212> ADN										

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de BSP	
	<400> 8	
5	aaagtgaagg aaagcgacga	20
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador inverso de BSP	
	<400> 9	
	gttccttctg cacctgcttc	20
	<210> 10	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de Ha3-II	
20	<400> 10	
	cagaagtata gcagtaagac ag	22
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de Ha3-II	
	<400> 11	
	caagaggaaa gtttattagg c	21
30	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador directo de queratina 14	
	<400> 12	

ggacgcccac ctttcatctt c

21

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso de queratina 14

<400> 13

atctggcggg tggaggagg

19

10

REIVINDICACIONES

1. Péptido que tiene actividad antiinflamatoria, que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
2. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en la inhibición de la expresión de una citocina inflamatoria.
3. Péptido según la reivindicación 1, para su uso en la supresión de la proliferación de células inflamatorias.
- 5 4. Péptido que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades óseas.
5. Péptido para uso según la reivindicación 4, en el que el péptido tiene una actividad de fomento de la diferenciación osteogénica.
- 10 6. Péptido para su uso según la reivindicación 4 ó 5, en el que el péptido aumenta la fosforilación de PI3K, Smad1, Smad5 y Smad8.
7. Péptido para su uso según la reivindicación 4 ó 5, en el que el péptido aumenta la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), osteoprotegerina (OPG) y sialoproteína ósea (BSP).
8. Composición que comprende un péptido, como principio activo, que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 para su uso para prevenir la caída del pelo o fomentar el crecimiento del pelo.
- 15 9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el péptido fomenta la proliferación de células del folículo piloso o células endoteliales de la vena umbilical.
10. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el péptido aumenta la fosforilación de ERK.
11. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el péptido aumenta la expresión de PI3K, β -catenina, IGF-1, KGF y Wnt3a.
- 20 12. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el péptido reduce la expresión de DKK-1.
13. Péptido que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, para su uso en la prevención de la caída del pelo o el fomento del crecimiento del pelo.

Fig. 1a

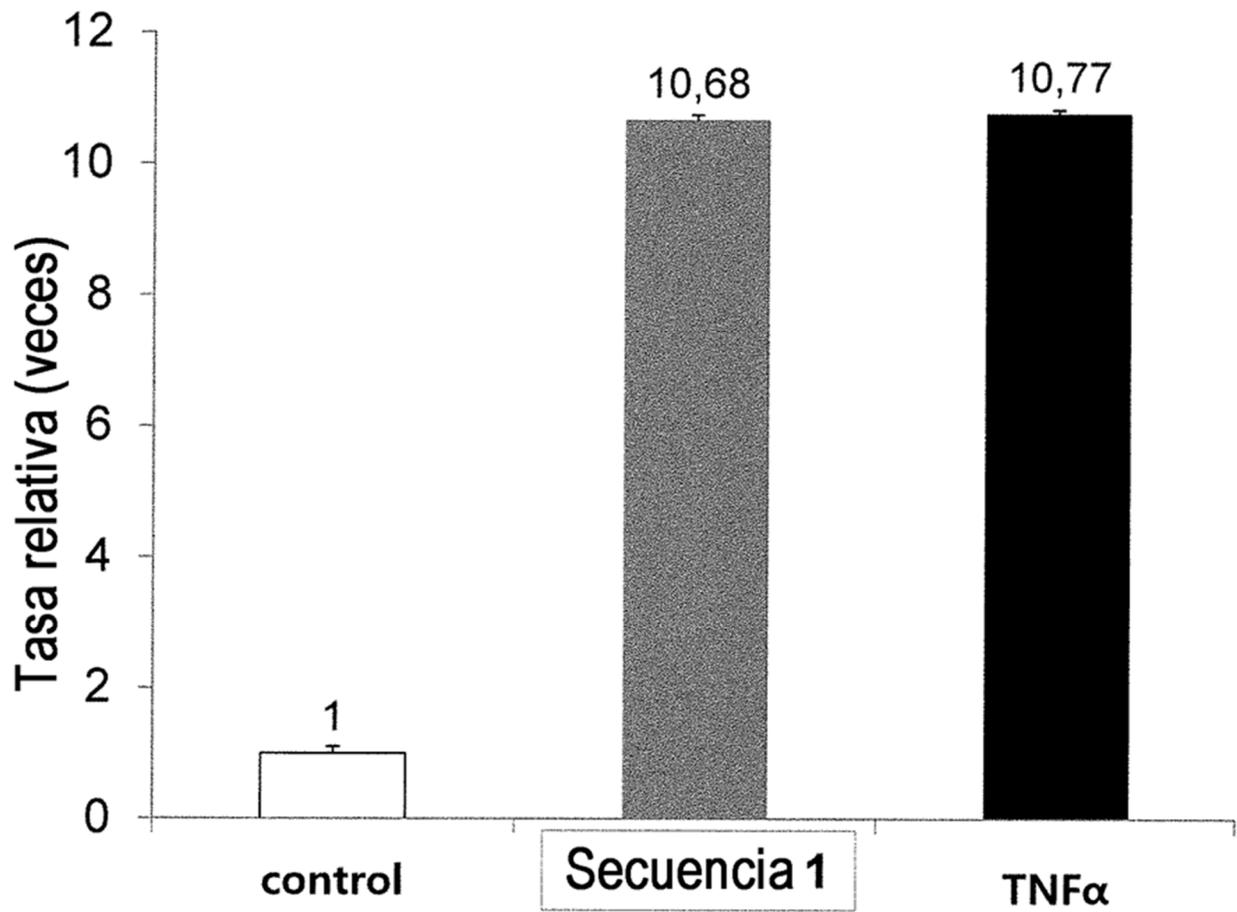


Fig. 1b

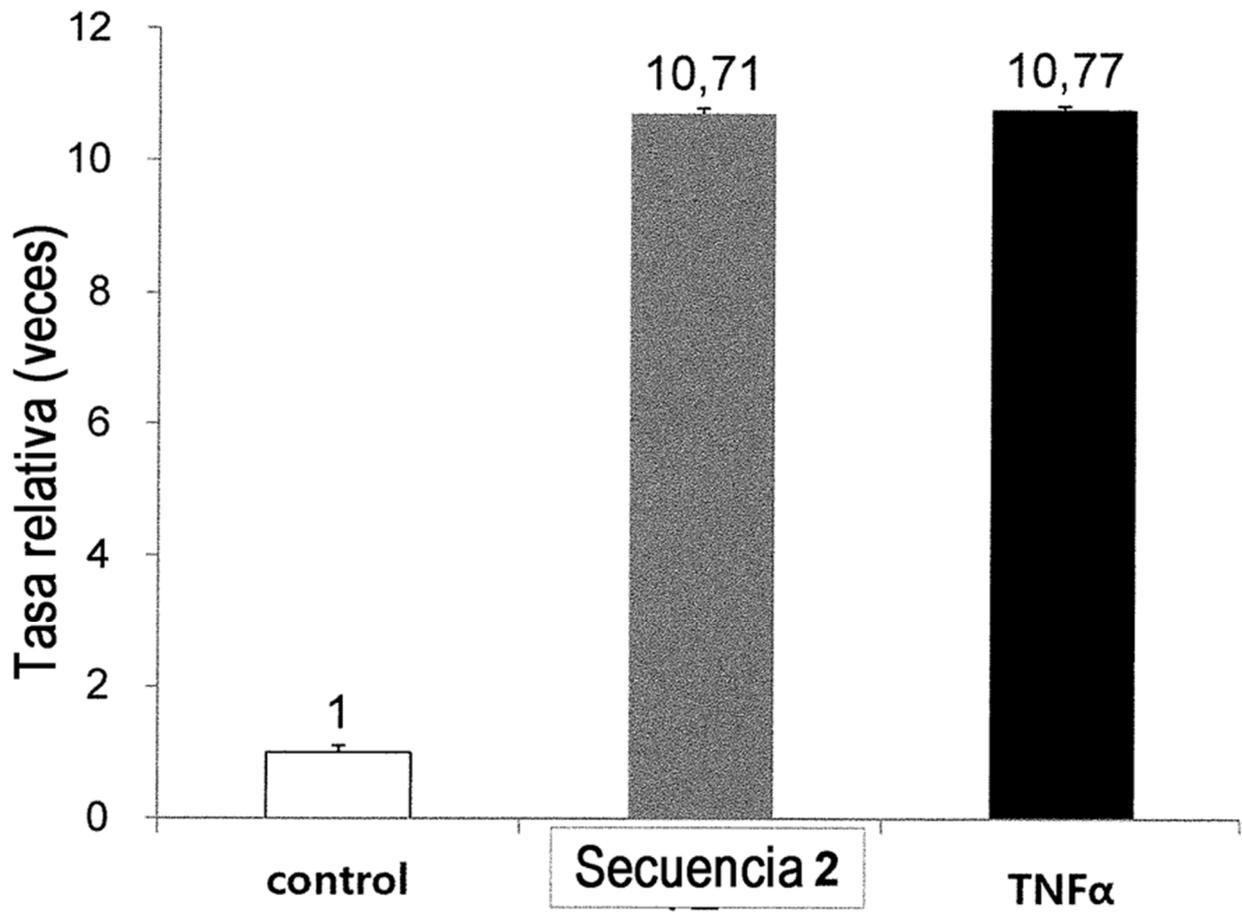


Fig. 1c

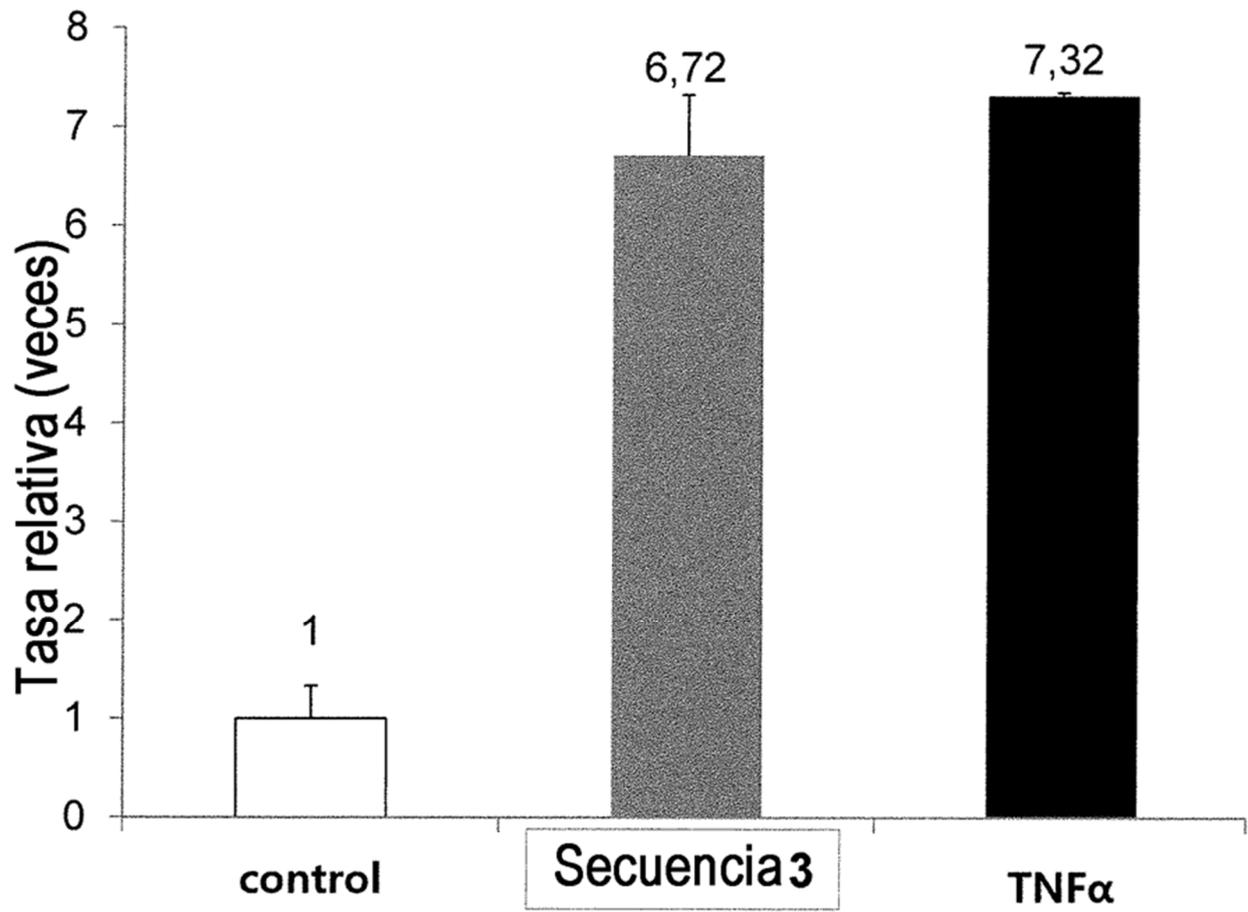


Fig. 2a

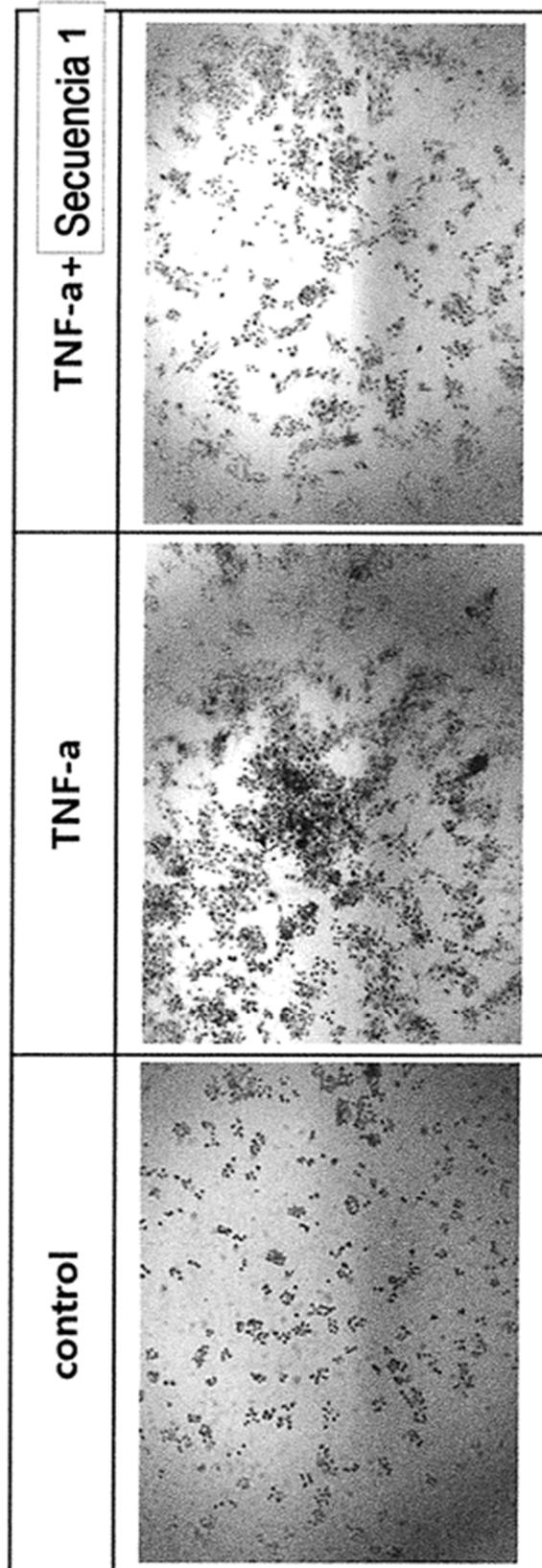


Fig. 2b

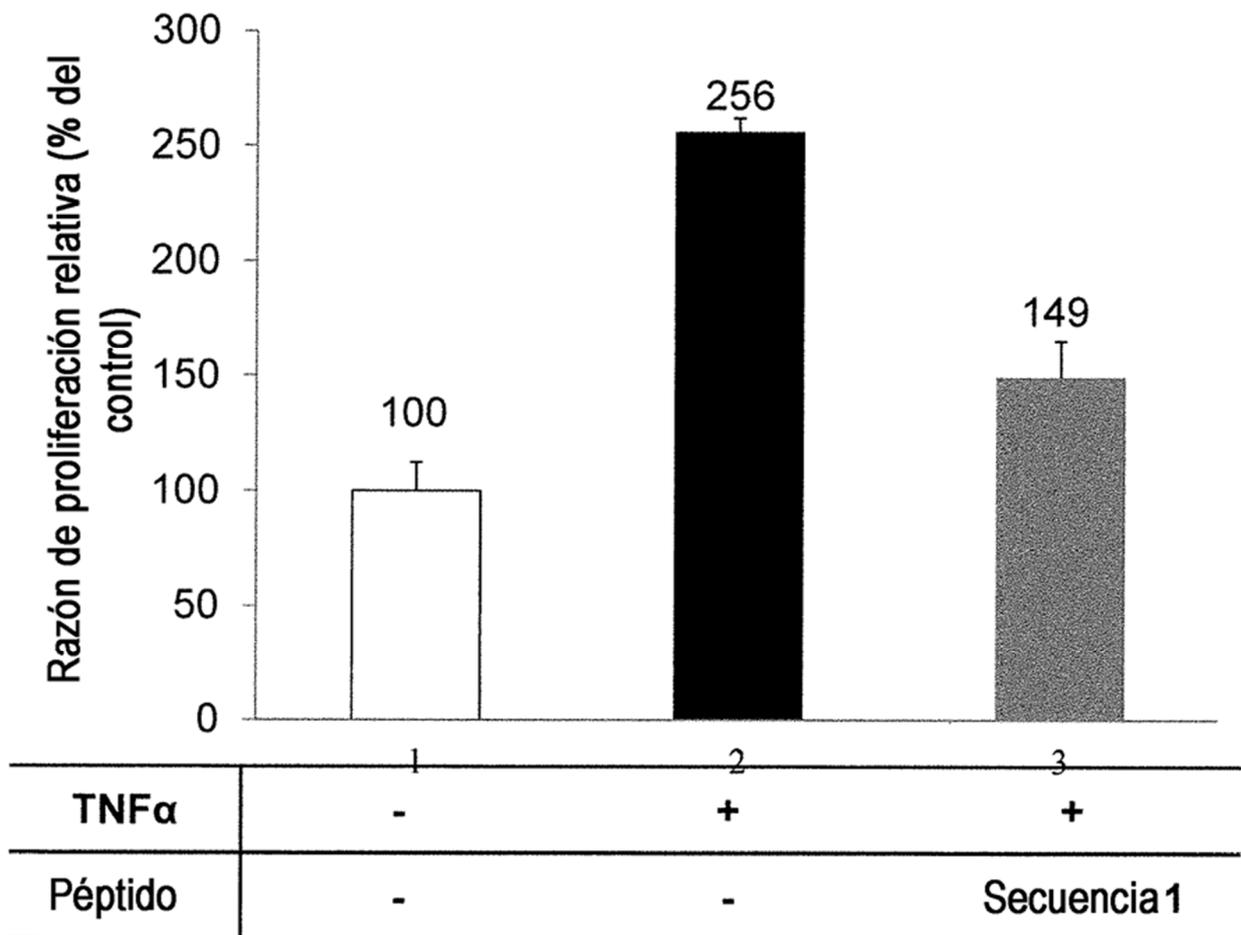


Fig. 2c

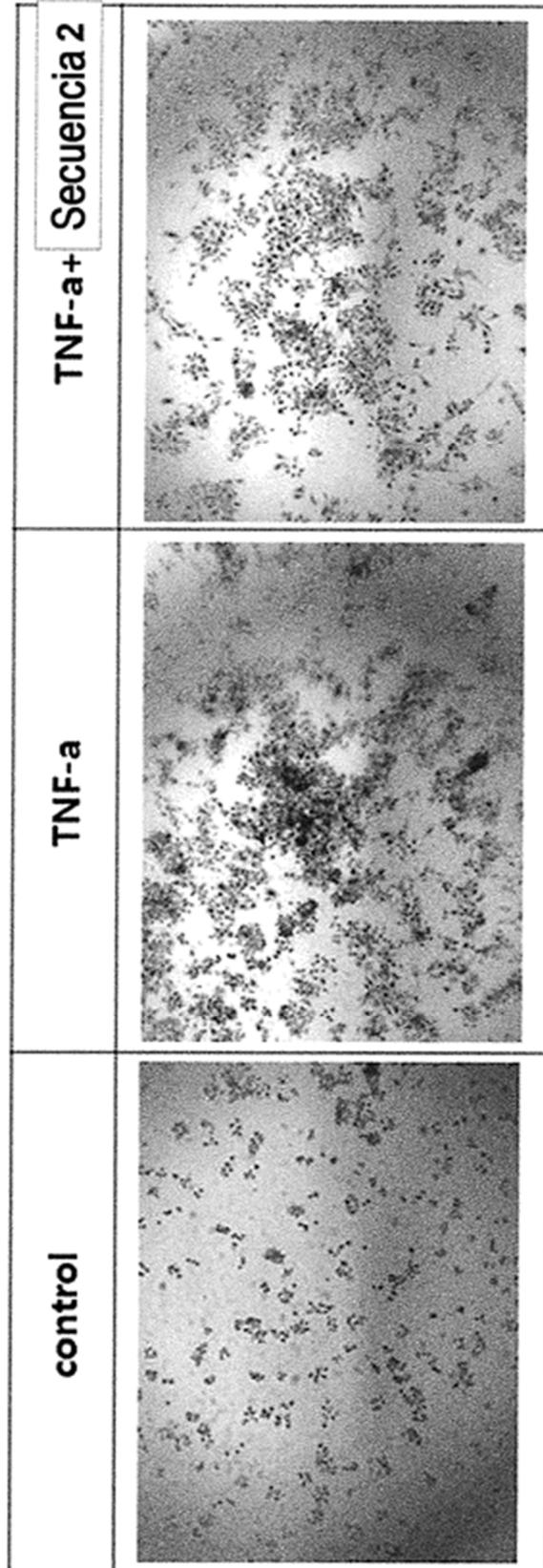
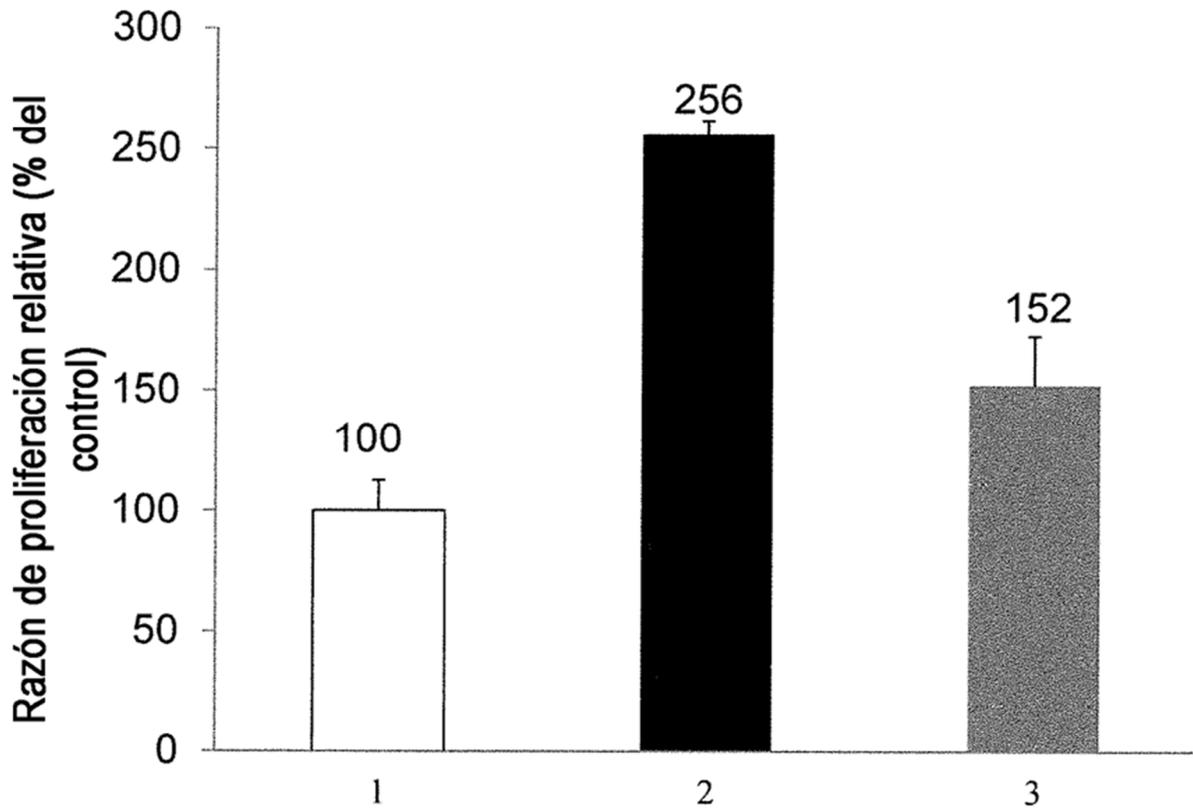


Fig. 2d



TNFα	-	+	+
Péptido	-	-	Secuencia 2

Fig. 2e

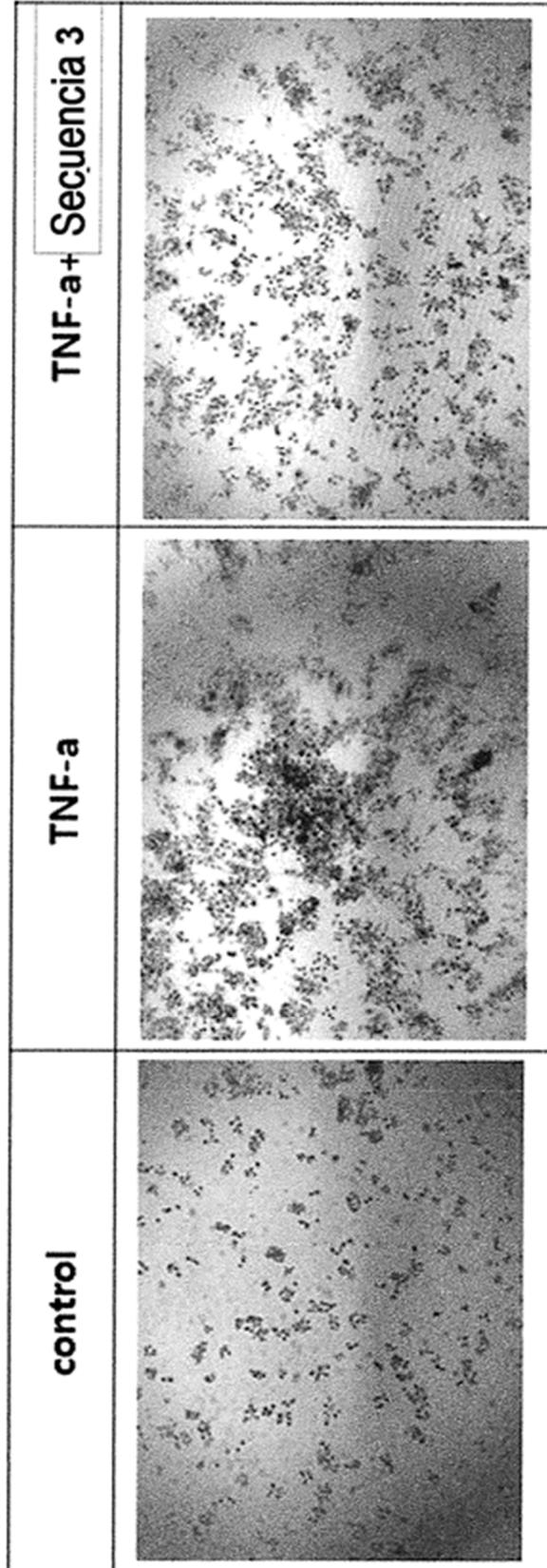


Fig. 2f

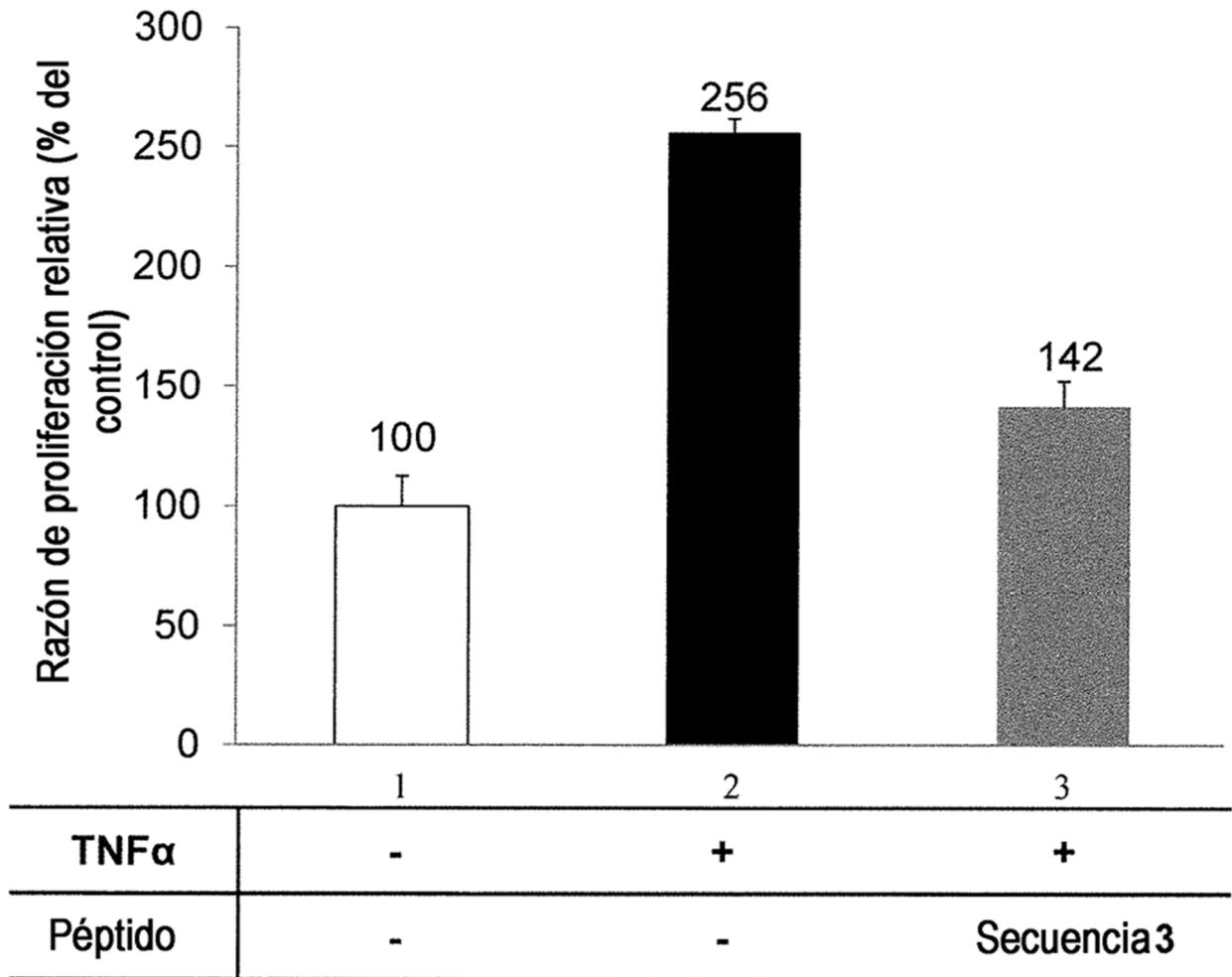


Fig. 3a

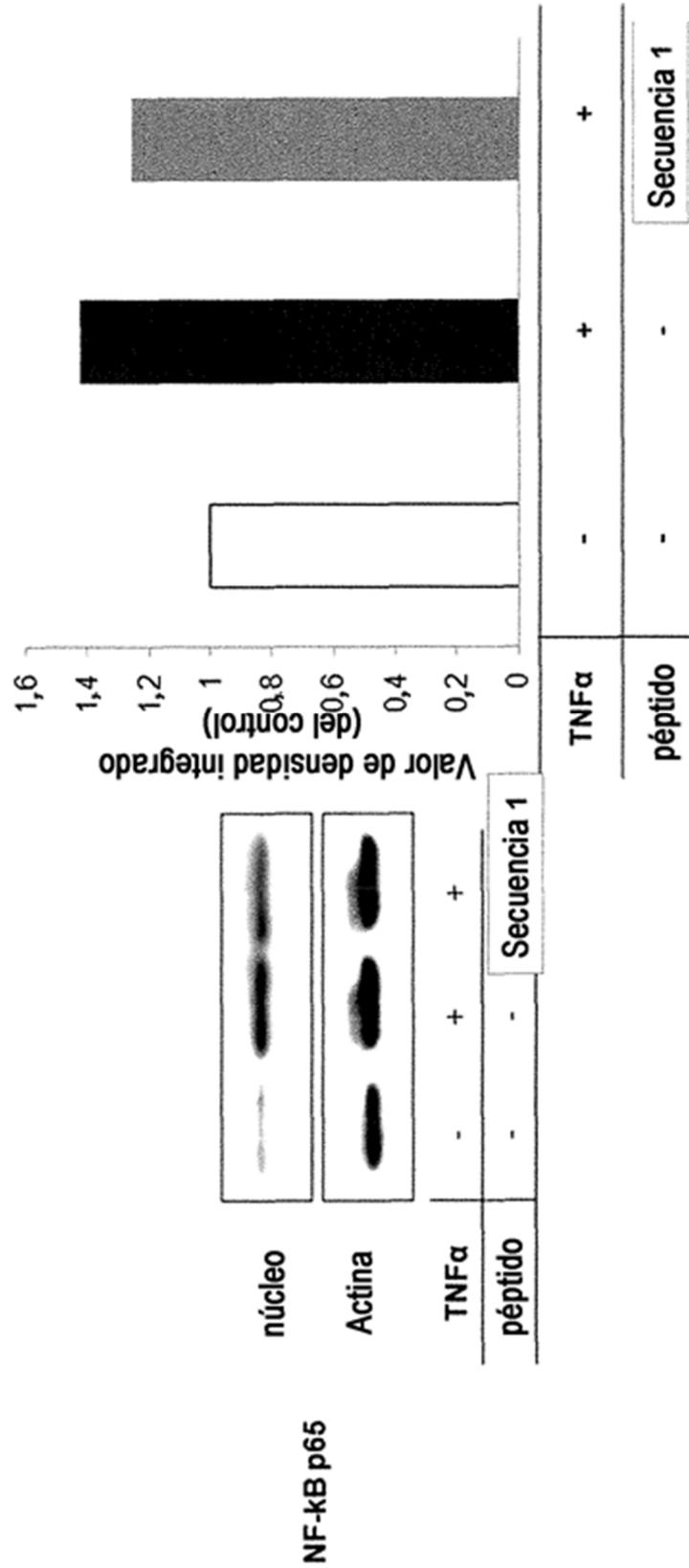


Fig. 3b

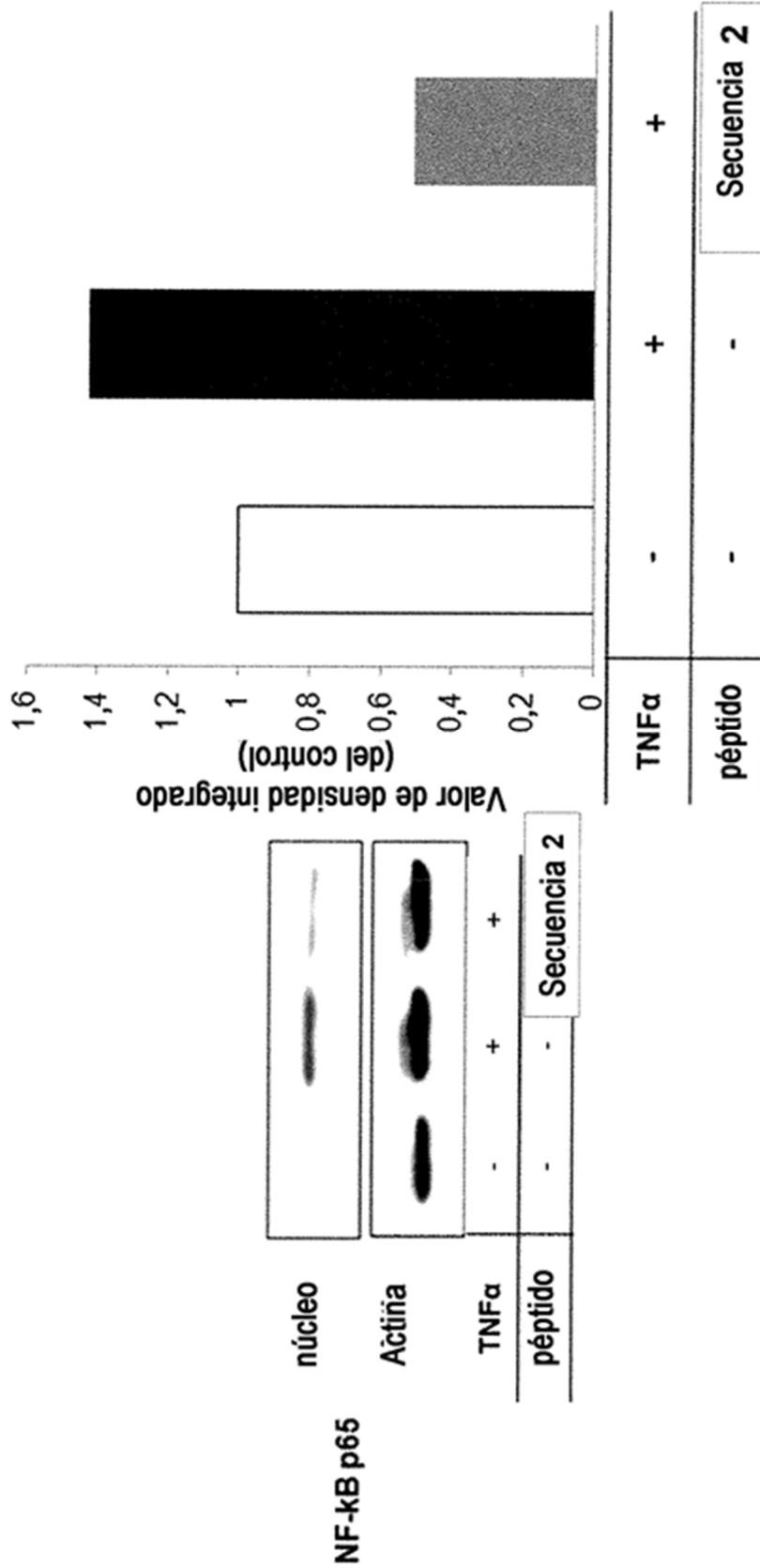


Fig. 3c

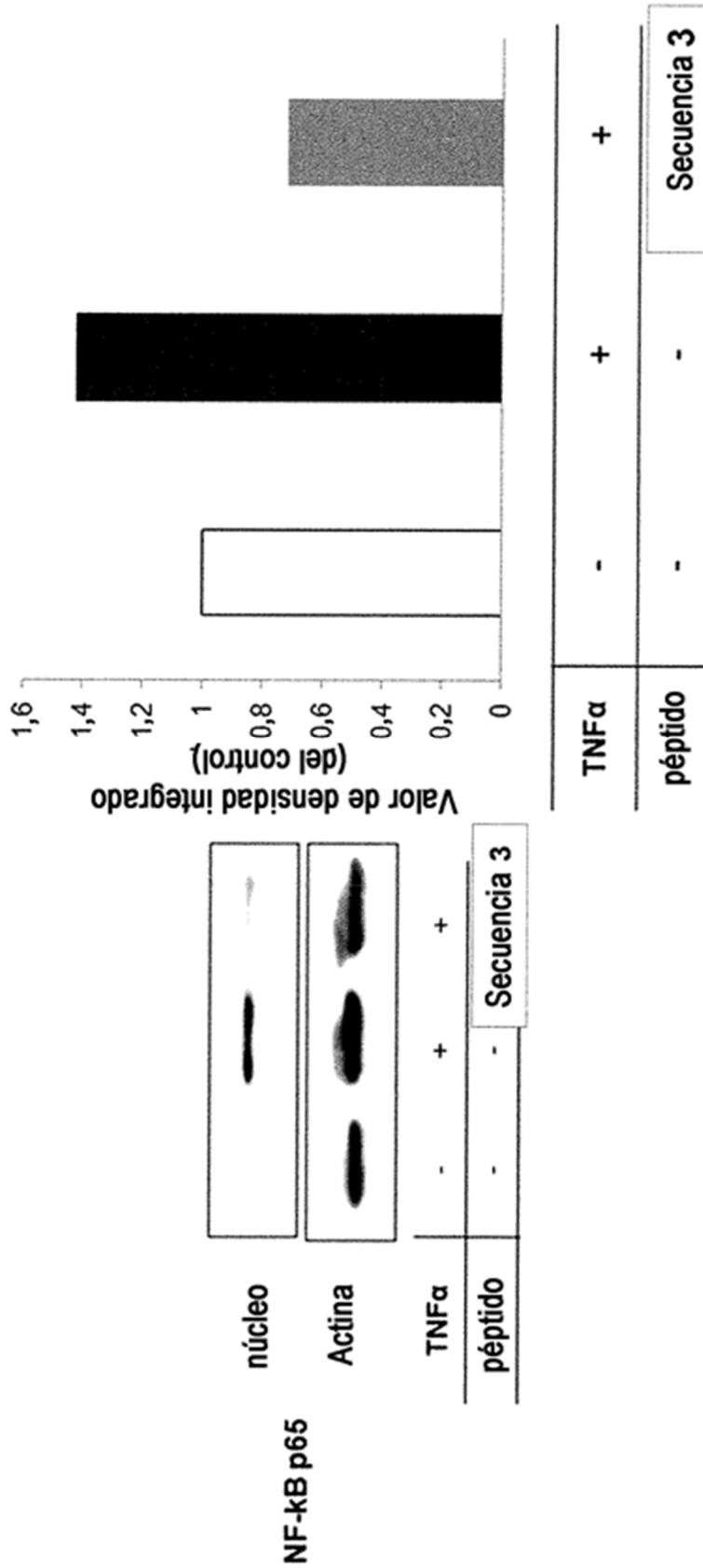


Fig. 4a

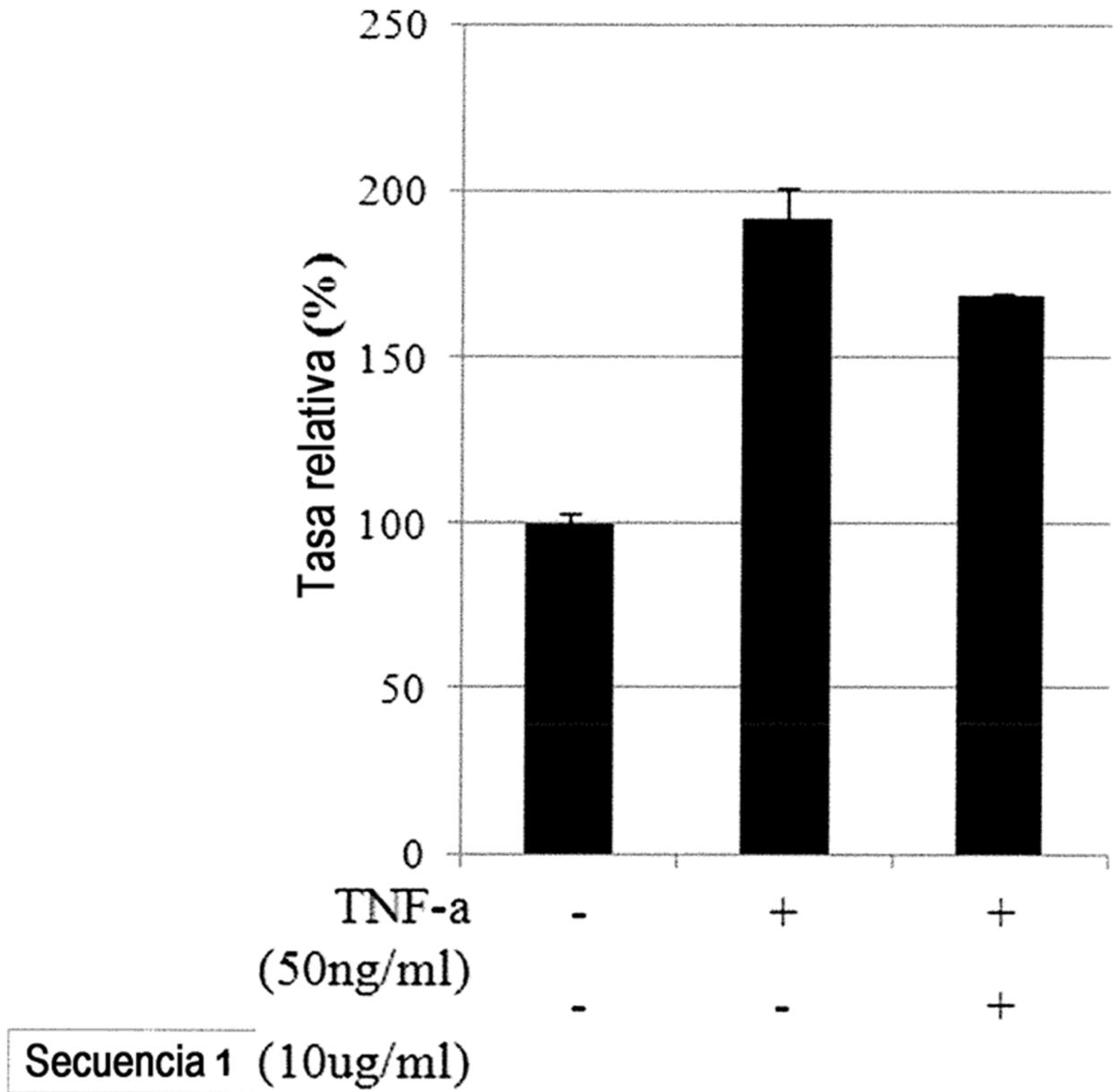


Fig. 4b

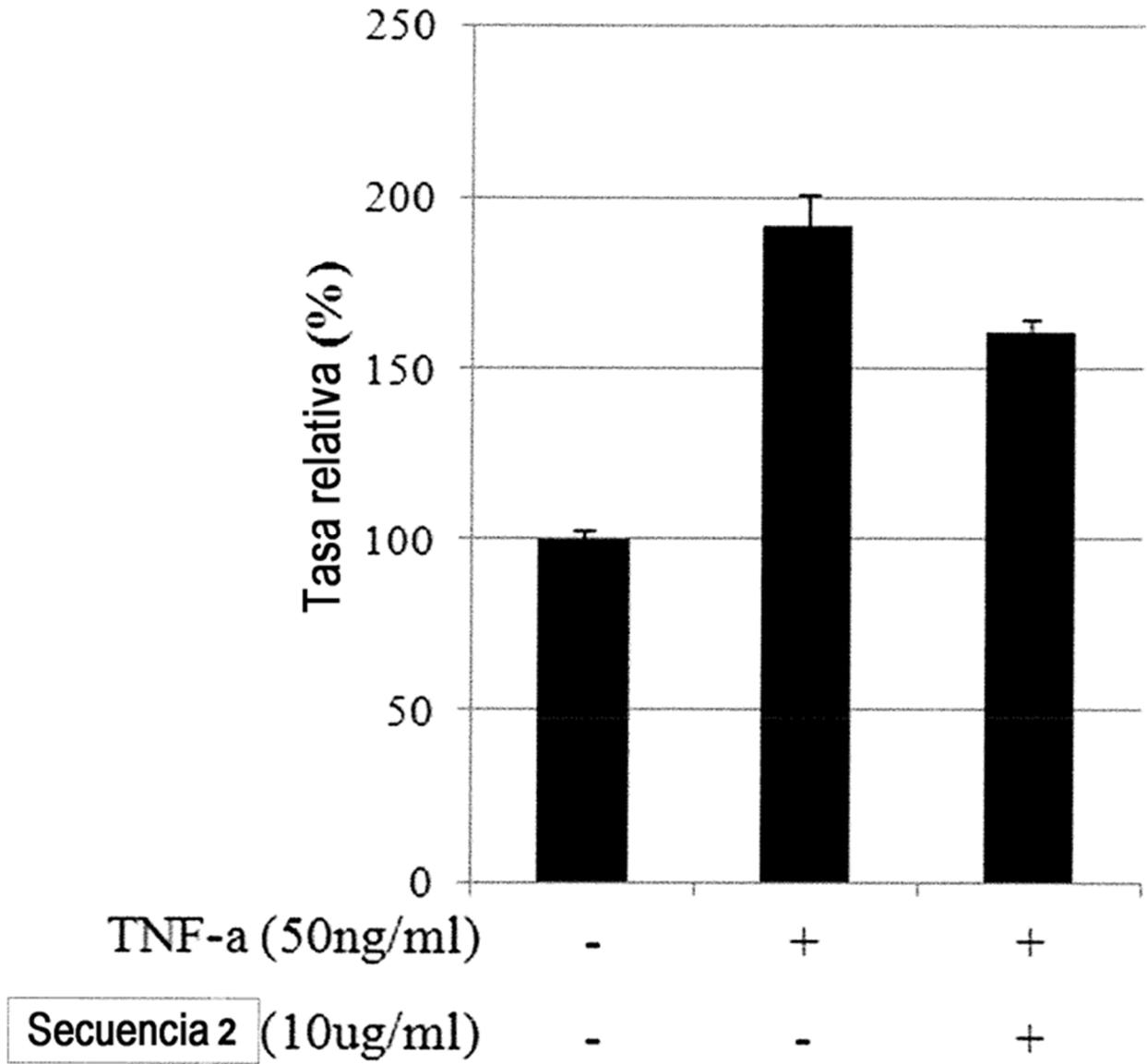


Fig. 4c

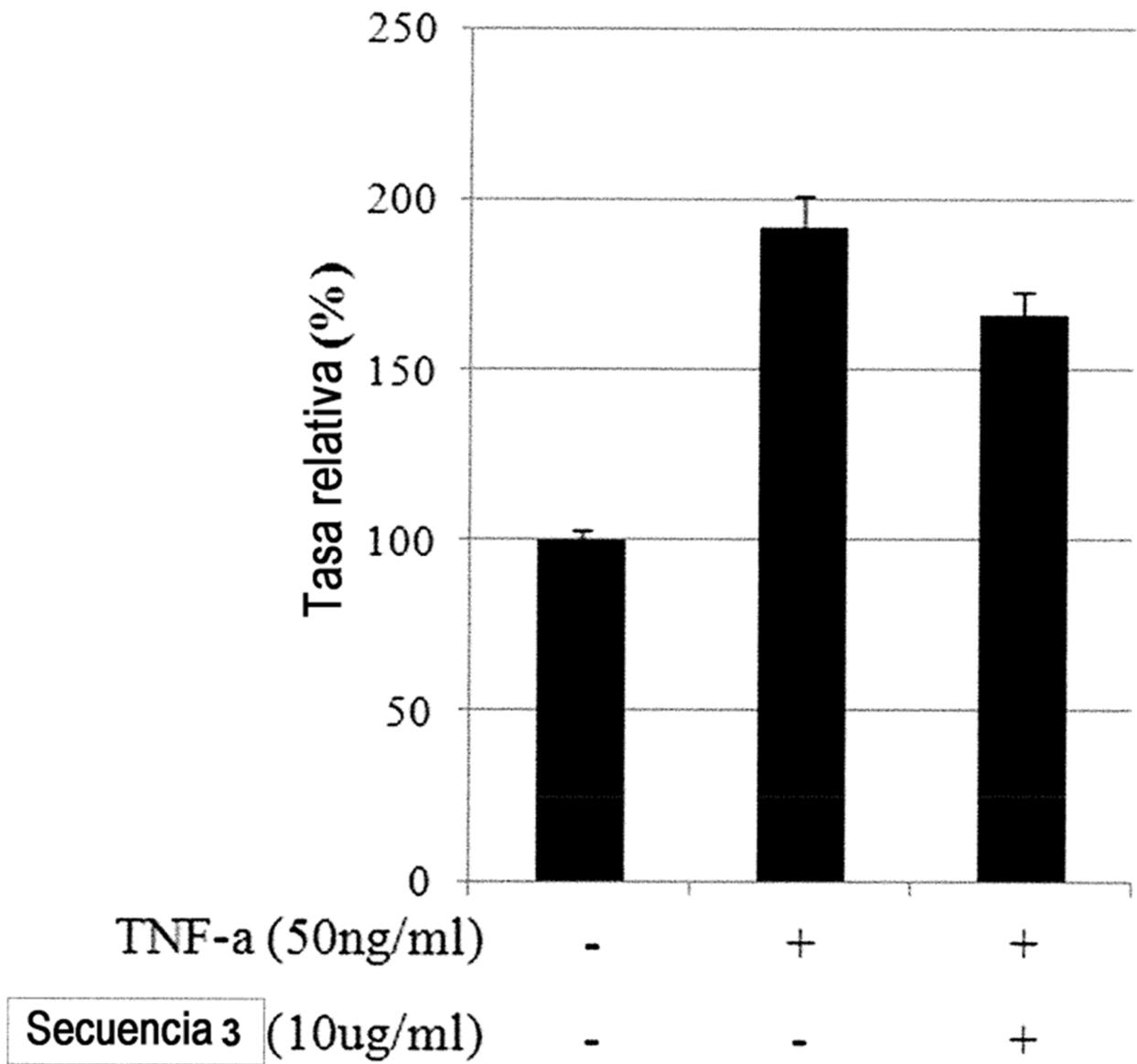


Fig. 5a

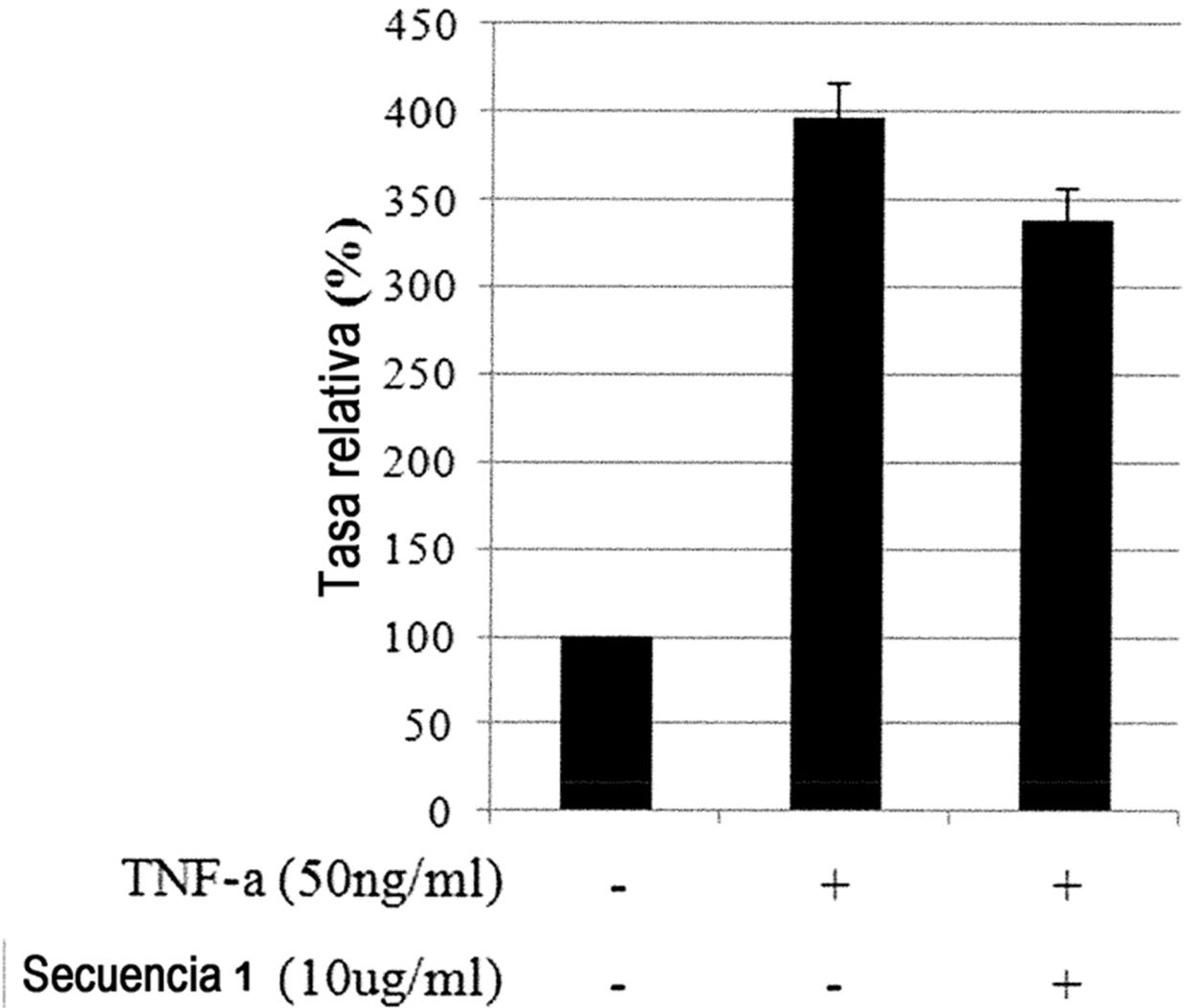


Fig. 5b

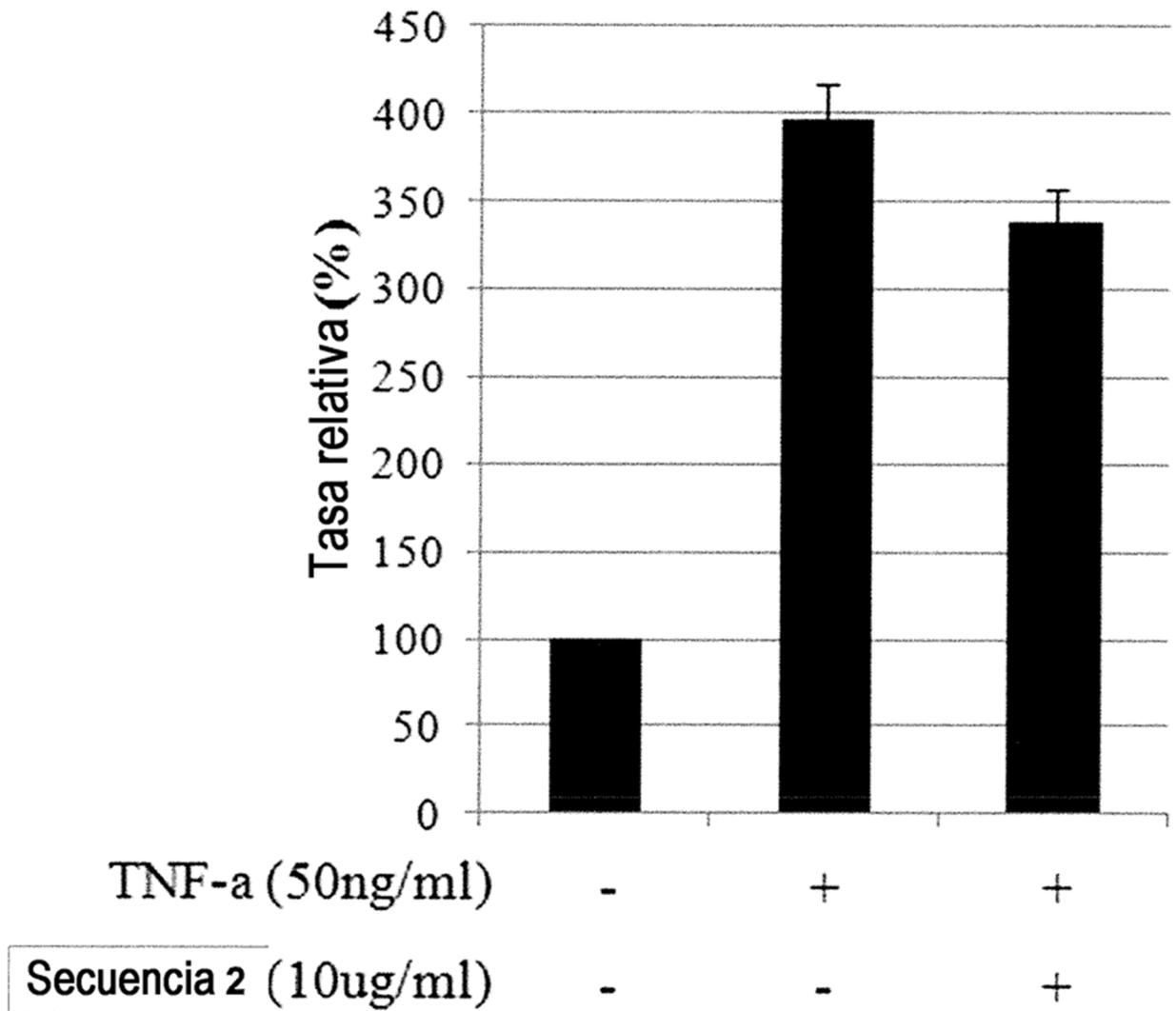


Fig. 5c

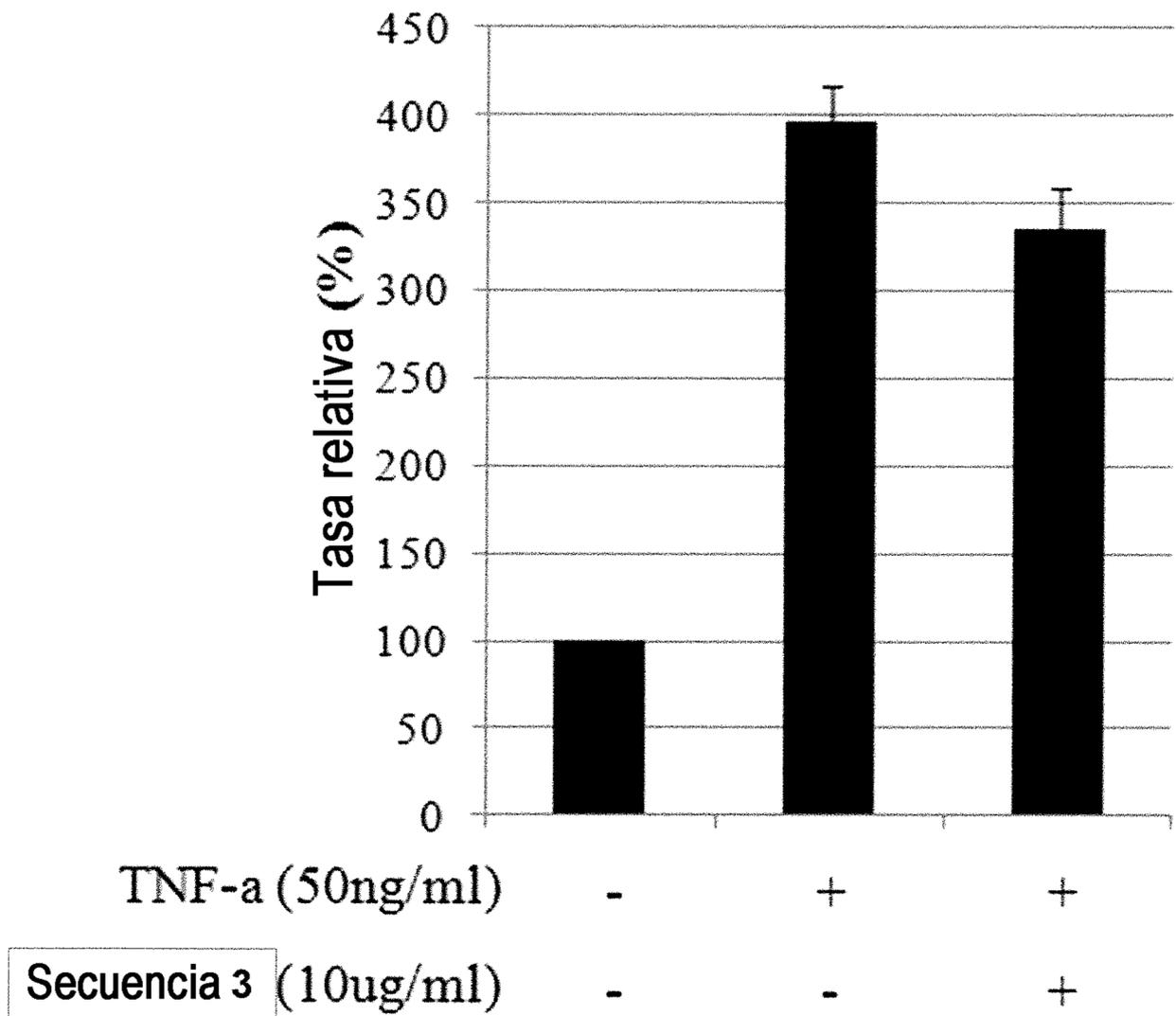


Fig. 6

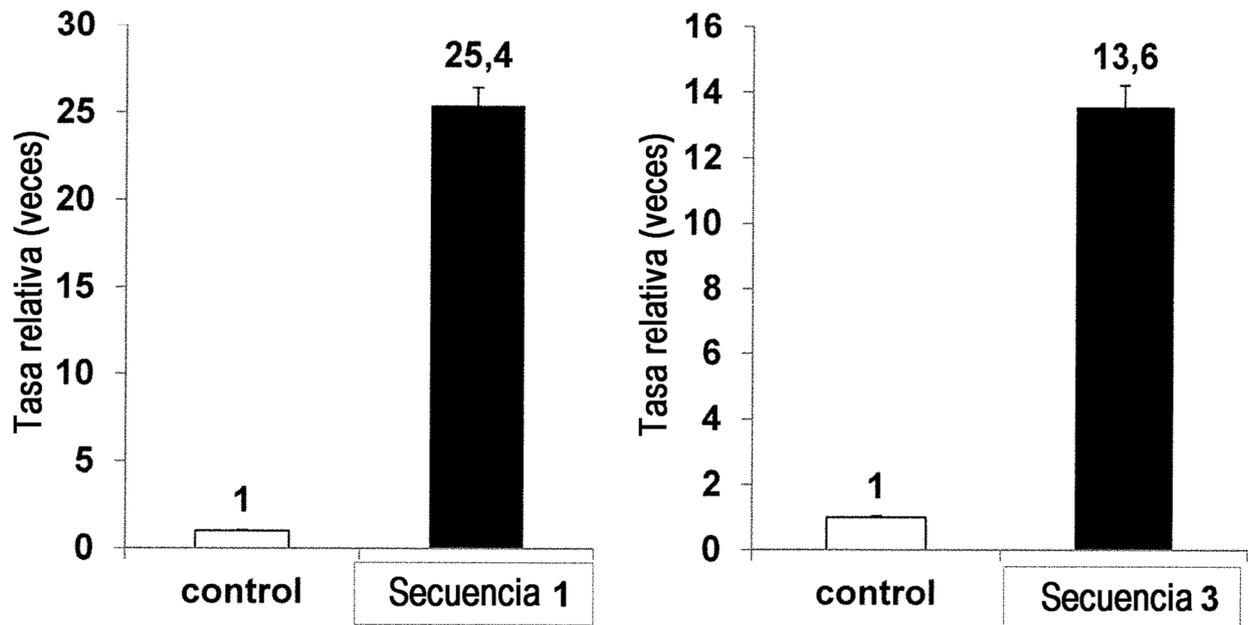


Fig. 7

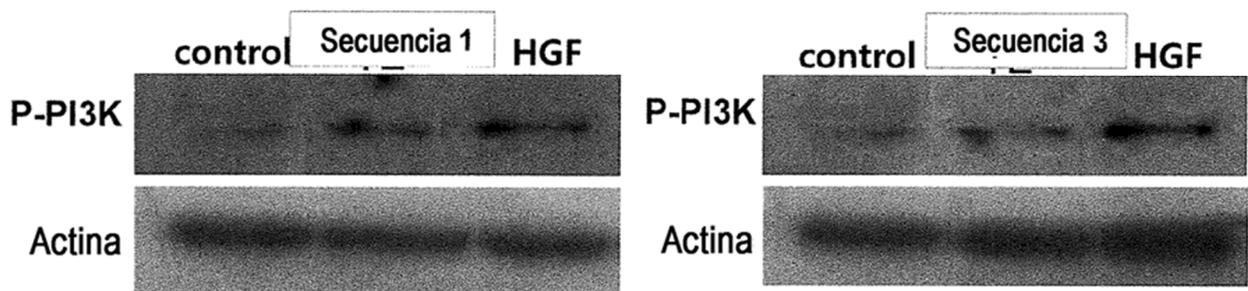


Fig. 8

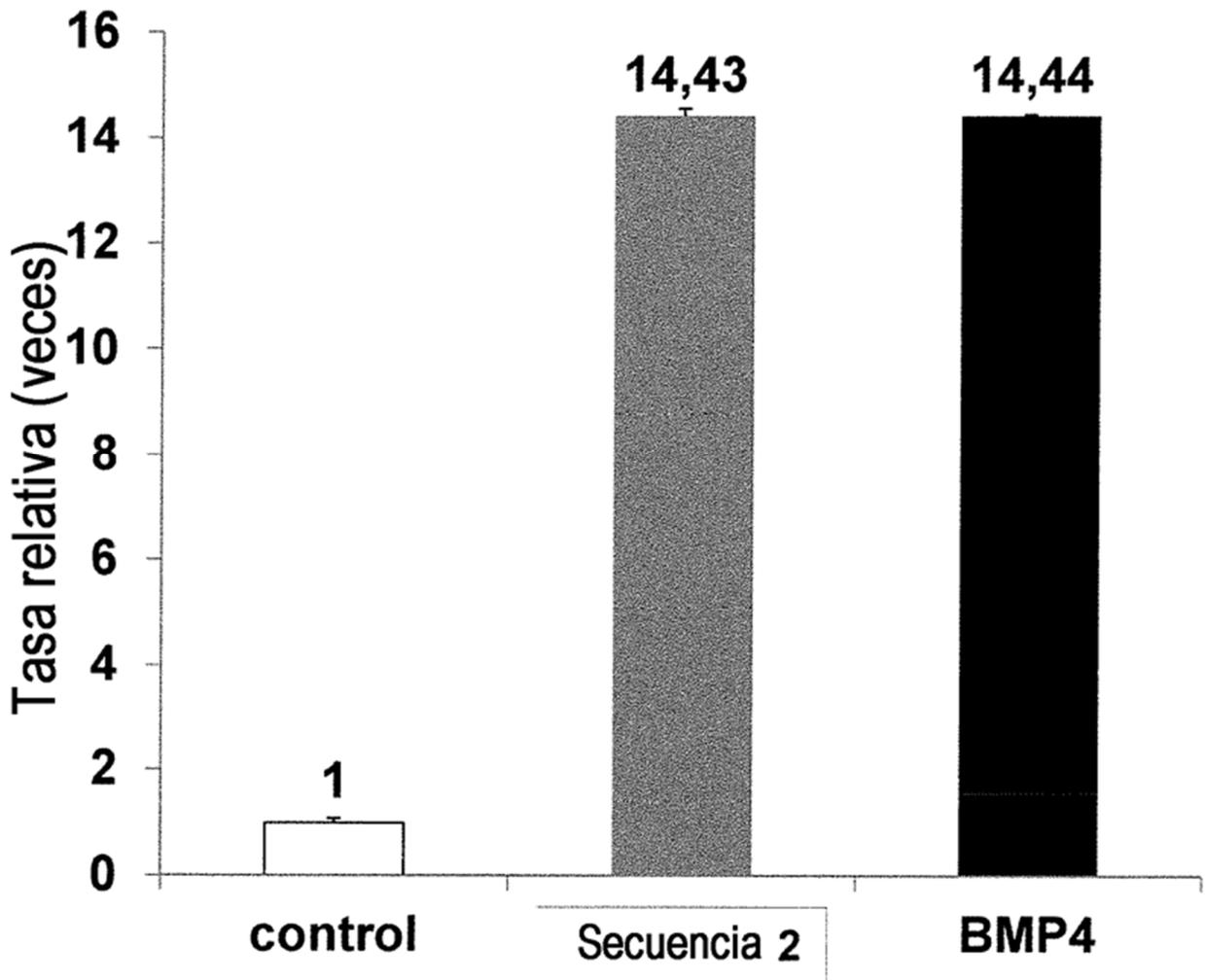


Fig. 9

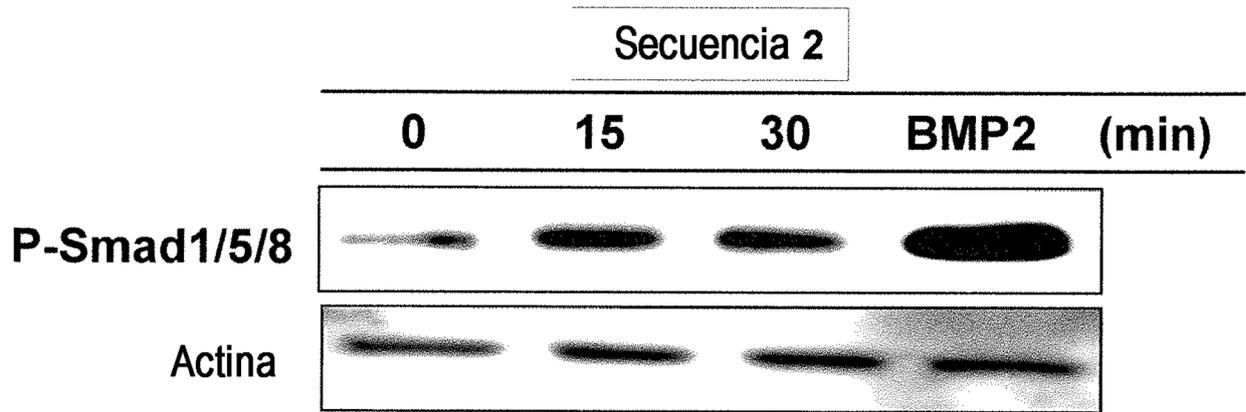


Fig. 10a

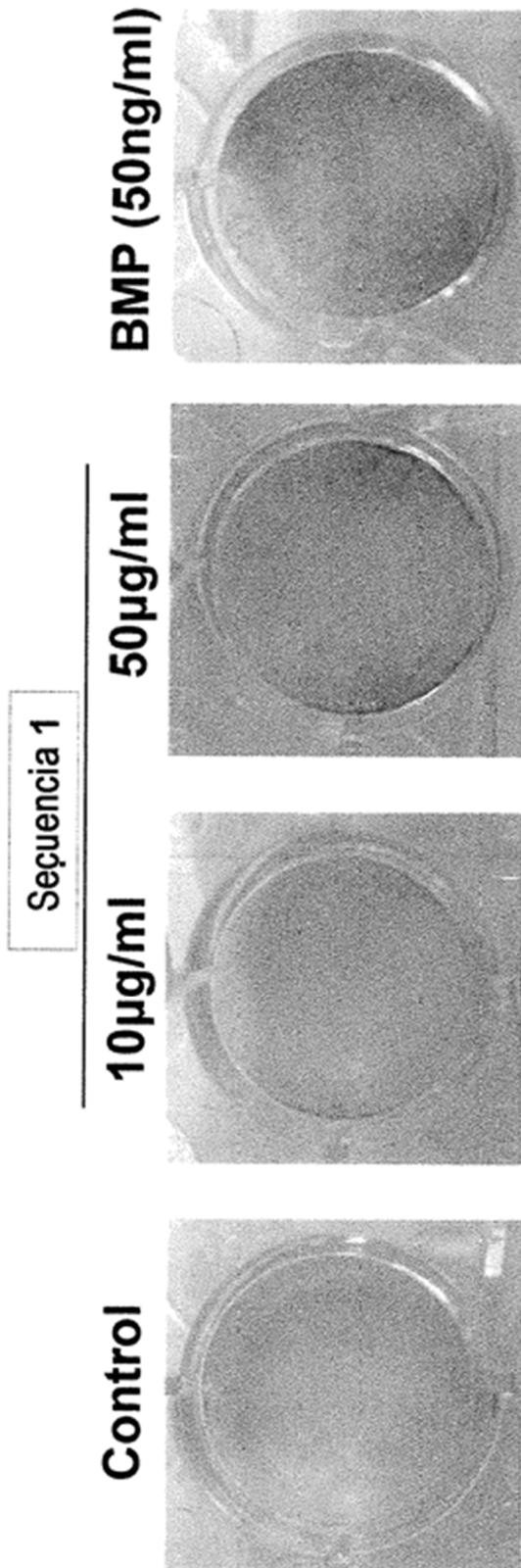


Fig. 10b

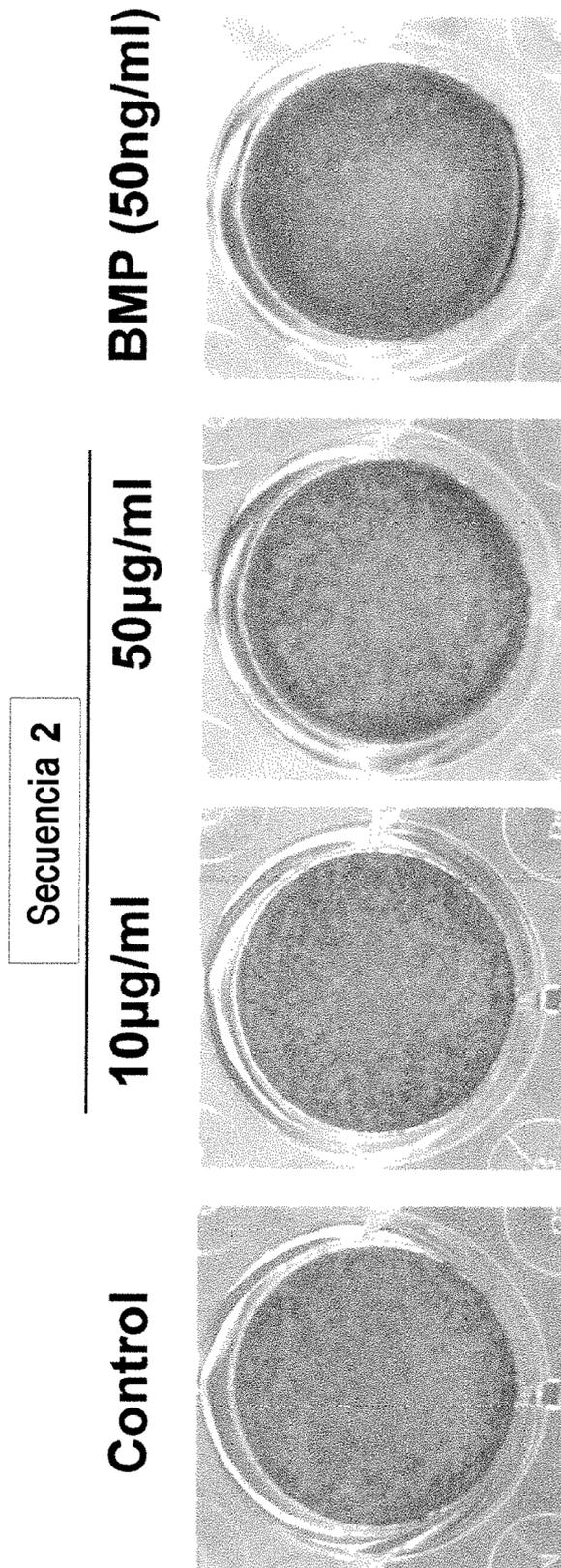


Fig. 10c

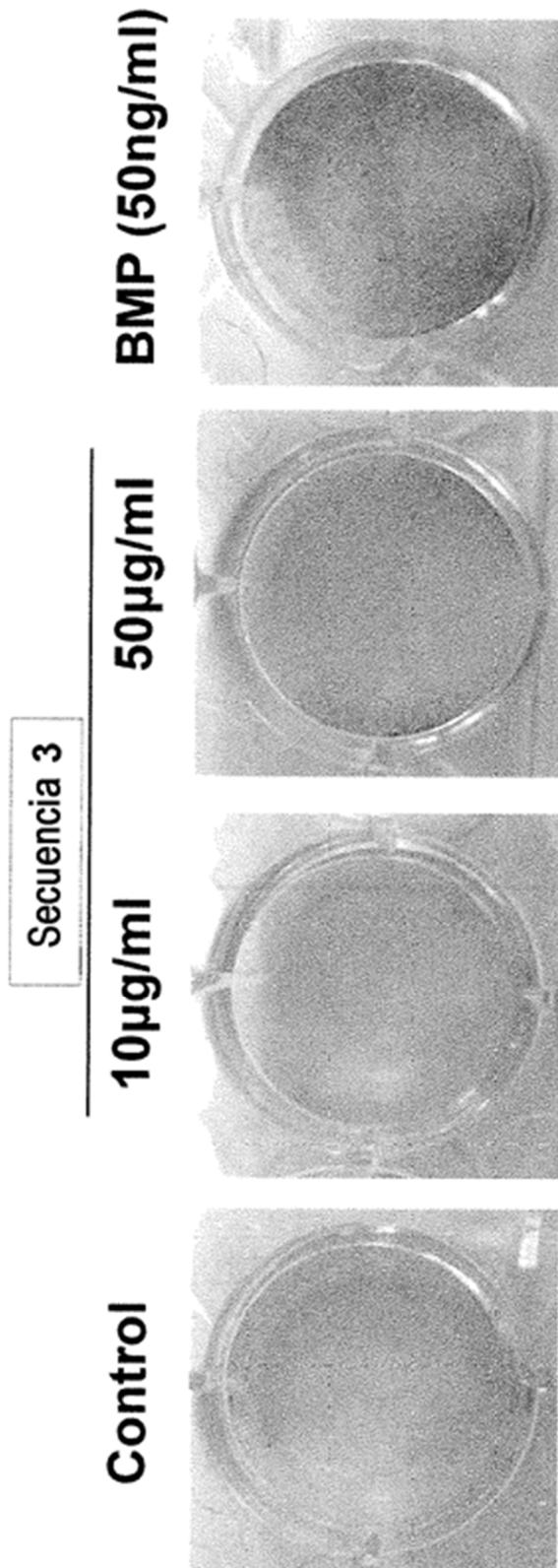


Fig. 11a

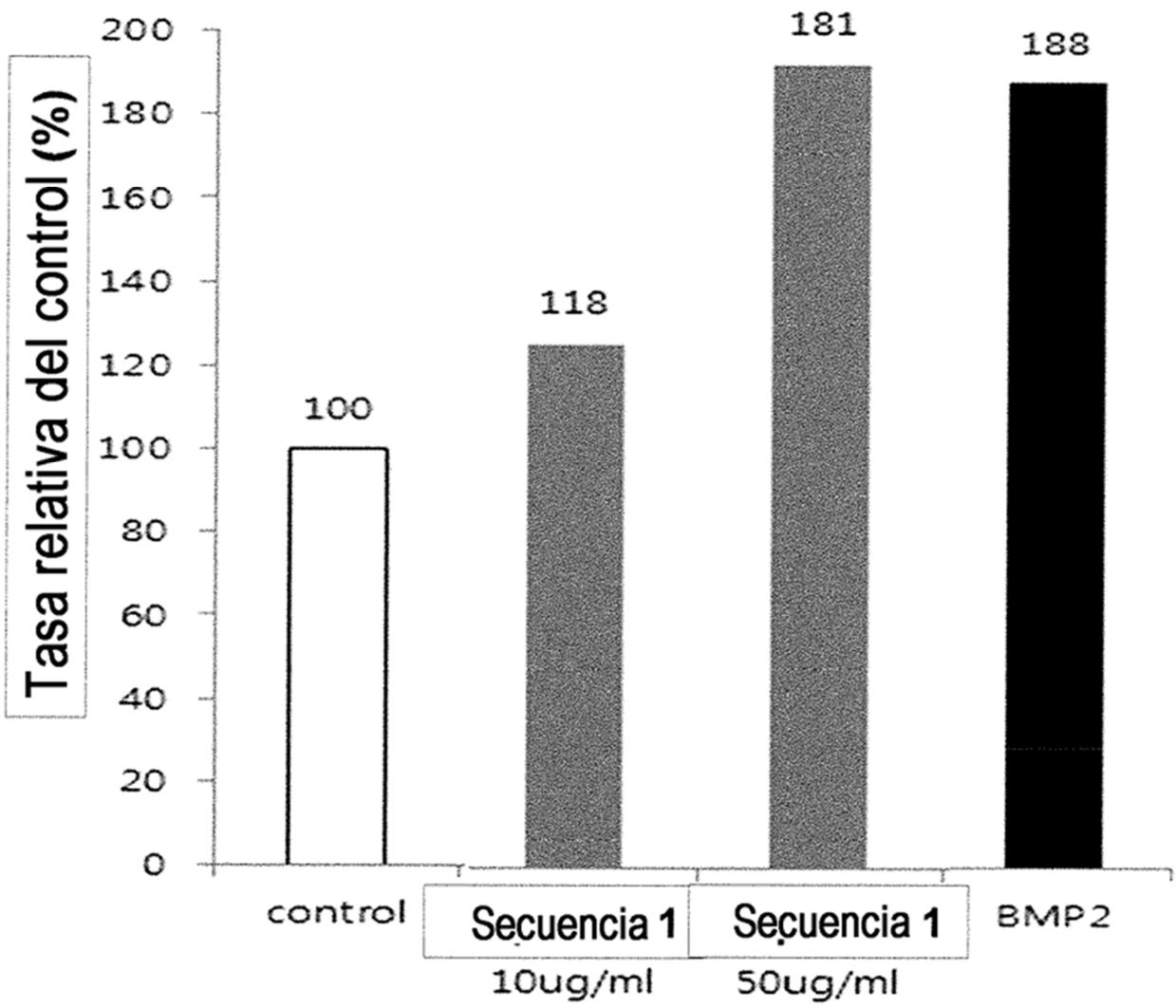


Fig. 11b

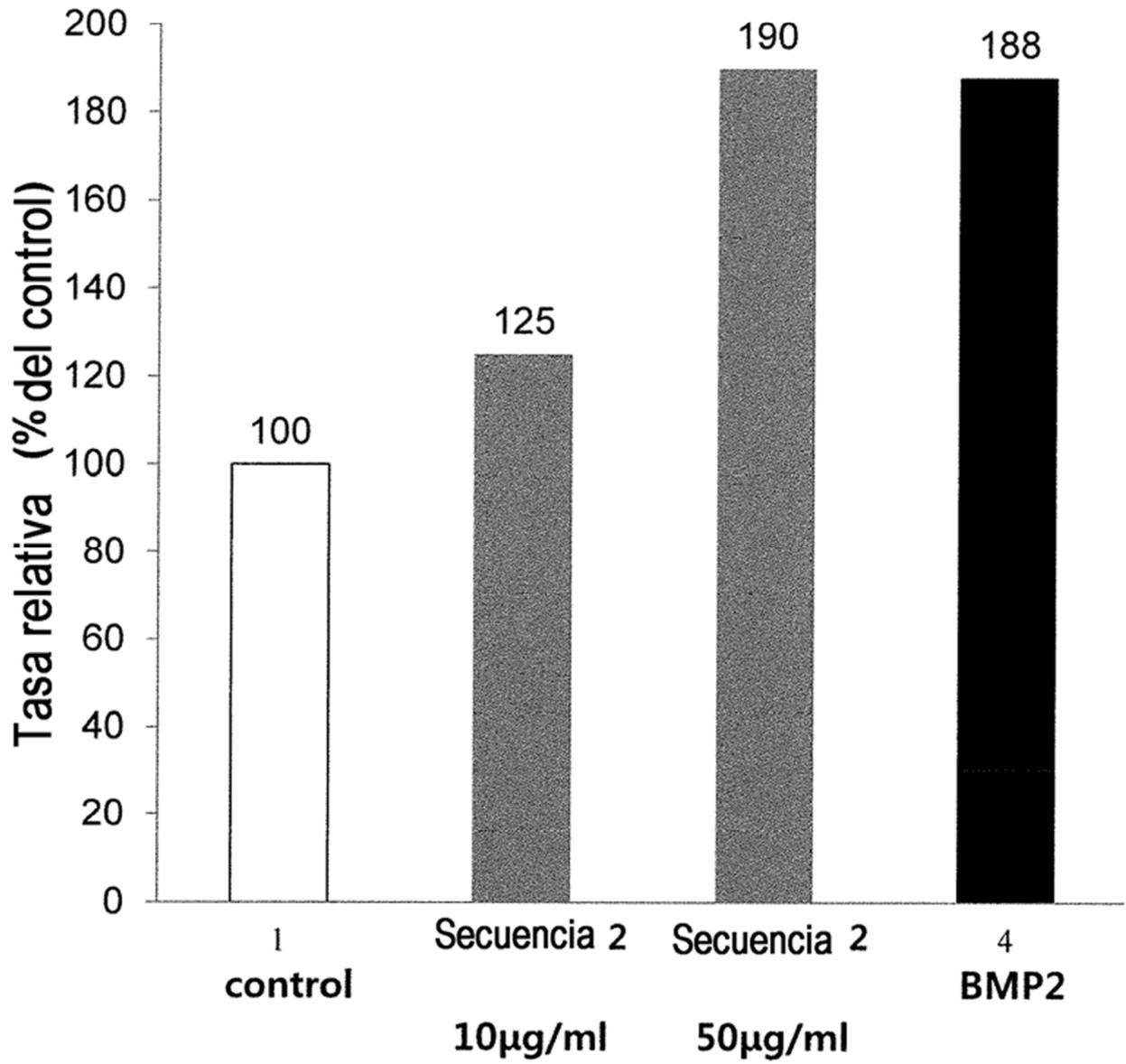


Fig. 11c

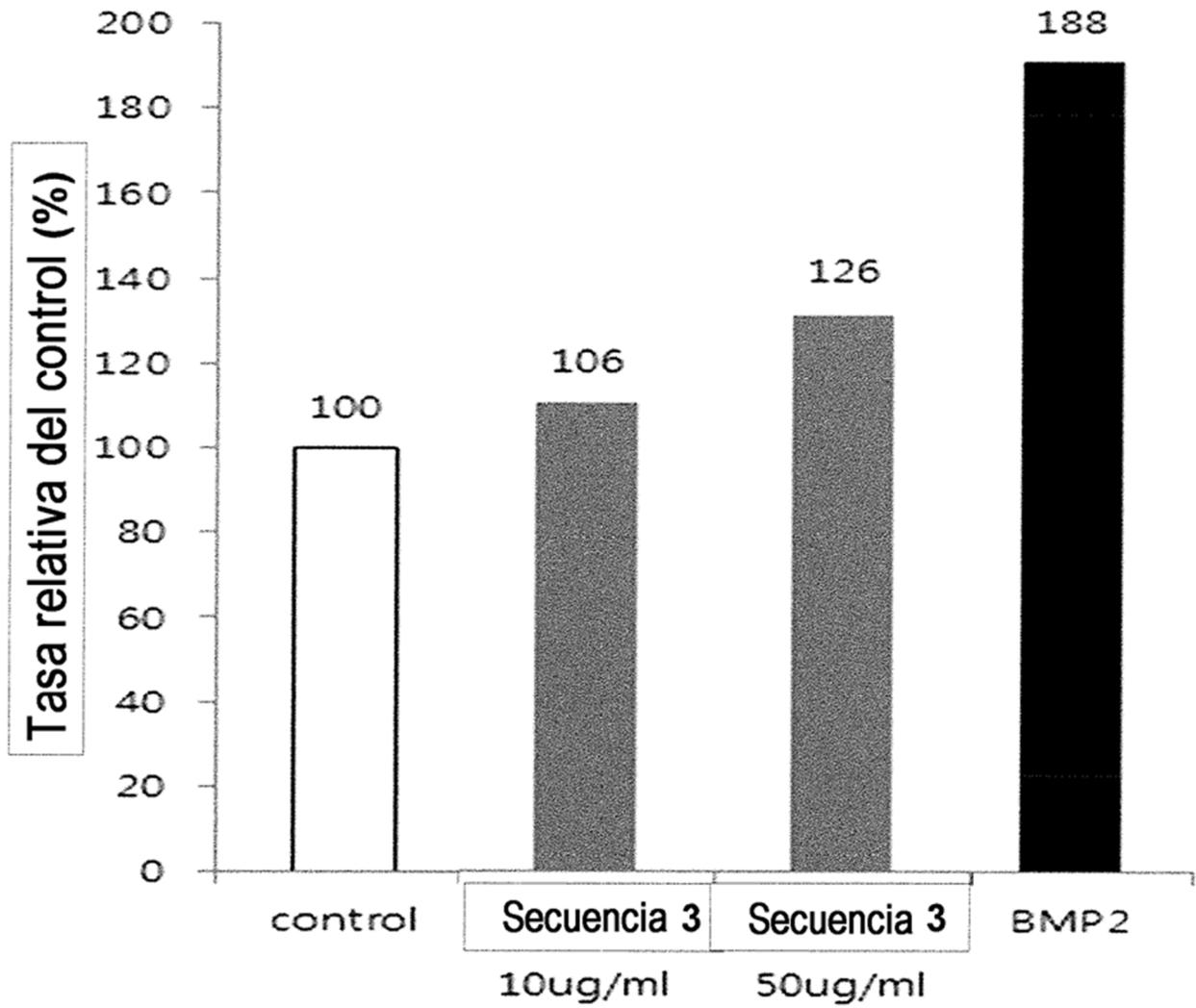


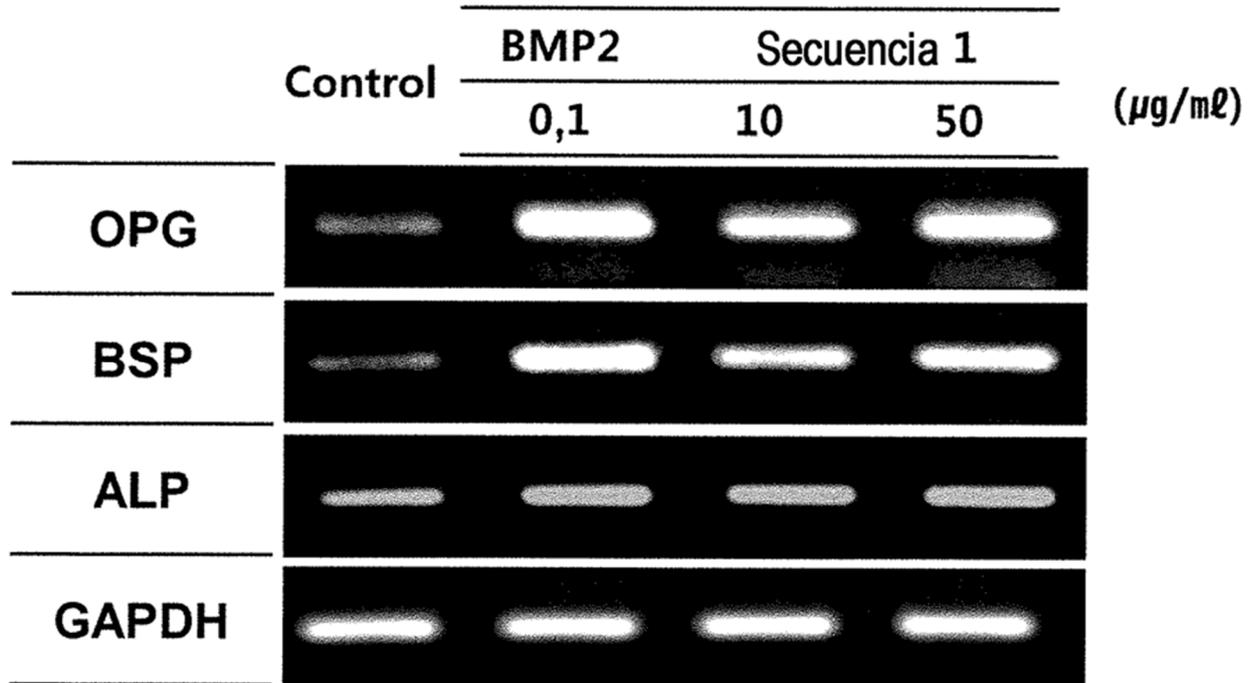
Fig. 12a

Fig. 12b

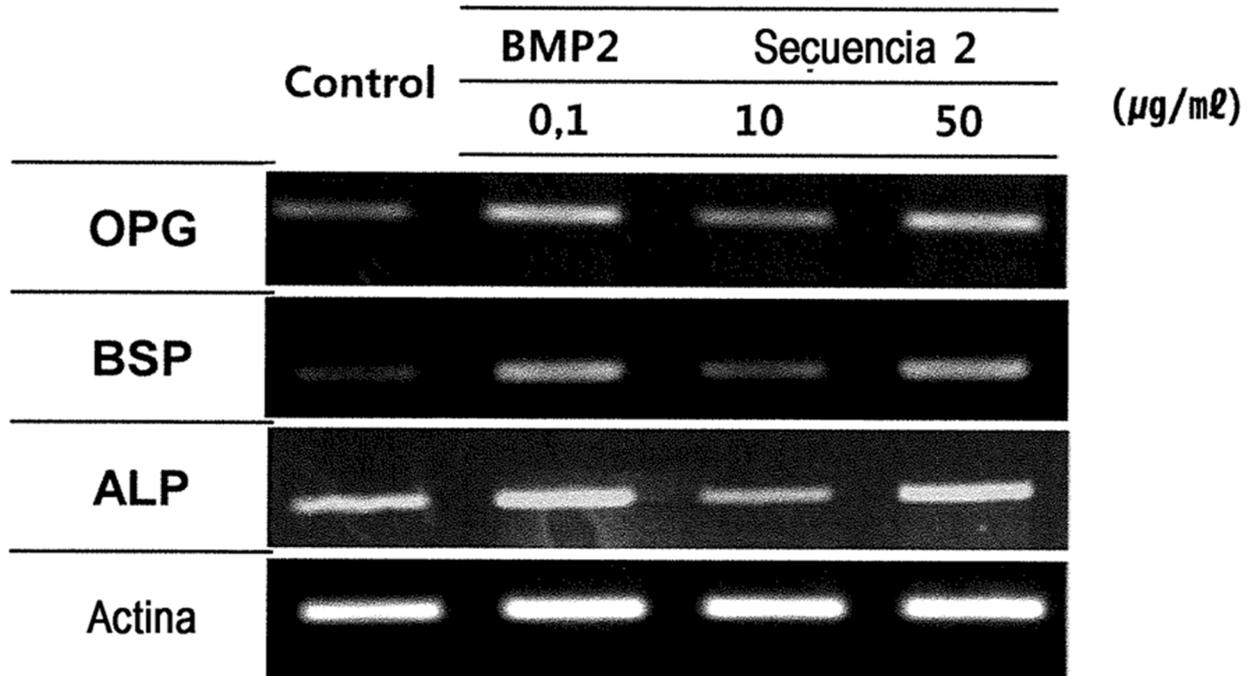


Fig. 12c

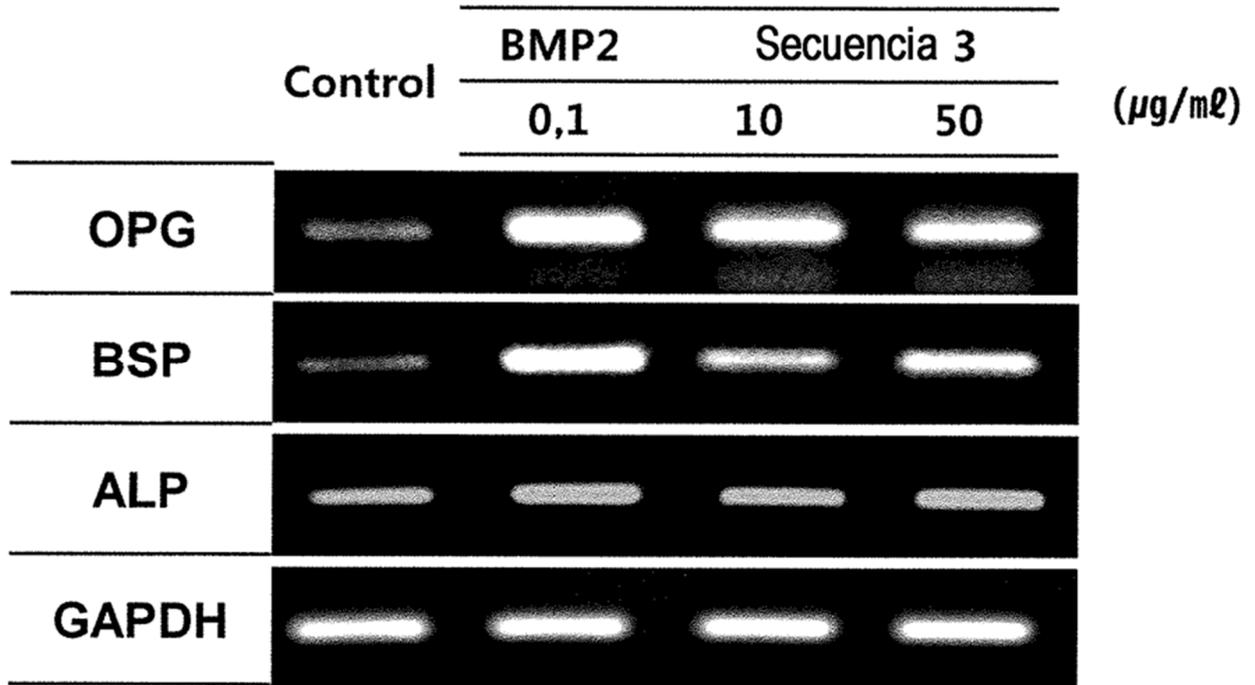


Fig. 13a

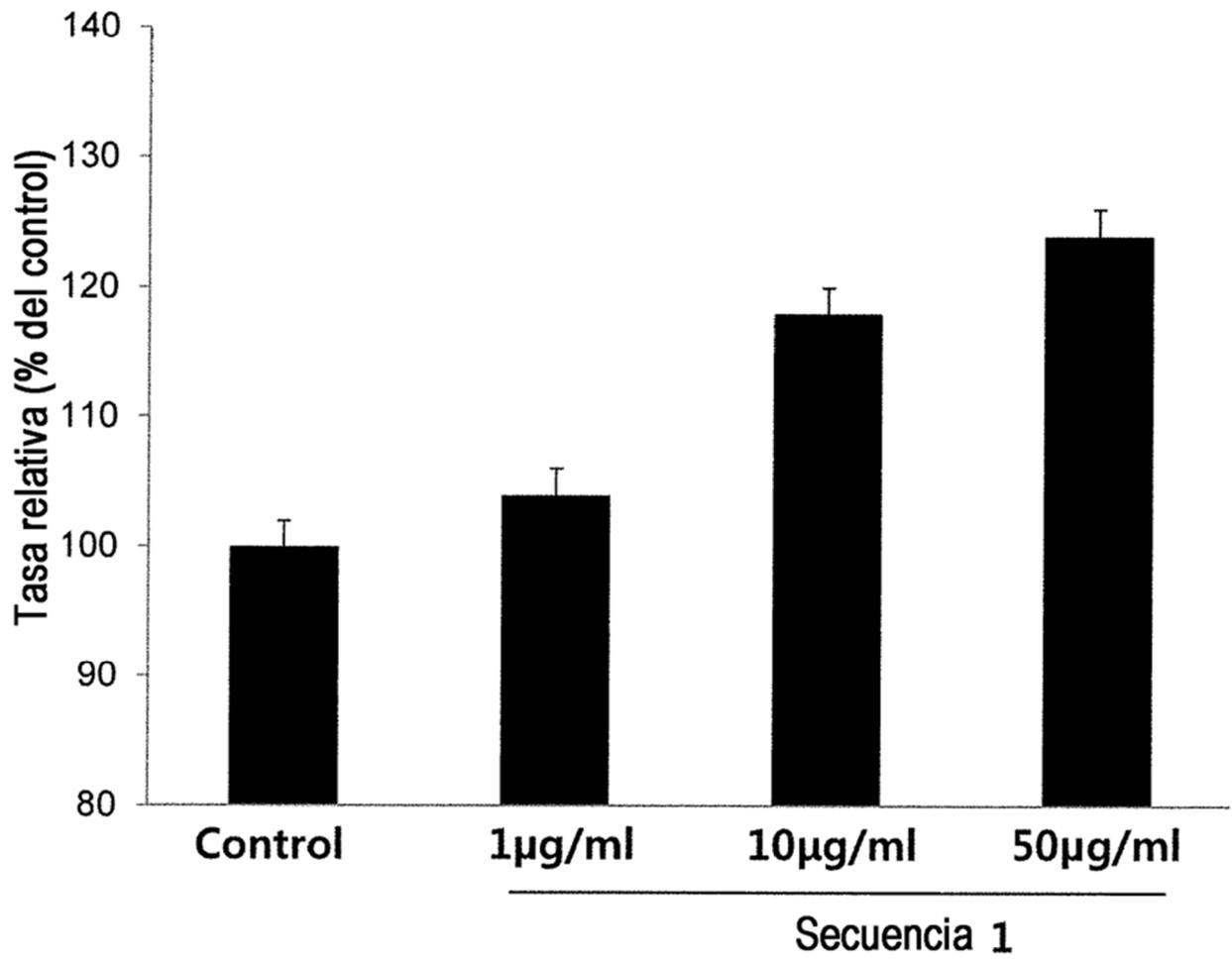


Fig. 13b

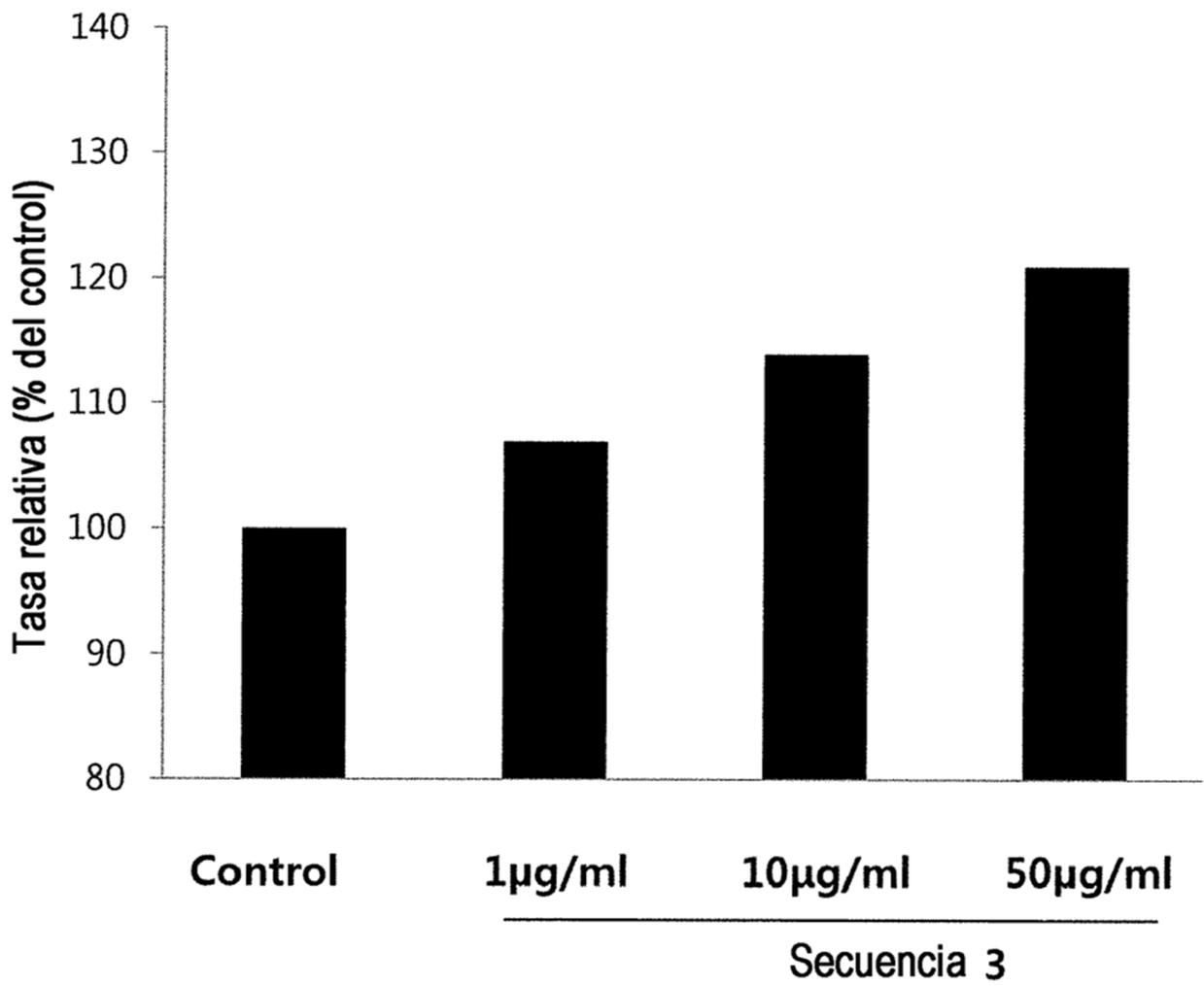


Fig. 14a

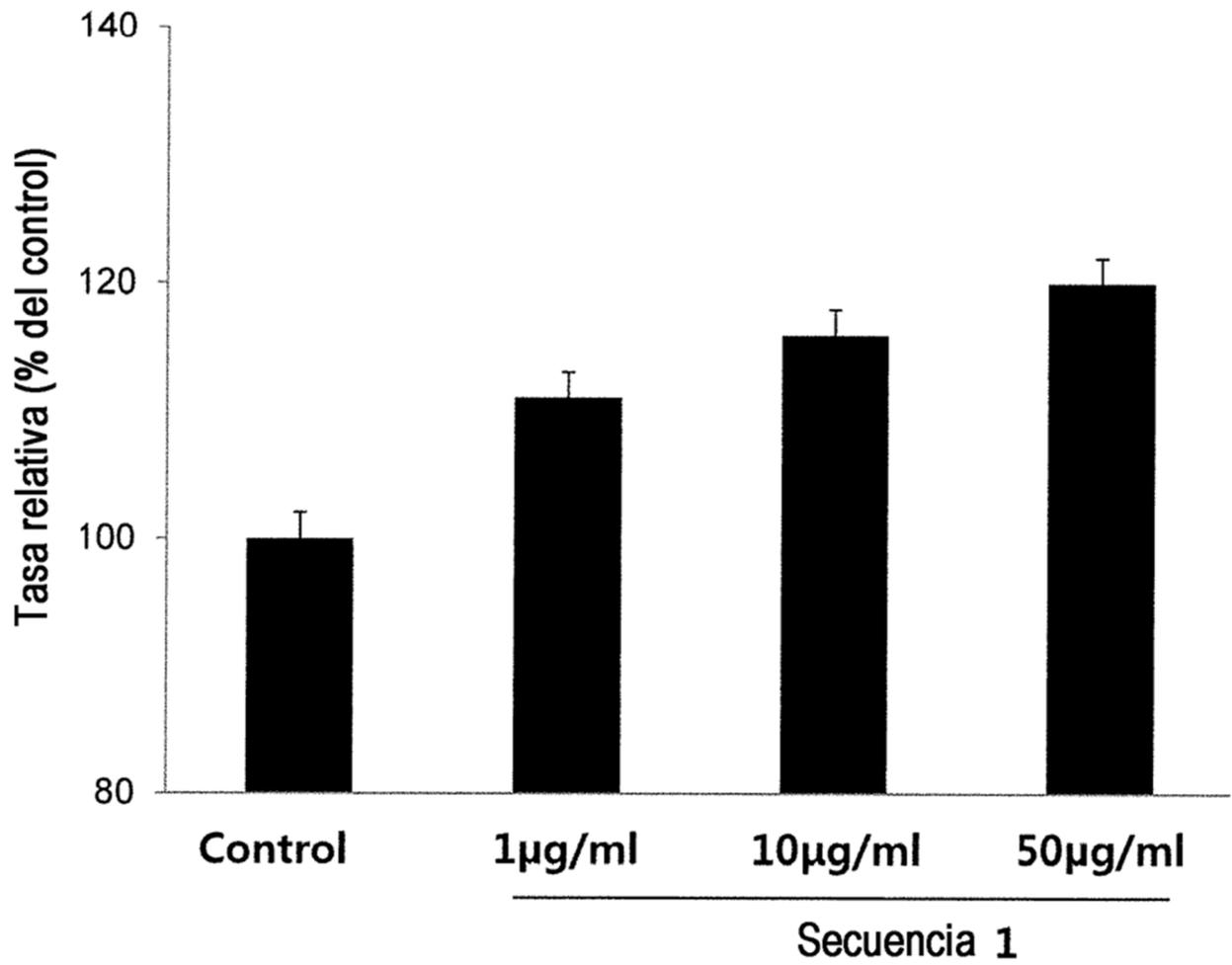


Fig. 14b

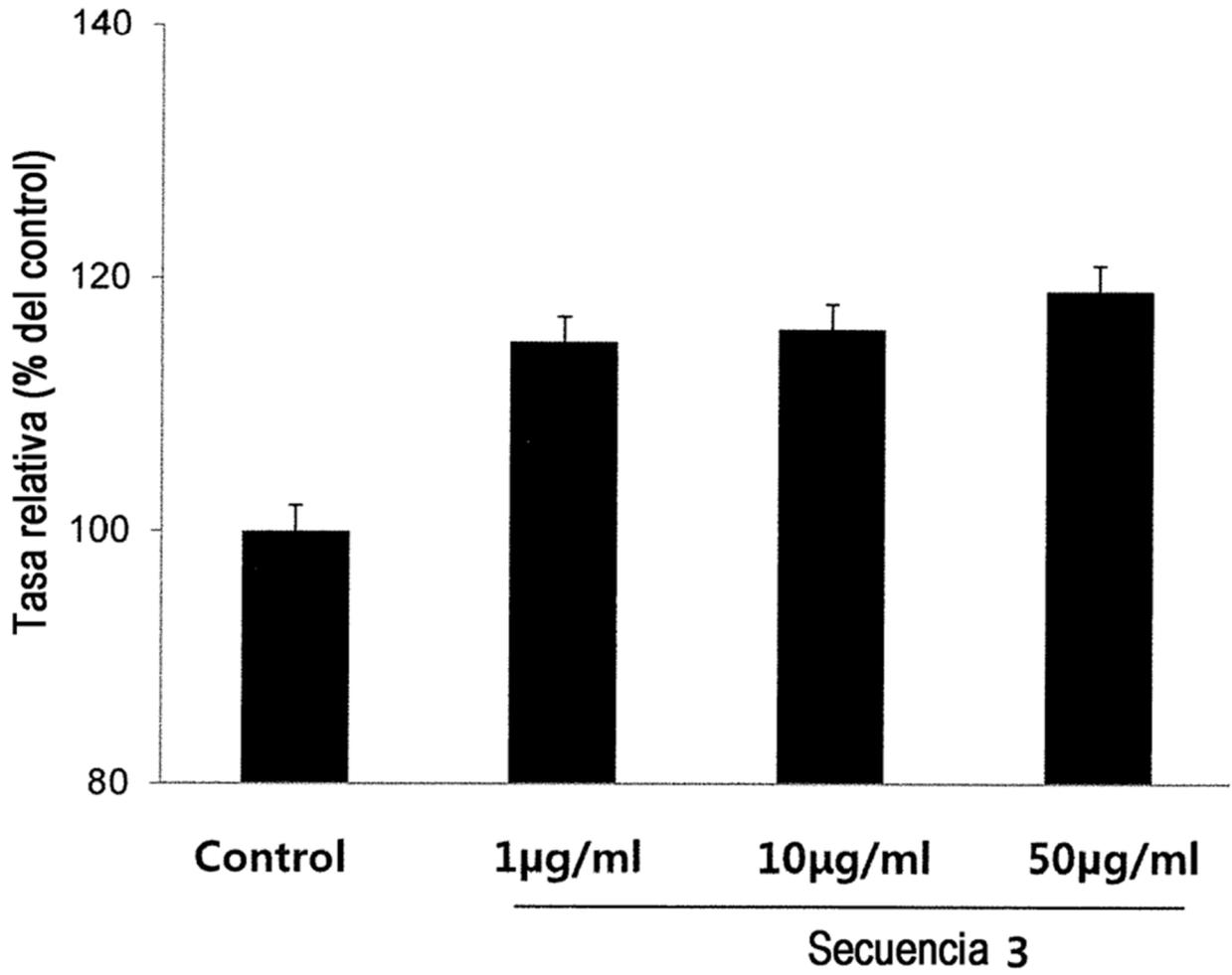


Fig. 15a

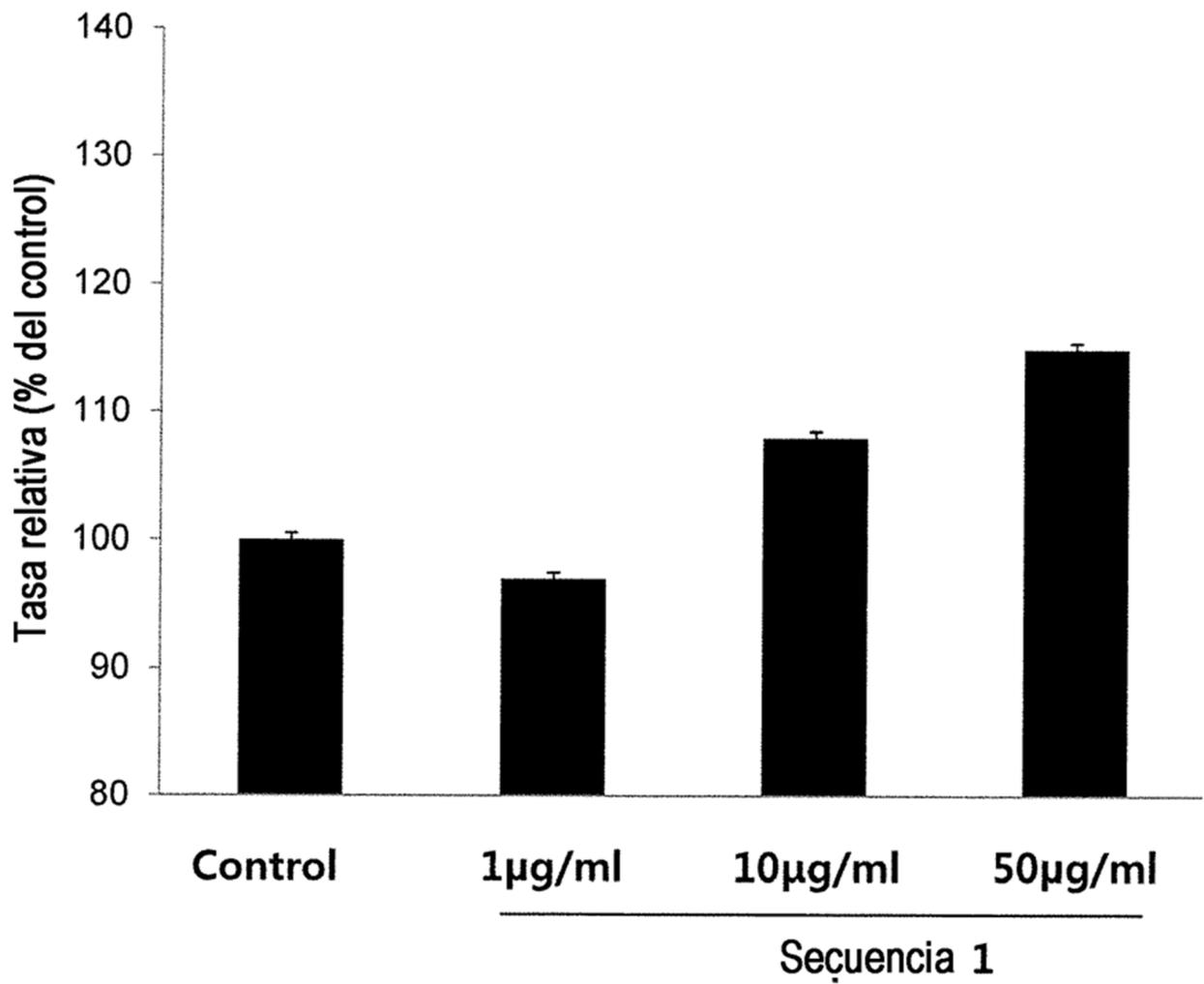


Fig. 15b

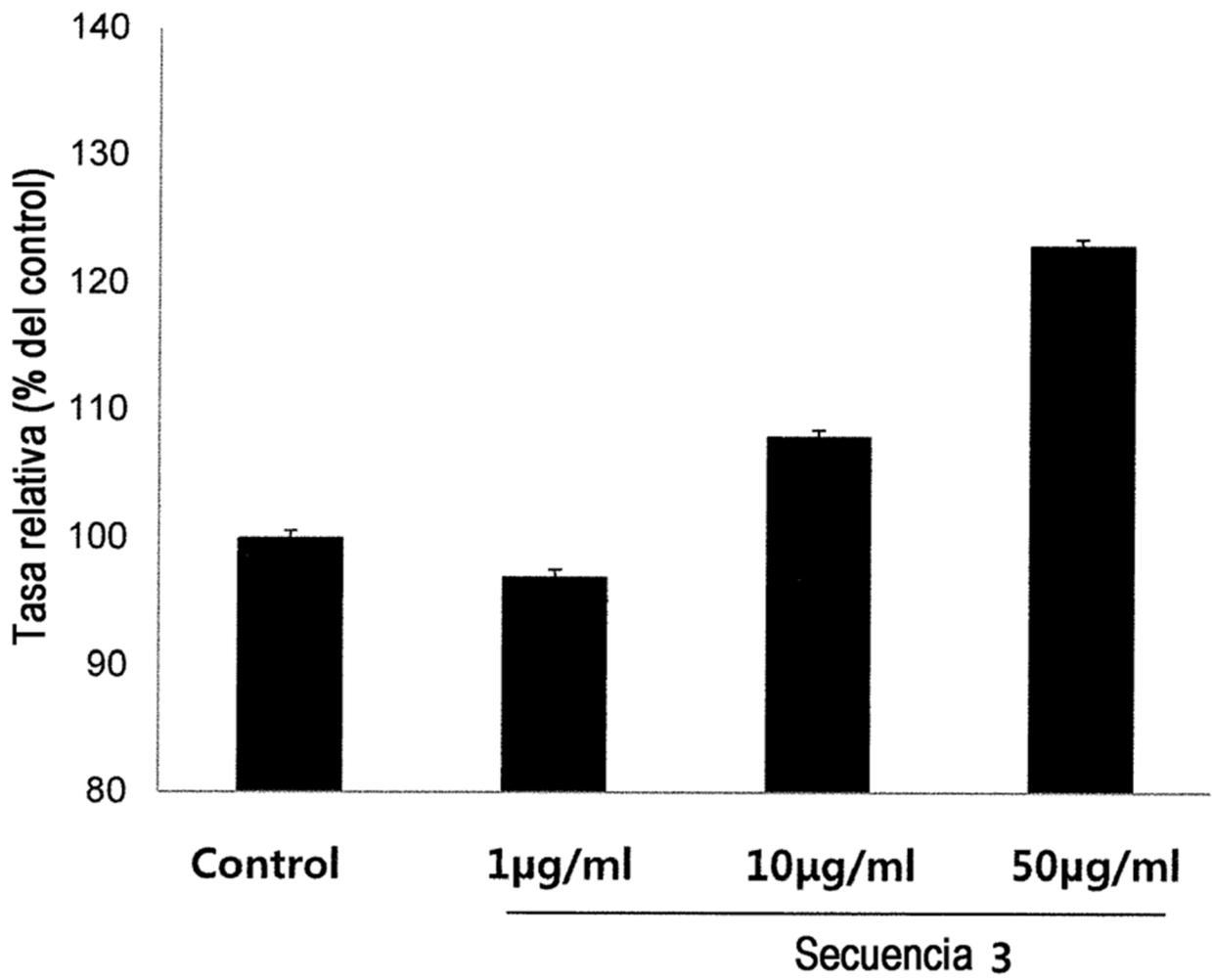


Fig. 16

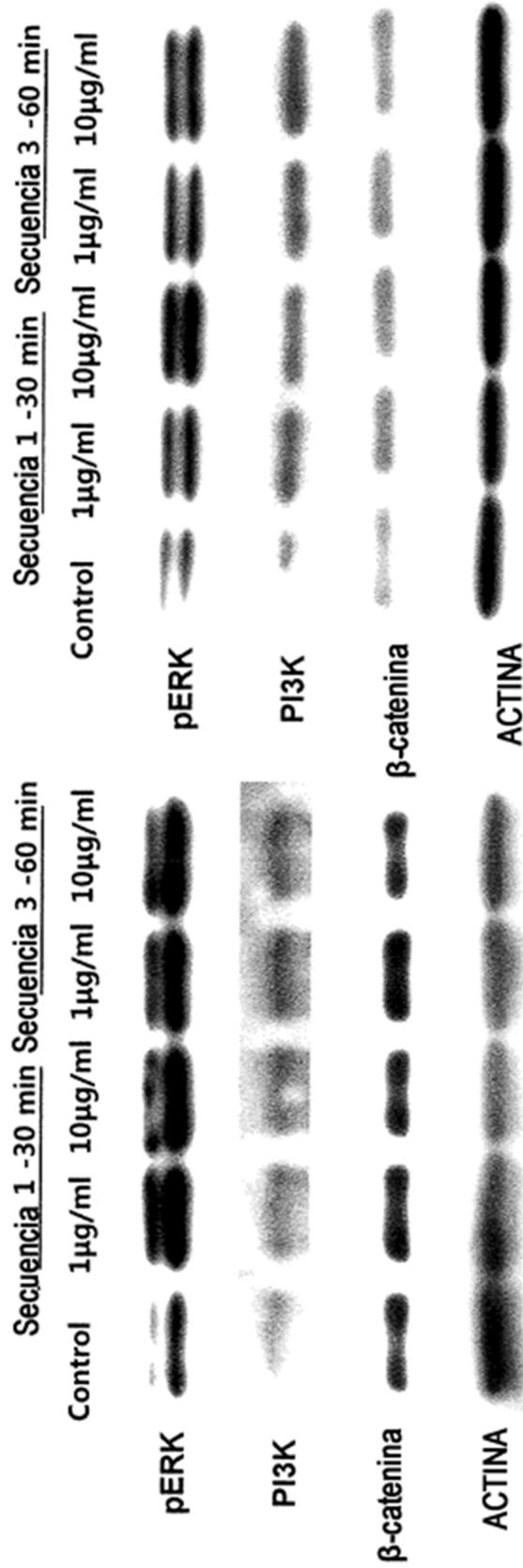


Fig. 17

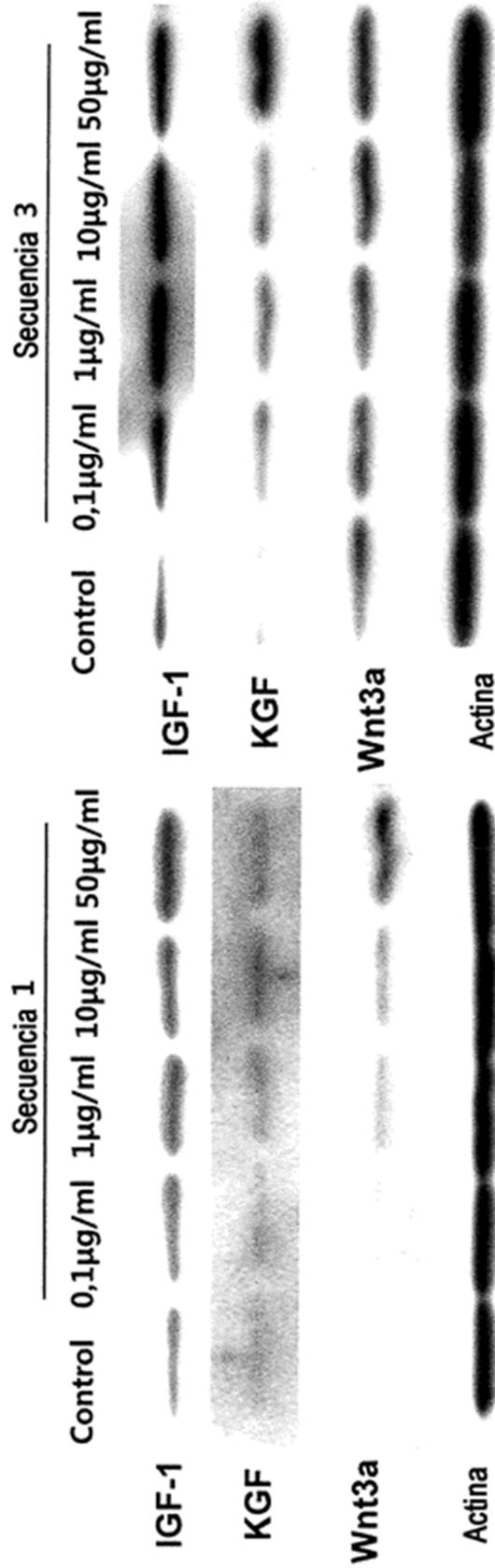


Fig. 18

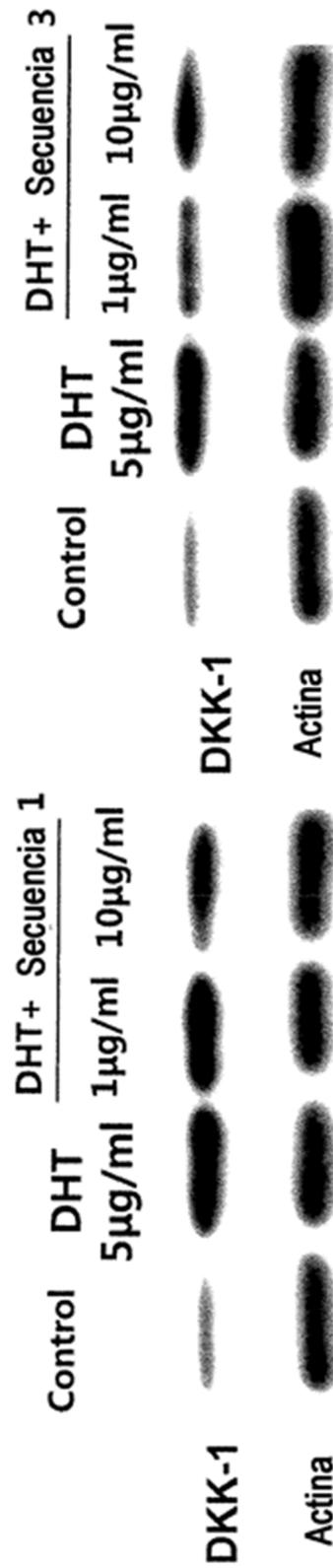


Fig. 19

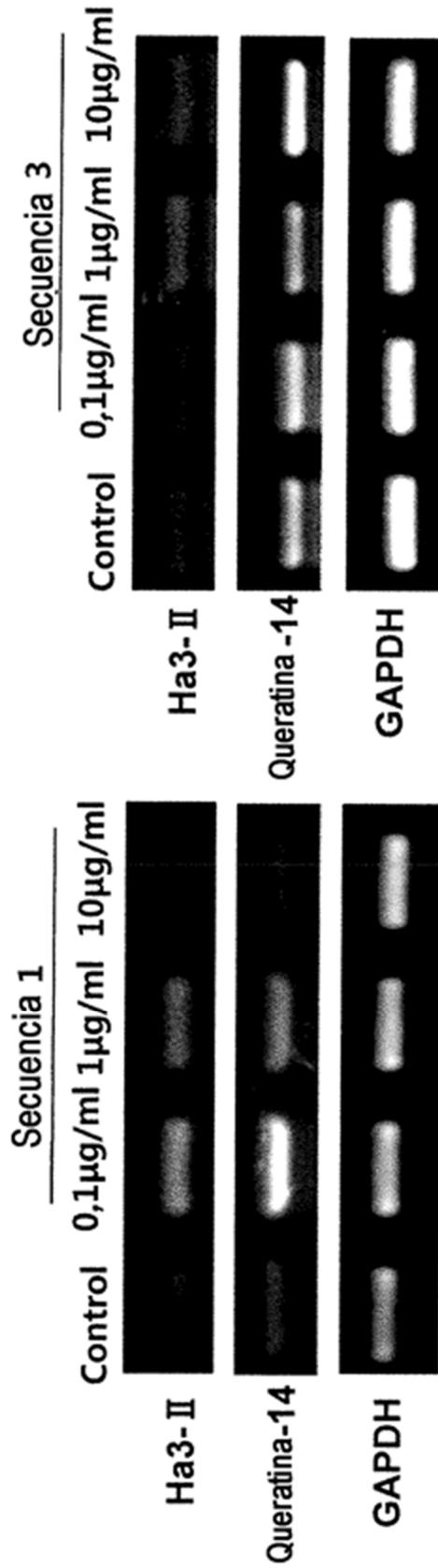


Fig. 20

