

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 294**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01) **A23L 1/229** (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01) **A61K 31/7088** (2006.01)

A61K 31/7072 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61K 31/708 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/14 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09005515 .3**

96 Fecha de presentación: **16.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **2103306**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54

Título: **Uso de ácido glutámico para prevenir/mejorar el trastorno digestivo funcional**

30

Prioridad:
17.09.2004 JP 2004271884

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73

Titular/es:
AJINOMOTO CO., INC.
15-1, KYOBASHI 1-CHOME
CHUO-KU, TOKYO 104-8315, JP

72

Inventor/es:
Uneyama, Hisayuki;
Tanaka, Tatsuro;
Torii, Kunio y
Fujita, Shinichi

74

Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 294 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

Uso de ácido glutámico para prevenir/mejorar el trastorno digestivo funcional.

La presente invención se refiere a un agente para la prevención o la mejora del trastorno gastrointestinal funcional, la dispepsia funcional (FD: Functional Dyspepsia) (p. ej. dolor abdominal, pesadez de estómago, ardor de estómago, y similares). La presente invención se refiere también a un alimento para la prevención o la mejora de este trastorno gastrointestinal funcional.

Incluso con los avances en el diagnóstico mediante endoscopia, hay muchos casos en los que los síntomas gastrointestinales superiores, tales como dolor abdominal, molestias, pesadez de estómago postprandial, náuseas, vómitos y similares, no pueden explicarse satisfactoriamente. Una condición así, en la que el paciente refiere un malestar de un síntoma gastrointestinal, pero no se encuentra ninguna enfermedad orgánica mediante un examen general que incluya un examen endoscópico, y en el que no se dispone de ningún hallazgo que explique el síntoma, se denomina una FD (dispepsia funcional: dispepsia no ulcerosa (NUD: Non Ulcer Dyspepsia): molestia indefinida abdominal superior). De acuerdo con la Asociación Americana de Gastroenterología, se define que la FD es una patología en la que no se observan síntomas de enfermedades orgánicas tales como úlcera péptica y cáncer, pero continúan durante 4 semanas o más las molestias abdominales superiores indefinidas, tales como la sensación de plenitud en el abdomen, náuseas, vómitos, dolor abdominal superior, anorexia, movimiento intestinal anormal, y similares, basadas en la retención del contenido del estómago.

Por otra parte, en Japón, se ha establecido que tal caso es una "dolencia gastrointestinal en el abdomen superior asociada con gastritis crónica", al margen de los hallazgos orgánicos, y, en situaciones clínicas, ha diagnosticado convencionalmente como "gastritis" o "gastritis crónica". Actualmente, el subtipo de FD incluye un tipo de síntoma ulceroso, un tipo de dismotilidad gastrointestinal, y un tipo no específico, que incluyen gastroatónia convencional, dispepsia nerviosa y neurosis gástrica.

Incluso en los casos en los que se observa claramente una enfermedad orgánica (esofagitis por reflujo, úlcera péptica, gastritis aguda, cáncer gastrointestinal, enfermedad pancreatobiliar, etc.) también se encuentra dolor abdominal, molestias, pesadez de estómago postprandial, náuseas-vómitos, y similares. En consecuencia, existe una necesidad urgente de mejorar tal sensación molesta para asegurar una mejor calidad de vida (QOL) de los pacientes. Cuando la NUD viene unida a molestias indefinidas del abdomen inferior, tales como dificultades en la defecación, sensación de falta de alivio después de la defecación, dolor abdominal, sensación de plenitud en el abdomen, y similares, debidas al estreñimiento, se supone que aproximadamente del 30% al 50% de la población total de Japón ha experimentado alguna dolencia gastrointestinal indefinida. Se considera que el desarrollo de la dolencia abdominal indefinida está influenciado por el sexo, la edad, el estrés o el sobrepeso debido a la dieta de estilo occidental, y es una enfermedad que representa a la sociedad moderna, junto con las enfermedades relacionadas con el estilo de vida. Aunque es una enfermedad tan seria, se sugiere meramente que la etiología de la dolencia gastrointestinal indefinida implica varias enfermedades (gastritis crónica, diabetes, sobrepeso, estreñimiento, etc.) y el único mecanismo sugerido para su aparición es la degradación de la función de movilidad gastrointestinal.

Además, muchos de los pacientes con una enfermedad degenerativa progresiva del cerebro, tal como la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la atrofia olivopontocerebelosa y similares, apoplejía cerebral y similares, desarrollan también disfunción de la movilidad gastrointestinal, y se considera que es necesario mejorar la calidad de vida mediante la mejoría de la función de movilidad gastrointestinal. Se considera que muchos de estos pacientes no pueden referir por sí mismos la dolencia indefinida a causa de la logopatía, la alteración de la consciencia y similares. Así pues, una asistencia que elimina un trastorno de sensación tal como una dolencia indefinida y similares, simultáneamente con una asistencia de la disfunción orgánica, conduce a la mejora de la calidad de vida en un sentido verdadero.

Los agonistas del receptor 5-HT4 y similares han sido usados hasta ahora para el tratamiento de FD. Por ejemplo, la cisaprida y la metoclopramida tienen una acción de hiperanacinesia sobre el estómago y los intestinos, y han sido usadas para el tratamiento de los síntomas y similares de la gastritis crónica, sensación de plenitud en el abdomen, esofagitis por reflujo, dolencia abdominal indefinida y pseudoíleo. Sin embargo, la metoclopramida muestra un efecto secundario de síntomas extrapiramidales causado por la acción sobre los receptores de dopamina D2 en el sistema nervioso central, y también se ha esclarecido que la cisaprida muestra síntomas parkinsonianos. Aunque también se ha usado mosaprida, etc., el efecto no es siempre suficiente, y aparecen efectos secundarios tales como la sensación de plenitud en el abdomen, y similares. Aunque se han usado antagonistas de H2 e inhibidores de la bomba de protones para el tratamiento de la enfermedad del reflujo gastroesofágico (GERD: Gastro Esophageal Reflux Disease), dado que no se ha establecido la seguridad de la administración a largo plazo, es necesario un examen periódico. Por tanto, es difícil esperar un efecto del tratamiento de estos agentes farmacéuticos existentes asegurando al mismo tiempo una seguridad suficiente.

Además, se conocen fármacos terapéuticos para la FD y la dolencia gastrointestinal indefinida que acompañan a un trastorno orgánico multifuncional, agonistas del receptor 5-HT3 parcial, nitroglicerina, fármacos que liberan óxido nítrico (en adelante NO) tales como nitrato, etc. Sin embargo, dado que los receptores 5-HT3 y proteínas nitrérgicas, que son la diana de estos agentes farmacéuticos, se distribuyen no sólo en la membrana mucosa gastrointestinal

sino también en órganos del cuerpo entre los que se incluye el cerebro, los agentes muestran varias actividades fisiológicas. Concretamente, cuando un antagonista de 5-HT₃ se usa como agente antiemético, un agonista del receptor 5-HT₃ no específico induce particularmente náuseas y vómitos. Se sabe también que la liberación inespecífica de NO en la circulación sistémica induce una baja presión arterial. Por consiguiente, es necesario desarrollar un agente farmacéutico seguro, de una eficacia elevada que pueda actuar en estas dianas limitadas en los órganos gastrointestinales.

Por otra parte, se ha publicado que la glutamina muestra el efecto de mejorar las enfermedades gastrointestinales orgánicas, tales como úlcera y similares, sin expresar efectos secundarios (Elia M., Lunn P. G., Nutrition, 1997 Jul-Ag.; 13 (7-8): 743 – 7). Sin embargo, la glutamina tiene una solubilidad baja, es muy inestable en solución acuosa y carece de comodidad. Una publicación ha documentado que la adición a la dieta de glutamato monosódico solo, y tanto de ácido glutámico como de isositato sódico, puede potenciar la secreción gástrica en un modelo experimental de gastritis atrófica, que es también una de las enfermedades orgánicas (Vasilevskaia L. S., et al., Vopr Pitan. 1993 Mayo-junio; (3): 29-33, Rymshina M. V. y Vasilevskaia L. S., Vopr Pitan. 1996; (1): 9-11). Se ha confirmado que el glutamato monosódico potencia la secreción gástrica en pacientes con gastritis atrófica y, además, el ácido glutámico y el inositato sódico muestran potencial para ser promotores de la digestión en pacientes con gastritis atrófica (Kochetkov A.M., Vopr Pitan. Sept-Dic. 1992; (5-6): 19-22, Shlygin G.K., Klin Med (Mosk). Agosto 1991; 69 (8): 66-70). Sin embargo, todavía no se ha sugerido un efecto del tratamiento de ácido glutámico e inositato sódico para la anomalía sensorial (dolencia indefinida) asociada con NUD y el trastorno digestivo.

Además, hay publicaciones acerca de varios intentos de mejorar la función gastrointestinal y aumentar la eficiencia del soporte de nutrición en pacientes con trastorno orgánico en el tracto gastrointestinal o en pacientes con función más baja causada por el mismo, mediante la administración enteral de una composición que contiene ácido glutámico, con el fin de proteger la membrana mucosa y mejorar la movilidad del tracto gastrointestinal inferior (documento DE-B-4133366, publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/138476, documentos EP-B-0318446, JP-A-56-57385, CA-B-2404005, JP-A-48-30583). En estos casos, sin embargo, se desea el mantenimiento de la barrera gastrointestinal mediante la protección de la membrana mucosa, la mejora de la movilidad del tracto gastrointestinal inferior, y similares, mediante la adición de ácido glutámico a una composición nutricional tal como un aminoácido, proteína y similares, y no se sugiere un efecto del tratamiento sobre la FD.

El documento EP-A-1 767 201 describe una composición nutriente que puede contener ácido glutámico y que se usa para la prevención o la mejoría de la diarrea, la enfermedad de reflujo gastroesofágico o disfagia causadas por la administración de un suplemento líquido nutricional.

La distribución y el tipo de receptores de glutamato en el cuerpo han sido revisados por A. L. Kirchgessner en "Current Opinion in Pharmacology", vol. 1 (2001), págs. 591 – 596. D. Becquet et al. en "Neurochemistry Internacional" vol. 23, nº 3 (1993), págs. 269 – 283, discuten cómo actúa el ácido glutámico sobre células del tronco encefálico cultivadas específicas para inducir la producción y/o la liberación de serotonina. G. A. Burns et al. estudiaron la expresión del mRNA de una subunidad receptora de glutamato por las neuronas entéricas de la rata, en Journal of the Autonomic Nervous System, vol. 55, nº 3, págs. 207 – 210 (1995). J. P. Kessler et al. publicaron que la administración de glutamato monosódico al núcleo del tracto solitario por microinyección en el tronco encefálico induce la deglución.

El documento WO 02/062324A describe que la administración tópica de moduladores del tono de la musculatura lisa, incluyendo glutamato, es efectiva para el tratamiento de los trastornos de la movilidad esofágica.

Como se mencionó anteriormente, han sido usados de forma convencional agonistas de 5-HT y agentes de liberación de NO como agentes terapéuticos para la FD. Aunque la serotonina y el NO se distribuyen sistémicamente, están presentes de forma particularmente abundante en el tracto gastrointestinal. En particular, se considera que aproximadamente el 80% de la serotonina está presente en el epitelio de la mucosa gastrointestinal. Hay abundantes hallazgos que se refieren a las actividades fisiológicas del NO y la serotonina en el tracto gastrointestinal. Se considera que el NO en la membrana de la mucosa gastrointestinal se relaciona con la relajación receptiva al ingerir el alimento, la promoción de la secreción de mucosidad, la reparación de la membrana mucosa alterada, la potenciación de la inmunidad gastrointestinal, la esterilización de la luz gastrointestinal, la mejora de la microcirculación por el aumento del flujo sanguíneo mucosal, y con el efecto de agregación antiplaquetas, y similares, y desempeña un importante papel para el mantenimiento de la función gastrointestinal. Además, la serotonina es una importante sustancia fisiológicamente activa del tracto gastrointestinal, que es responsable de la regulación de la movilidad gastrointestinal, la regulación exocrina gastrointestinal (secreción de ácidos gástricos, secreción exocrina pancreática, etc.). Cuando la acción de estas sustancias es inhibida de modo artificial, se impide la función gastrointestinal, lo que causa úlcera, hemorragia gastrointestinal y movilidad anómala.

Por consiguiente, una dolencia gastrointestinal indefinida puede tomarse como un aviso del tracto gastrointestinal y se asume con facilidad que una dolencia gastrointestinal indefinida puede ser causada por una disfunción gastrointestinal no orgánica de un nivel leve que es patológicamente difícil de enjuiciar, sin mencionar un caso de patología orgánica gastrointestinal. Por consiguiente, han sido usados convencionalmente los agonistas de 5-HT que promueven la liberación de serotonina y los agentes de liberación de NO que promueven el NO. Sin embargo, estos agentes farmacéuticos son problemáticos en cuanto a sus efectos secundarios sistémicos y de seguridad, como se ha indi-

cado anteriormente. Por ello, hay una demanda para el desarrollo de un agente farmacéutico que promueva específicamente la liberación de serotonina y de NO en el tracto gastrointestinal y mejore varias condiciones asociadas con FD, y similares.

5 La presente invención ha sido realizada en esta situación y tiene por objeto proporcionar un agente farmacéutico o un alimento capaz de realizar la mejoría del trastorno gastrointestinal funcional, dispepsia funcional.

Los autores de la presente invención han realizado estudios intensivos con el intento de resolver los problemas antes mencionados y han encontrado que cuando se administra ácido glutámico o una sal del mismo al sujeto de administración, la concentración de NO y la de serotonina aumentan solamente en el tracto gastrointestinal para favorecer la función de movilidad gastrointestinal y, por tanto, los trastornos gastrointestinales funcionales y la disfagia pueden mejorarse sin inducir efectos secundarios sistémicos, lo que tuvo por resultado la realización de la presente invención.

15 Aquí, en relación con la absorbibilidad del glutamato monosódico, por ejemplo, se ha publicado que cuando se toma por vía oral glutamato monosódico e inosinato sódico, no menos del 90% del ácido glutámico ingerido es oxidado completamente en la membrana mucosa gastrointestinal formando dióxido de carbono y agua, y el 10% restante, o menos, se convierte en alanina y ácido láctico, y por tanto la cantidad de ácido glutámico que se transfiere a la sangre es extraordinariamente pequeña (P. J. Reeds, D. G. Burin, B. Stoll, Jahoor, J. Nutrition 130: 978S (2000)). Además, el estudio de Nijima et al. proporciona el hallazgo de que la administración de glutamato monosódico al estómago o el duodeno activa la vía aferente del nervio vago, pero que la administración intraportal de glutamato monosódico no activa el nervio vago (Nijima A., et al., Physiol Behav. 1991 May; 49(5): 1025-8, Nijima A., et al., J Nutr. 2000 Apr; 130 (4S Suppl): 971S-3S). A partir de estas observaciones, se considera que incluso si una parte de ácido glutámico es absorbida y transferida a la circulación sistémica, el ácido glutámico no activa directamente la vía aferente del nervio vago en el organismo.

25 A partir de estas observaciones, se supone que el mecanismo de acción de la mejoría de los trastornos gastrointestinales funcionales por el agente farmacéutico de la presente invención es como sigue. Cuando el agente farmacéutico de la presente invención es administrado al sujeto de administración, la liberación de NO y/o serotonina se promueve solamente en la membrana mucosa del estómago. Como resultado, la concentración de NO y/o serotonina aumenta solamente en tal entorno tóxico, y se favorece la función de movilidad gastrointestinal. Así pues, la dolencia indefinida asociada con trastornos gastrointestinales funcionales como FD y similares puede ser mejorada de forma segura y eficaz. Además, dado que la cantidad de ingrediente activo transferida a la sangre es extremadamente baja, raramente se provocan efectos secundarios sistémicos.

30 La presente invención comprende lo siguiente:

1. Un agente para ser usado mediante administración oral en la prevención o la mejoría de la dispepsia funcional, que comprende ácido glutámico o una sal del mismo como ingrediente activo.
2. El agente del apartado 1, en el que la dosis diaria de ingrediente activo a un adulto es de 0,01 g a 20 g.
- 35 3. El agente del apartado 1 o 2, que es un alimento.
4. El agente del apartado 3, en el que el contenido de dicho ingrediente activo es de 0,01% en peso a 10% en peso.
5. El uso del ácido glutámico o una sal del mismo como ingrediente activo para la producción de un agente para ser usado, mediante administración oral, en la prevención o la mejora de la dispepsia funcional.
- 40 6. El uso de acuerdo con el apartado 5, en el que el agente es para administración en una dosis diaria de 0,01 g a 20 g.
7. El uso de acuerdo con el apartado 6, en el que el agente es un alimento.
8. El uso de acuerdo con el apartado 7, en el que el contenido de dicho ingrediente activo es de 0,01% en peso a 10% en peso.

45 En los dibujos:

La Fig. 1 muestra un ejemplo del efecto de un antagonista de 5-HT3 frente a la actividad aferente de las ramas gástricas del nervio vago inducida por una solución acuosa de MSG (glutamato monosódico) o GMP (guanilato sódico).

La Fig. 2 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la activación del nervio vago mediante administración intragástrica de glutamato monosódico cuando se agota la serotonina de la membrana mucosa o se inhibe la síntesis de NO.

La Fig. 3 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la liberación de NO en la membrana mucosa por administración intragástrica de ácido glutámico.

La Fig. 4 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la fuga de serotonina a la sangre portal por administración intragástrica de ácido glutámico.

La Fig. 5 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la promoción del vaciado del estómago por administración intragástrica de ácido glutámico.

5 La Fig. 6 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la promoción del vaciado del estómago por glutamato monosódico y sal de arginina del ácido glutámico.

La Fig. 7 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la promoción del vaciado del estómago por sal de lisina del ácido glutámico, glutamato cálcico y ácido inosínico.

10 La Fig. 8 muestra un ejemplo de los resultados del estudio de la influencia del ácido glutámico sobre la sensación después de las comidas, basada en la tensión del estómago.

La realización de la presente invención se explica a continuación.

Como se usa en el presente texto, el "trastorno gastrointestinal multifuncional" se refiere a una patología en la que no se observan enfermedades orgánicas tales como úlcera péptica y síntomas de cáncer, pero continúa la dolencia abdominal indefinida tal como la sensación de plenitud en el abdomen, náuseas, vómitos, dolor abdominal superior, anorexia, movimiento intestinal anómalo, y similares, basada en la retención del contenido en el tracto gastrointestinal, en particular en el estómago. Significa una condición sin enfermedad orgánica del tracto gastrointestinal, pero con un síntoma gastrointestinal reproducible que degrada la calidad de vida de los pacientes. El "tracto gastrointestinal" en la presente invención se refiere a una serie de órganos lumbinales implicados en la digestión, desde la cavidad bucal hasta el ano y, por ejemplo, cabe mencionar la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) y el intestino grueso. El "tracto gastrointestinal superior" se refiere a la faringe, el esófago, el estómago y el duodeno.

Como se usa en el presente texto, la "dispepsia funcional" se refiere a una patología en la que no se observan enfermedades orgánicas tales como úlcera péptica y síntomas de cáncer, pero continúa la dolencia abdominal indefinida tal como la sensación de plenitud en el abdomen, náuseas, vómitos, dolor abdominal superior, anorexia, movimiento intestinal anómalo y similares, basada en la retención del contenido en el estómago. Significa una condición sin enfermedad orgánica del tracto gastrointestinal, pero con un síntoma gastrointestinal reproducible que degrada la calidad de vida de los pacientes. La dispepsia incluye enfermedades diagnosticadas hasta ahora como gastritis crónica y gastritis, y frecuentemente muestra síntomas de dolor abdominal, pesadez de estómago, pirosis, y similares. En los últimos años, se dice que del 40 al 60% de los pacientes ambulatorios de las clínicas de medicina familiar padecen dispepsia funcional, y la terapia para la eliminación del *Helicobacter pylori* tiende a hacer aumentar el número de dispepsias funcionales.

El agente para la prevención o la mejora de un trastorno gastrointestinal funcional, con el que está relacionada la presente invención, es un agente para la prevención o la mejora de la dispepsia funcional.

35 En el texto que sigue, el agente para la profilaxis o la mejora de un trastorno gastrointestinal funcional se denomina a veces simplemente "agente preventivo (profiláctico) o mejorador".

El agente preventivo o mejorador de la presente invención contiene al menos ácido glutámico o una sal del mismo como ingrediente activo.

Como "sal", es preferible una sal del ácido glutámico farmacológicamente aceptable. Como tal sal, cabe mencionar las sales con una base inorgánica, sales con un ácido inorgánico, sales con un ácido orgánico y sales con una base orgánica, y similares. Como sal con una base inorgánica, cabe mencionar las sales de metales alcalinos tales como sodio, potasio, litio y similares, las sales de metales alcalinotérreos tales como calcio, magnesio y similares, y las sales de amonio y similares. Como sal con un ácido inorgánico, cabe mencionar las sales con hidrácidos de halógenos (ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, yoduro de hidrógeno, etc.), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Como sal con un ácido orgánico, cabe mencionar las sales con ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina y similares. Como sal con una base orgánica, cabe mencionar las sales con aminoácidos básicos (arginina, lisina, ornitina y similares), nucleótidos (derivados de purina, derivados de pirimidina, y similares), alcaloides y similares. De estas, son preferibles las sales con aminoácidos básicos tales como arginina y similares, las sales con metales alcalinos tales como la sal sódica y similares, y las sales de calcio; las sales con ácidos orgánicos tales como ácido inosínico, histidina y similares son también útiles.

El ácido glutámico y las sales del mismo que se usan pueden ser naturales de origen animal o vegetal, o los obtenidos por un método de síntesis química, un método de fermentación o recombinación génica. Como ácido glutámico, cabe mencionar una forma L, una forma D o una mezcla de las mismas, es decir, el racemato, dándose preferencia a una forma L.

Como ingrediente activo preferible, cabe mencionar el ácido glutámico o una sal del mismo, tal como ácido glutámico, L- glutamato sódico y D-glutamato sódico. De estos, son preferibles el ácido glutámico y el L- glutamato sódico. Como ingrediente activo puede usarse una mezcla de uno o más tipos de los mismos.

5 En la presente invención, como se mencionó anteriormente, el trastorno gastrointestinal funcional pueden mejorar administrando una cantidad efectiva a un sujeto de administración. En este caso, el ingrediente activo es administrado oralmente, tal como está o después de mezclarlo con un vehículo farmacéutico y en forma de un preparado farmacéutico tal como un comprimido (incluyendo un comprimido recubierto con azúcar, un comprimido recubierto con película), una píldora, una cápsula, una ampolla, polvo dividido, un elixir, una suspensión, un jarabe, un preparado de goma, un preparado en gotas, polvo, un preparado de liberación retardada, y similares, en consideración de la cantidad de ingrediente activo a administrar, la condición del sujeto al que se hace la administración (p. ej. el paciente) y similares. Como método de administración, es preferible la administración oral, y un fármaco de liberación retardada es más preferible. Como forma de liberación retardada, cabe mencionar preparados de liberación retardada convencionales tales como un preparado recubierto con gel, preparado con recubrimiento múltiple y similares, preparado de goma, preparado en gotas, agente de liberación localizada (preparado de ruptura en la parte pilórica), y similares.

20 Como se usa en el presente texto, el "sujeto de la administración" incluye a individuos afectados con el trastorno gastrointestinal funcional (p. ej. personas, animales domésticos y ganado aviar, tales como ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, perros, pájaros, y animales experimentales tales como ratones y ratas, así como individuos que tienen riesgo de ser afectados por un trastorno gastrointestinal funcional. La "cantidad efectiva" significa una cantidad suficiente para proporcionar el efecto de mejoría deseado. Aunque la dosis de ingrediente activo varía dependiendo del sexo, edad y peso corporal del sujeto de la administración, la dieta, la forma de administración, la condición de la FD y similares, el nivel de riesgo que induce la FD y similares, la condición de la enfermedad orgánica del tracto gastrointestinal y similares, por ejemplo, la dosis diaria de ingrediente activo a un adulto (peso corporal 60 kg) es preferentemente de 0,01 a 20 g, más preferentemente de 0,01 a 10 g, y aún más preferentemente de 0,1 a 10 g. Tal dosis puede ser administrada de una vez o en varias porciones.

30 El "vehículo farmacéutico" antes mencionado significa uno que es aceptable farmacéuticamente y provoca una acción farmacéutica en el organismo. Como vehículo farmacéutico para administración oral, pueden usarse como apropiados aglutinantes tales como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina y similares; excipientes tales como fosfato dicálcico y similares; agentes desintegrantes tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio y similares; agentes edulcorantes tales como sacarosa y similares; colorantes; agentes saborizantes tales como sabor de naranja y similares; disolventes tales como agua, etanol, glicerol y similares; nutrientes tales como proteínas, aminoácidos, vitaminas, lípidos, glucosa y similares. Además, como vehículo farmacéutico, pueden usarse antioxidantes aceptables farmacéuticamente tales como cisteína, glutatión, ácido ascórbico, metasulfito sódico, bisulfito sódico y similares y neutralizantes de ácidos tales como carbonato cálcico, gel de hidróxido de aluminio, silicato de aluminio y similares.

35 Las formas de dosificación antes mencionadas de los preparados farmacéuticos y vehículos farmacéuticos son bien conocidas por los profesionales con una experiencia normal en la técnica y, por ejemplo, pueden usarse las formas de dosificación y vehículos farmacéuticos descritos en Reimington's Pharmaceutical Science, ed. 16 (1980) y Mack Publishing Company.

40 La presente invención puede ser usada en combinación con otros agentes farmacéuticos, y como tales agentes farmacéuticos, por ejemplo, pueden estar contenidos inhibidores de la secreción de ácidos tales como un agonista del receptor de H2, inhibidor de la bomba de protones y similares, mejoradores de la función de movilidad tales como agonistas del receptor 5-HT, agonistas D2 y similares, agentes antiácidos tales como antagonista del receptor de muscarina, fármaco anti-gastrina, fármaco anticolinérgico y similares, protectores de la membrana mucosa tales como teprenona, plaunotol, ornoprostil, enprostil, misoprostol, rebamipida, sucralfato, polaprezinc, azuleno, egualeno sódico, glutamina, aldioxa, gefarnato, ecabet sódico y similares, agentes de tratamiento de la colitis inflamatoria tales como sulfasalazina, preparado de 5-ASA, esteroide, remicade y similares. Pueden estar contenidos uno o más tipos de los mismos.

50 Se expone ahora el alimento de la presente invención. El alimento de la presente invención comprende al menos un compuesto elegido entre ácido glutámico y una sal del mismo, y se toma con el propósito particular de mejorar el trastorno gastrointestinal funcional. Además, el alimento de la presente invención puede ser preparado como un alimento común incluyendo lo que se denomina un alimento sano. Además, el alimento de la presente invención puede ser preparado como un alimento con reivindicaciones de salud, alimento para usos saludables específicos, alimento con reivindicaciones de función nutriente, y además un suplemento dietético como se define por el alimento con sistema de reivindicaciones de salud del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar. En este caso, pueden mezclarse y usarse uno o más tipos de ácido glutámico y una sal del mismo.

60 Como alimento de la presente invención, el compuesto antes mencionado puede tomarse como tal. Sin embargo, para facilitar la ingestión, pueden añadirse al compuesto antes mencionado materiales alimentarios de carácter general, condimentos, agentes saborizantes y similares, y la mezcla es procesada para formar una bebida, goma, polvo, comprimido, gránulo, gelatina y similares antes de su ingestión. En este caso, por ejemplo, puede proporcio-

narse un comprimido hecho del compuesto antes mencionado y un agente desintegrante, una mezcla del compuesto antes mencionado y un agente de peso (hidrolizado de proteína, almidón, caseína, glucosa, etc.), una mezcla del compuesto antes mencionado y un adhesivo (goma, comprimido sublingual, trocisto) que permite la liberación intraoral retardada, una solución del compuesto antes mencionado en un disolvente capaz de disolver el compuesto (p. ej. 5 grasa y aceite comestibles, etanol, agua), una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua que contiene el compuesto antes mencionado, o una mezcla del compuesto antes mencionado y un nutriente (p. ej. proteínas, aminoácidos, vitaminas, lípidos, glucosa, etc.). Además, también puede tomarse con una comida al menos un tipo elegido entre ácido glutámico y una sal del mismo, que es para la prevención o la mejoría del trastorno gastrointestinal funcional, por adición del mismo a dicha comida. Por ejemplo, puede tomarse por adición a un alimento existente tal 10 como una bebida, un refresco, yogurt, gelatina, leche y similares.

Cuando el alimento de la presente invención se usa para el objeto particular mencionado antes, la cantidad de ingesta de ácido glutámico o sal del mismo, al día y para un adulto, es preferentemente de 0,01 a 20 g, más preferentemente de 0,01 a 10 g, y aún más preferentemente de 0,1 a 10 g. El contenido del compuesto antes mencionado en el alimento de la presente invención es generalmente de 0,001 a 20% en peso, preferentemente de 0,001 a 10% en peso, más preferentemente de 0,01 a 10% en peso, y aún más preferentemente de 0,1 a 10% en peso. Ajustando el contenido del compuesto antes mencionado en el alimento común antes mencionado para que caiga dentro del margen antes mencionado, puede proporcionarse un notable efecto de mejoría de la función gastrointestinal. 15

Ejemplos.

Las realizaciones de la presente invención se explican de un modo más específico en el texto que sigue, haciendo referencia a los Ejemplos. 20

Ejemplo 1.

Para estudiar el efecto de un antagonista de 5-HT₃ sobre la actividad aferente de las ramas gástricas del nervio vago inducida por una solución acuosa de glutamato monosódico o guanilato sódico, se realizaron los siguientes experimentos (A) – (C).

25 Se usaron para el experimento ratas SD (IGS) (machos, de 8 a 10 semanas de edad: Charles River Laboratories JAPAN, Inc.). Después de ayunar de 15 a 17 horas, las ratas fueron sometidas a una laparotomía bajo anestesia por uretano (1 g/kg, i. p.) para exponer las ramas gástricas del nervio vago ventral, y se observó la actividad aferente de acuerdo con el método (Nijima A., et al., *Physiol Behav.* Mayo 1991; 49 (5): 1025 - 8.). Se administró una solución acuosa de glutamato monosódico (MSG; 150 mM) o guanilato sódico (GMP; 10, 30, 60 mM) a razón de 2 mL/rata 30 desde el catéter alojado en el estómago. Se administró un antagonista de 5-HT₃ (granisetron) a razón de 0,1 a 10 mg/kg/rata desde el catéter alojado en la vena femoral.

(A) Se estudió el efecto supresor del granisetron en respuesta a MSG 150 mM. Los resultados se muestran en la Fig. 1A. En la Fig. 1A, el eje vertical muestra un número medio de descargas de la fibra nerviosa para 5 s, y el eje de abscisas muestra el tiempo (min).

35 (B) Se estudió la dependencia con la dosis del efecto supresor del granisetron en la respuesta de MSG 150 mM. Los resultados se muestran en la Fig. 1B. Cada dato muestra la media \pm el error estándar de 4 casos.

(C) Se estudió la dependencia con la dosis de la respuesta de GMP y la acción antagonista del granisetron. Los resultados se muestran en la Fig. 1C. En la Fig. 1C, el eje vertical muestra un número de descargas de la fibra nerviosa medio para 5 s, y el eje de abscisas muestra el tiempo (min).

40 A partir de los resultados de la Fig. 1A, se ha confirmado que la actividad aferente de las ramas gástricas del nervio vago, causada por la administración intragástrica de solución acuosa de MSG, es casi completamente inhibida por la administración intravenosa de granisetron (10 μ g/kg), que es un antagonista del receptor de 5-HT-3. De los resultados de la Fig. 1B, se encontró que la dosis (valor de ED₅₀) de granisetron que inhibe la mitad de las respuestas de MSG es aproximadamente 0,3 μ g/kg/rata. De los resultados de la Fig. 1C, además, se ha confirmado que la administración intragástrica de solución acuosa de GMP (10, 30, 60 mM) activa, de manera dependiente de la dosis, las 45 ramas gástricas del nervio vago y, al igual que MSG, la actividad aferente de las ramas gástricas del nervio vago inducida por GMP es también inhibida por la administración intravenosa de granisetron (10 μ g/kg).

A partir de los resultados anteriores, se ha explicado que una ingestión de glutamato monosódico o de guanilato sódico causa la liberación de serotonina en la membrana mucosa del estómago, y activa el nervio vago a través del receptor 5-HT₃ en el terminal de las ramas gástricas del nervio vago. 50

Ejemplo 2.

Para estudiar la activación del nervio vago mediante la administración intragástrica de glutamato monosódico cuando la serotonina de la membrana mucosa era agotada o se inhibía la síntesis de NO, se llevaron a cabo los experimentos (A) y (B) siguientes.

Se usaron para el experimento ratas SD (IGS) (machos, de 8 a 10 semanas de edad: CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.). Después de ayunar de 15 a 17 horas, las ratas fueron sometidas a laparotomía bajo anestesia por uretano (1 g/kg, i. p.) para exponer las ramas gástricas del nervio vago ventral, y se observó la actividad aferente de acuerdo con el método (Niijima A., et al., *Physiol Behav.* Mayo 1991; 49 (5): 1025 - 8.).

5 (A) Se disolvió p-clorofenilalanina (PCPA) en una solución de CMC al 5%, y se administró a razón de 200 mg/kg/rata dos veces al día durante 2 días (administración intraperitoneal). La administración final de PCPA se realizó 15 min antes de la administración de solución acuosa de MSG (150 mM; administración intragástrica). Los resultados se muestran en la Fig. 2A.

10 (B) Se disolvió éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME) en solución salina, y se administró a razón de 10 mg/kg/rata desde una cánula alojada en la vena femoral, 15 min antes de la administración de solución acuosa de MSG. Los resultados se muestran en la Fig. 2B.

En las Figs. 2A y 2B, el eje vertical muestra el número medio de descargas de la fibra nerviosa durante 10 s, y el eje de abscisas muestra el tiempo (1 bin = 10 s). Cada punto representado muestra la media \pm el error estándar de 4 casos.

15 De los resultados de la Fig. 2A, se ha confirmado que un pretratamiento con PCPA, que es un inhibidor de la serotonina sintasa, elimina la potenciación retardada de la actividad nerviosa después de la administración intragástrica de MSG. De los resultados de la Fig. 2B, se confirmó el mismo fenómeno que en (A) mediante el pretratamiento con L-NAME, que es un inhibidor de la NO sintasa. A partir de estos resultados, se ha aclarado que la producción de serotonina de la membrana mucosa y NO es esencial para la activación del nervio vago cuando la
20 solución acuosa de MSG es administrada intragástricamente.

Ejemplo 3.

Para estudiar la liberación de NO en la membrana mucosa mediante la administración intragástrica de ácido glutámico, se llevó a cabo el experimento siguiente.

25 Una rata SD fue sometida a laparotomía con anestesia por uretano, se hizo una pequeña incisión en el estómago anterior y el intestino delgado, se introdujo un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro, y el perfundido fue introducido y descargado con una bomba Perista Pump. El perfundido se calentó a 30°C y la velocidad de flujo fue 1 mL/min. El electrodo de NO fue mantenido bajo la lámina muscular de la mucosa junto con un sensor de temperatura, se perfundió solución salina en el estómago durante 2 a 3 horas, se estabilizó el valor del NO liberado, y se perfundió solución isotónica de MSG (150 mM) durante el periodo de tiempo de 14:00 – 18:00.

30 En 3 de 20 casos, se observó un aumento del NO liberado por MSG isotónico (2,5%) durante un tiempo de latencia de 15 min o así. En la Fig. 3 se muestran ejemplos representativos. En la Fig. 3, el eje vertical muestra la concentración de NO liberado, nM, y el eje de abscisas muestra el tiempo (s). Cuando se administra MSG (2,5%) a la membrana mucosa del estómago mediante perfusión, puede ser detectado el NO por el electrodo de NO puesto en la superficie de la membrana mucosa del estómago. Como resultado de ello, se confirmó que la concentración de NO
35 en la membrana mucosa del estómago aumenta por la ingestión de MSG.

Ejemplo 4.

Para estudiar la fuga de serotonina en la sangre portal por administración gástrica de ácido glutámico, se llevó a cabo el experimento que sigue.

40 Se usaron ratas SD macho (8 semanas de edad). Fueron criadas en una sala con control de luz-oscuridad con un periodo de luz de 7:00 – 19:00. Después de ayunar por la noche, las ratas fueron sometidas a laparotomía bajo anestesia con uretano (1,25 g/kg i. p.) y se introdujo un catéter para extraer sangre en la portal. El catéter se llenó con solución salina que contiene 10 unidades/mL de heparina para evitar la coagulación hematológica en el catéter. La solución salina y la solución 450 mM de MSG fueron administradas oralmente cada una de ellas en 2 mL usando una sonda oral. La sangre se extrajo cada 10 min desde 10 min antes de la administración hasta 60 min después de
45 la administración. Para prevenir una innecesaria activación de las plaquetas, las muestras de sangre se recogieron con atención suficiente. La sangre extraída se centrifugó rápidamente por un método convencional a 4°C o menos, 3000 rpm durante 15 min para separar el plasma. Al plasma separado se le añadió rápidamente una cantidad equivalente de una mezcla (ajustada a pH 2) de ácido acético y ácido clorhídrico para eliminar la proteína. La cantidad de serotonina (5-HT) y la cantidad de 5HIAA contenidas en el sobrenadante fueron analizadas mediante un detector
50 químico eléctrico (ECD-100, fabricado por Acomm Inc.). Las condiciones de análisis fueron las siguientes.

columna de análisis	EICOMPAK SC50DS,
fase móvil	83% de ácido cítrico 0,1 M · acetato sódico 0,1 M pH 3,9, 17% metanol, sal sódica del ácido l-octanosulfónico (SOS) 140 mg/L, 5 mg/L EDTA-2Na
velocidad de flujo	0,23 mL/min,
temperatura de análisis	25°C,
potencial aplicado	
detector de ajuste	+ 700 mV,
electrodo activo	electrodo de grafito

Usando el método de análisis antes mencionado, se cuantificaron la serotonina y el 5HIAA del metabolito estable del mismo de la misma muestra. El valor básico del 5HT del plasma fue $29,4 \pm 15,7$ nM (media \pm S. D.). Además, el valor básico de 5HIAA del metabolito fue $149 \pm 22,8$ nM. Cada uno fue normalizado basándose en el valor a 0 min, inmediatamente después de la administración como 100%. El tiempo de recogida de sangre inmediatamente después de la administración intragástrica de 2 mL se tomó como 0 min. Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 4. En la Fig. 4, el eje vertical muestra las concentraciones relativas de 5HT o 5HIAA en plasma, y el eje de abscisas muestra el tiempo (min). En los resultados de la Fig. 4A, no se encontró ninguna diferencia entre la administración de MSG 450 mM, indicada por "●" (círculo negro), y la administración de solución salina indicada por "○" (círculo vacío). A partir de los resultados de la Fig. 4B, sin embargo, por la administración de MSG 450 mM, el 5HIAA de metabolito mostró un aumento más allá del aumento por el grupo de administración de solución salina. De allí se ha aclarado que la serotonina producida en la membrana mucosa del estómago por el MSG ingerido se des-toxifica en la membrana mucosa del estómago y se libera como 5HIAA metabolito en el portal. En otras palabras, se confirmó que la MSG aumenta la concentración de serotonina en el área circunscrita de la membrana mucosa del estómago.

Ejemplo 5.

Para estudiar la promoción del vaciado del estómago mediante la administración intragástrica de ácido glutámico, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Ratas SD macho de 7 a 9 semanas de edad se mantuvieron en ayunas durante la noche y se aplicaron al experimento. Se administró oralmente una dieta de prueba a un volumen de 19 mL/kg y, una hora más tarde, se administraron oralmente aproximadamente 80 perlas de vidrio que tenían un diámetro de 1 mm. Se practicó la necropsia a las ratas 30 min más tarde, y se contó el número de esferas presentes en el estómago y en el intestino delgado. El intestino delgado fue dividido en 4, y se denominaron B1 a B4 a partir del área próxima al estómago. Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 5. En la Fig. 5, la G en el eje de abscisas indica el estómago, y la columna vacía indica el grupo testigo. La dieta de prueba para el grupo testigo era 5% de caseína disuelta en agua destilada, y la dieta de prueba para el grupo de administración de ácido glutámico fue 1% de glutamato monosódico disuelto en caseína al 5% (dosis de glutamina 100 mg/kg). Los datos indican la proporción en porcentaje de perlas presentes en el área en relación con el número total de esferas presentes en el estómago y en el intestino delgado como 100.

De los resultados experimentales, se ha observado que el grupo de administración de ácido glutámico (N = 5) tiende a contener un número menor de perlas en el estómago y un número mayor de perlas en el intestino delgado, en comparación con el grupo testigo (N = 4). Por consiguiente, se ha confirmado que el ácido glutámico tiene actividad de vaciado del estómago.

Ejemplo 6.

Para estudiar la promoción del vaciado del estómago por el glutamato monosódico y otras sales, se llevó a cabo el experimento que sigue.

Se usaron ratones ICR macho. Se administró oralmente una dieta fluida de caseína al 5% (0,5 mL) que contiene 0,05% de rojo fenol y un fármaco de ensayo, y, 30 min más tarde, se abrió el pecho y se aisló el estómago. El estómago se puso en hidróxido sódico 0,1 N (14 mL), se homogeneizó y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió ácido tricloroacético al 20% (0,5 mL) a 5 mL del sobrenadante, y la mezcla se centrifugó (3000

rpm, 20 min). Se añadió al sobrenadante hidróxido sódico 0,5 N (4 mL) y se midió la absorbancia con un espectrómetro de absorción (560 mM). La velocidad de vaciamiento gástrico fue determinada mediante la siguiente fórmula de cálculo.

5 Velocidad de vaciamiento gástrico (%) = $[1 - (\text{absorbancia de la muestra de ensayo} / \text{absorbancia de la muestra patrón})] \times 100$

Para la absorbancia de la muestra patrón se usó el estómago aislado inmediatamente después de la administración de solución de rojo fenol al 0,5%.

El ensayo se llevó a cabo usando, después del análisis de la varianza de una vía, la comparación múltiple de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

10 Los resultados se muestran en la Figura. El número de casos en cada grupo fue 8 – 24. El eje vertical muestra la velocidad de vaciado del estómago (Figs. 7A, 7B, 7C), y las Figs. 6A, 6B muestran grados de vaciado del estómago, con la velocidad de vaciado del estómago del grupo testigo como 100. El glutamato monosódico y la sal de arginina del ácido glutámico promovieron el vaciado del estómago (Figs. 6A, 6B). Por comparación de los efectos, se ha aclarado que la sal de arginina promueve el vaciado del estómago a partir de dosis más bajas en comparación con la sal sódica. Además, la sal de lisina del ácido glutámico y el glutamato cálcico se estudiaron de un modo similar. Como resultado, se aclaró que estas sales promueven el vaciado del estómago (Figs. 7A, 7B). Basándose en esto, se ha aclarado que el ácido glutámico promueve el vaciado del estómago incluso cuando está en otra forma de sal. Además, también se estudió el ácido inosínico y se encontró que promueve el vaciado del estómago (Fig. 7C).

Ejemplo 7.

20 Para estudiar el efecto del glutamato monosódico sobre la sensación después de comer, se llevó a cabo el siguiente experimento.

Se realizó una prueba cruzada doble ciego con 18 varones sanos (sujetos de la prueba) de 45 años de edad o más. Los sujetos de la prueba bebieron una dieta fluida proteica de caseína (400 mL) en 2 minutos, y a continuación anotaron una puntuación de 0 a 10 acerca de la tensión en el estómago basada en los criterios que siguen, cada 15 min y durante 4 h. 0 significa ninguna tensión en el estómago, 10 significa una tensión en el estómago considerablemente alta y un valor numérico más alto significa tensión en el estómago más alta. La prueba se realizó dos veces, en las que el sujeto de la prueba bebió una dieta de prueba que contiene 0,5% de MSG para un tiempo y una dieta testigo para el otro tiempo. La composición de la dieta fluida proteica de caseína fue la siguiente.

dieta de prueba:

30	MSG (Ajinomoto Co., Inc.)	2,1 g
	caseína cálcica (nombre comercial EM9-N: DMV Japón)	57,96 g
	dextrina (nombre comercial TK16: Matsutani Chemical)	52,5 g
	aspartamo (Ajinomoto Co., Inc.)	0,097 g
	sabor a ciruela (GIV010790: Givaudan Japón K. K.)	1,47 g
35	agua destilada	400 mL

dieta testigo: la composición antes mencionada sin MSG.

Los resultados se muestran en la Fig. 8. El tiempo en el momento de la ingestión de la dieta fluida fue 0 min. En el grupo de la dieta de prueba, la tensión del estómago era menor que en el grupo testigo. De lo anterior, se ha sugerido que el ácido glutámico mejora la sensación después de comer.

40 De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un agente farmacéutico y un alimento útil para la mejoría del trastorno gastrointestinal funcional, la dispepsia funcional. Como la concentración de NO y/o de serotonina pueden aumentarse solamente en el tracto gastrointestinal mediante la administración del agente farmacéutico de la presente invención a un sujeto de administración, la movilidad gastrointestinal puede ser potenciada eficazmente. Por consiguiente, la dolencia indefinida que acompaña la FD puede ser mejorada de un modo seguro y efectivo sin inducir un efecto secundario sistémico como hasta ahora.

45

REIVINDICACIONES

1. Un agente para ser usado mediante administración oral en la prevención o la mejoría de la dispepsia funcional, que comprende ácido glutámico o una sal del mismo como ingrediente activo.
2. El agente según la reivindicación 1ª, en el que la dosis diaria de ingrediente activo a un adulto es de 0,01 g a 20 g.
- 5 3. Un agente según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, que es un alimento.
4. El agente según la reivindicación 3ª, en el que el contenido de dicho ingrediente activo es de 0,01% en peso a 10% en peso.
5. El uso del ácido glutámico o una sal del mismo como ingrediente activo para la producción de un agente para ser usado, mediante administración oral, en la prevención o la mejora de la dispepsia funcional.
- 10 6. El uso según la reivindicación 5ª, en el que el agente es para administración en una dosis diaria de 0,01 g a 20 g.
7. El uso según la reivindicación 6ª, en el que el agente es un alimento.
8. El uso según la reivindicación 7ª, en el que el contenido de dicho ingrediente activo es de 0,01% en peso a 10% en peso.

FIG. 1

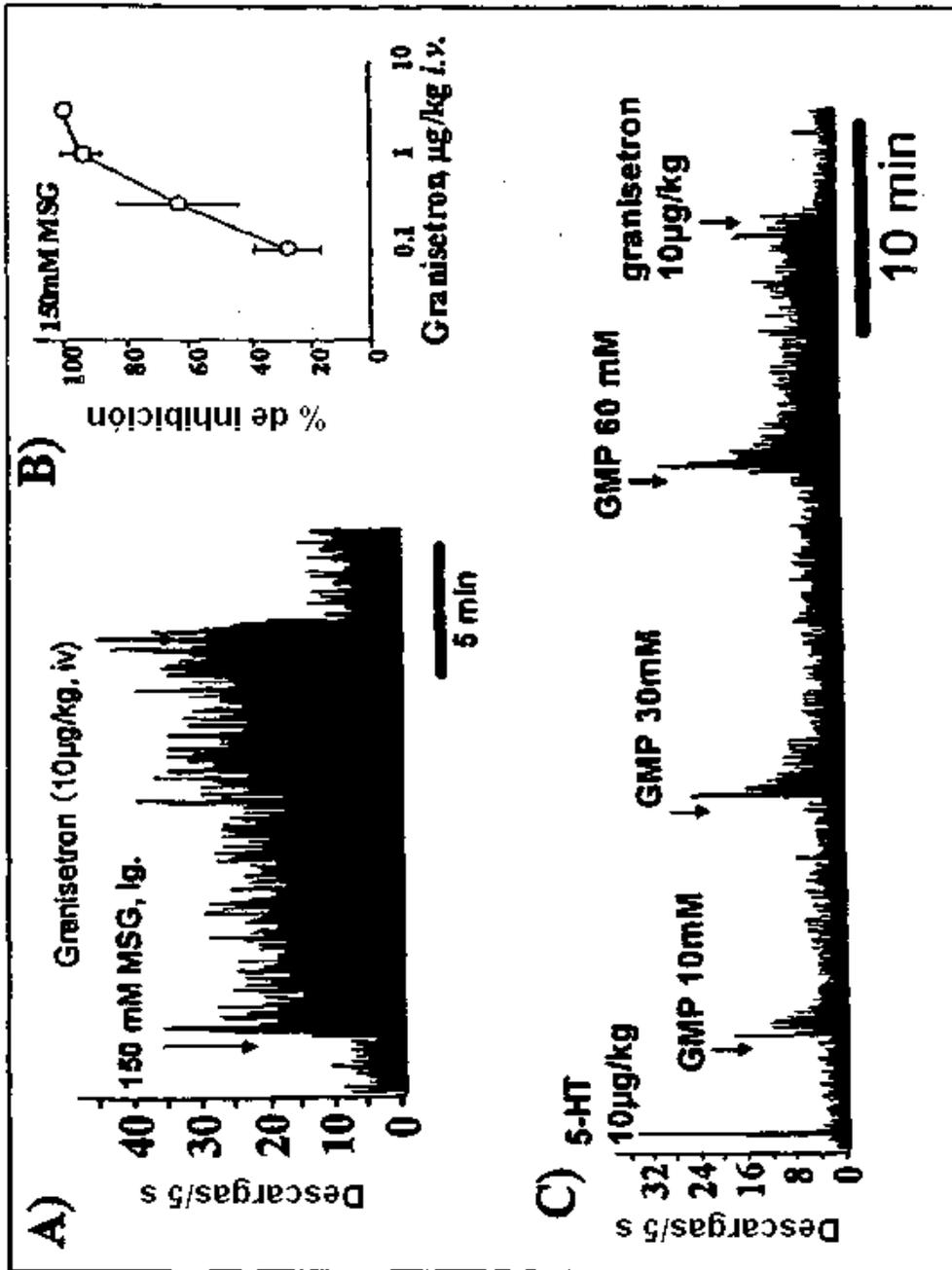


FIG. 2

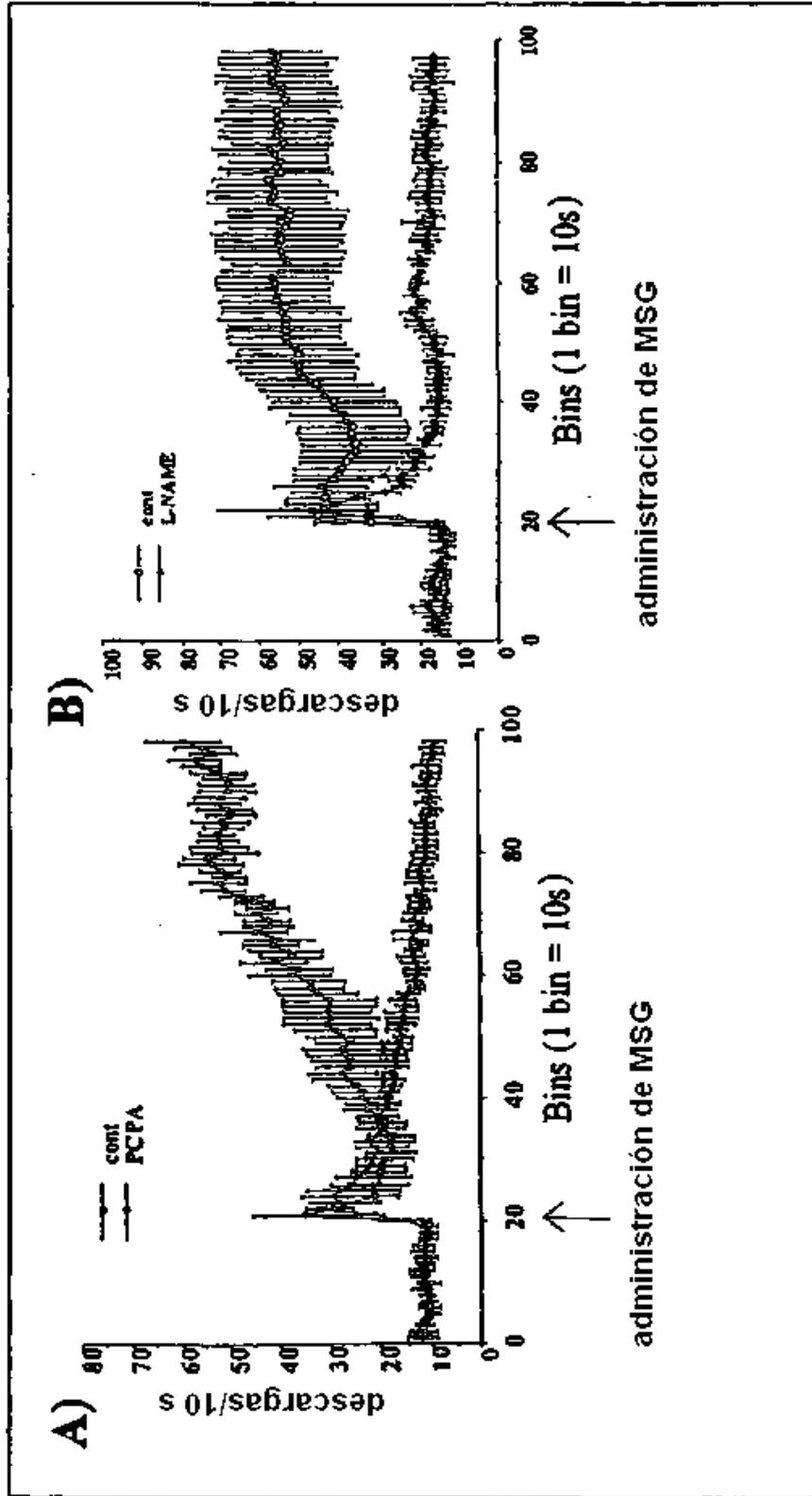


FIG. 3

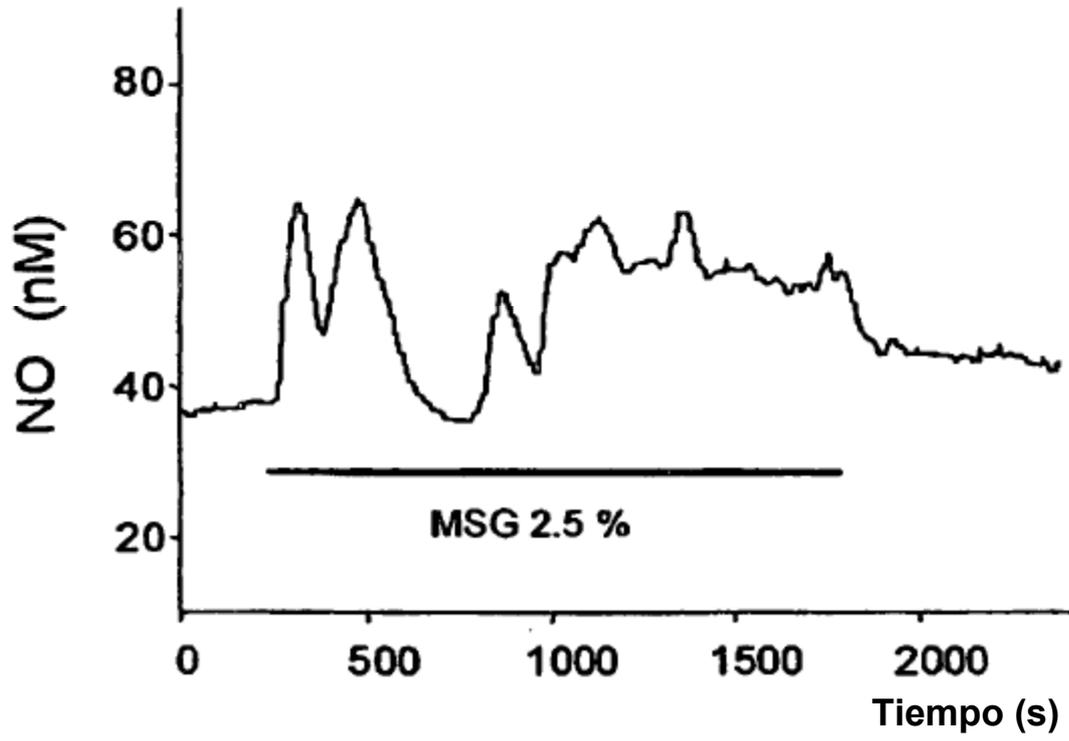


FIG. 4

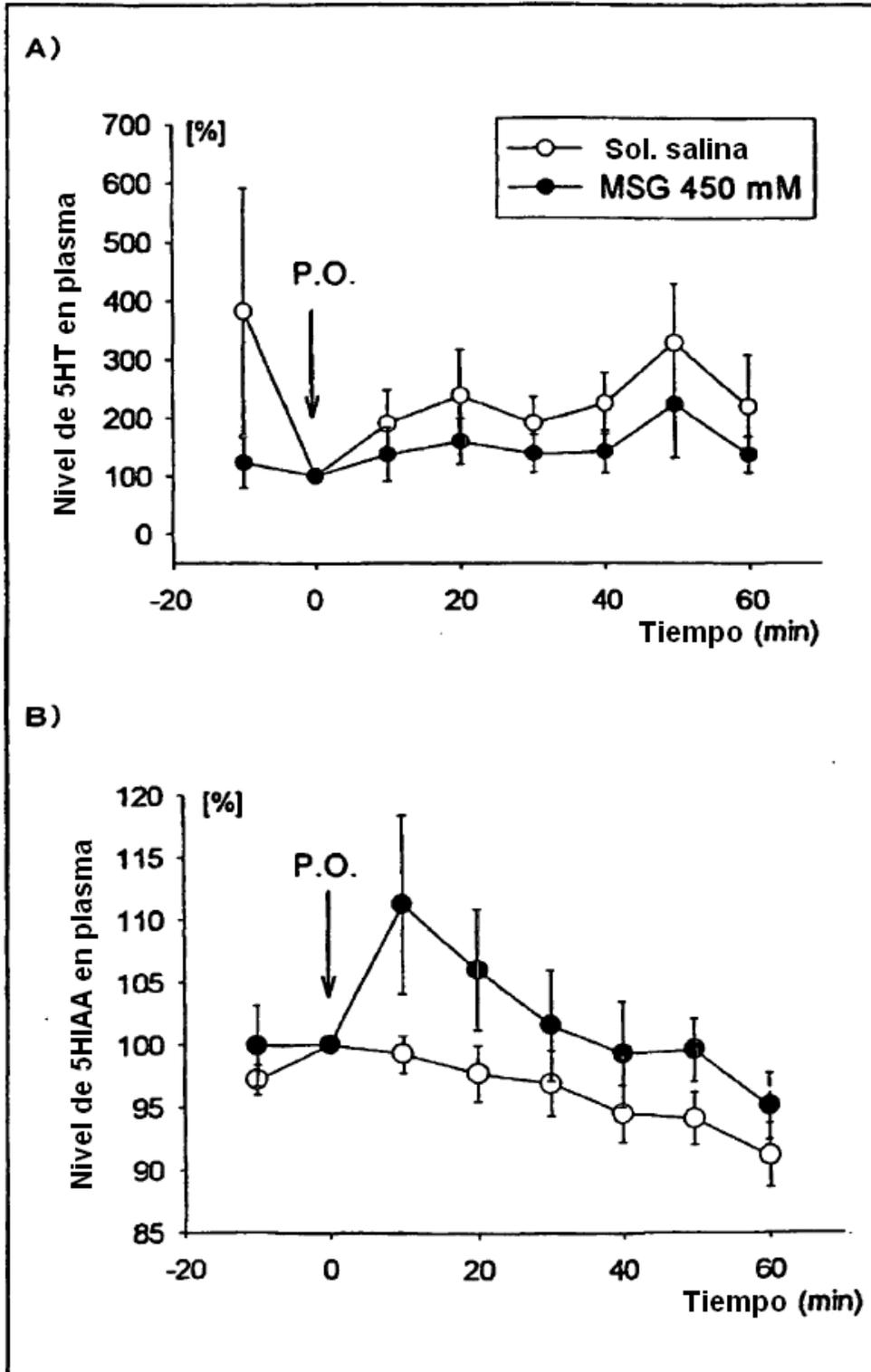


FIG. 5

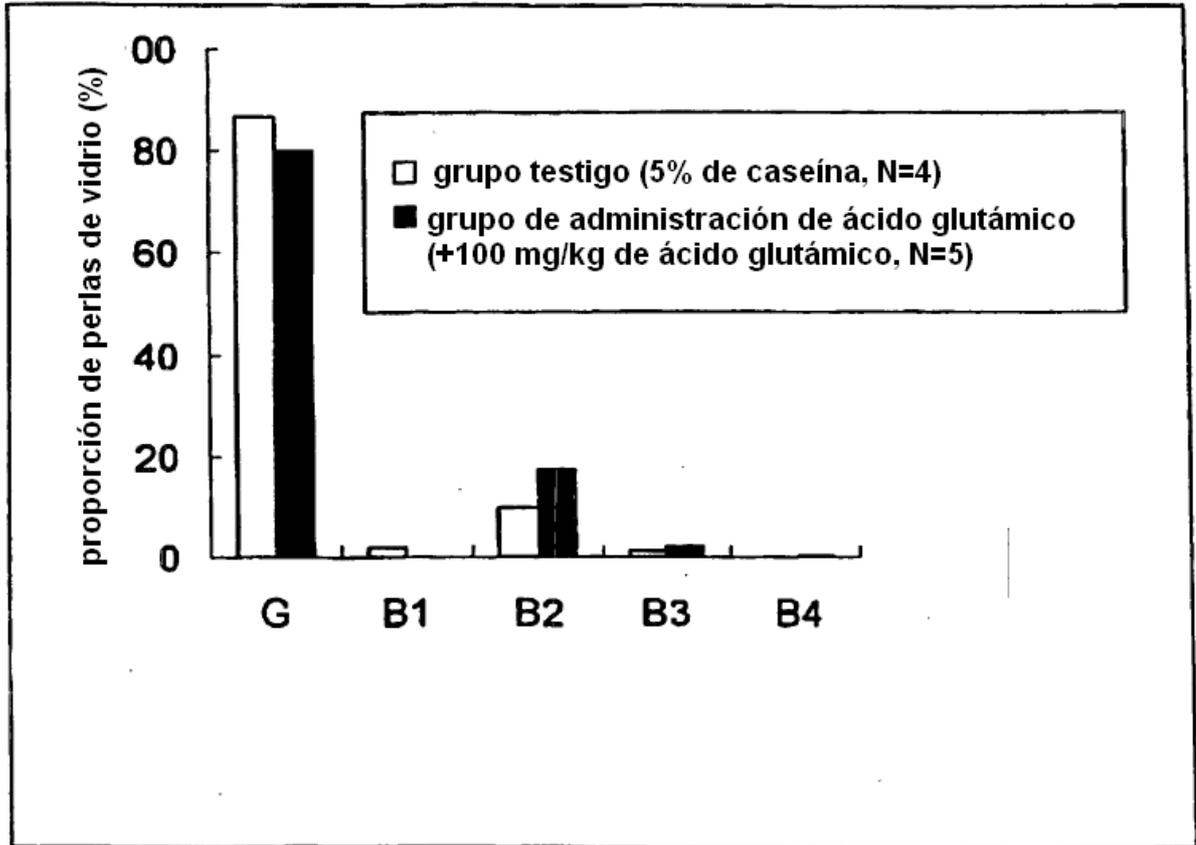


FIG. 6

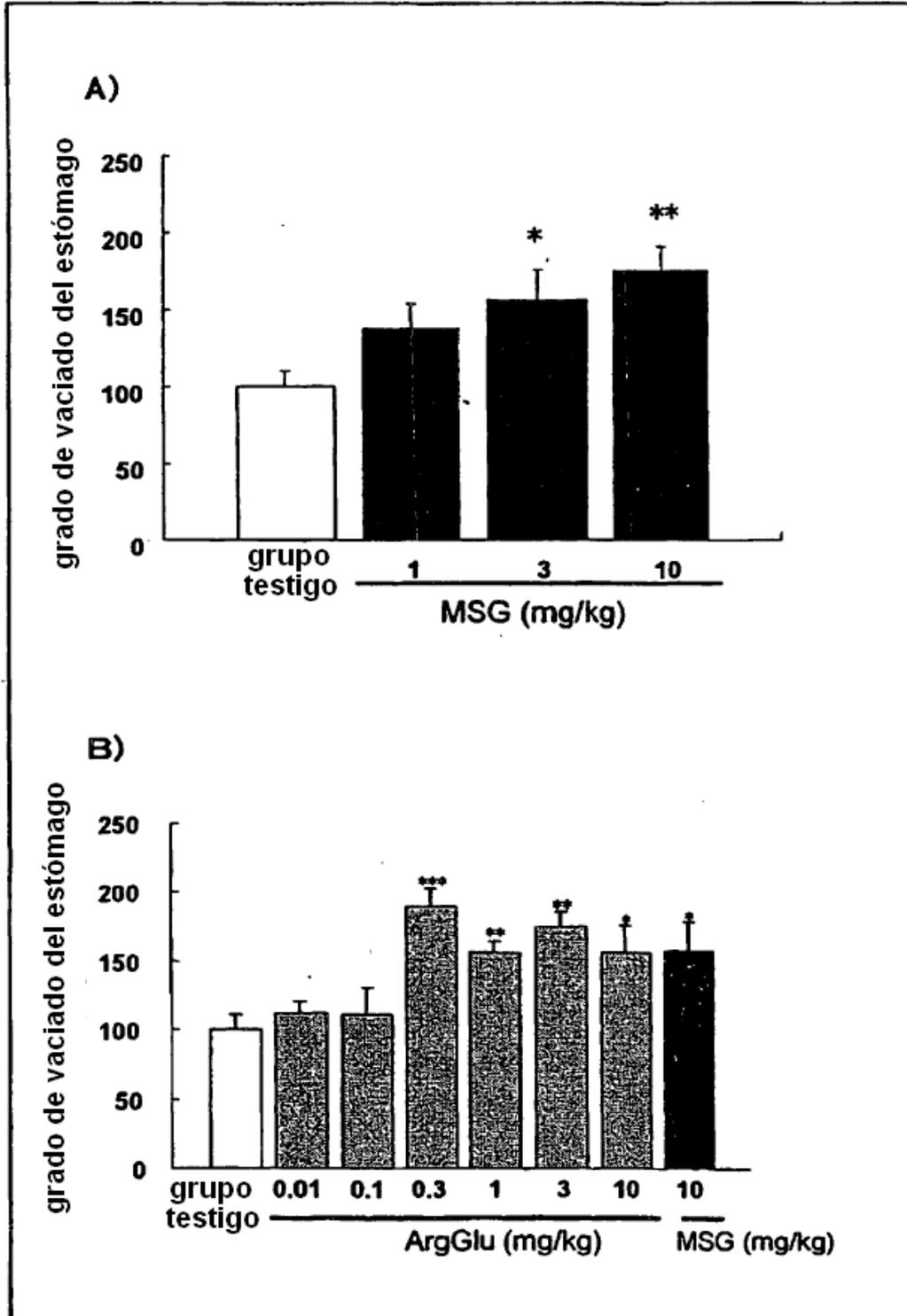


FIG. 7

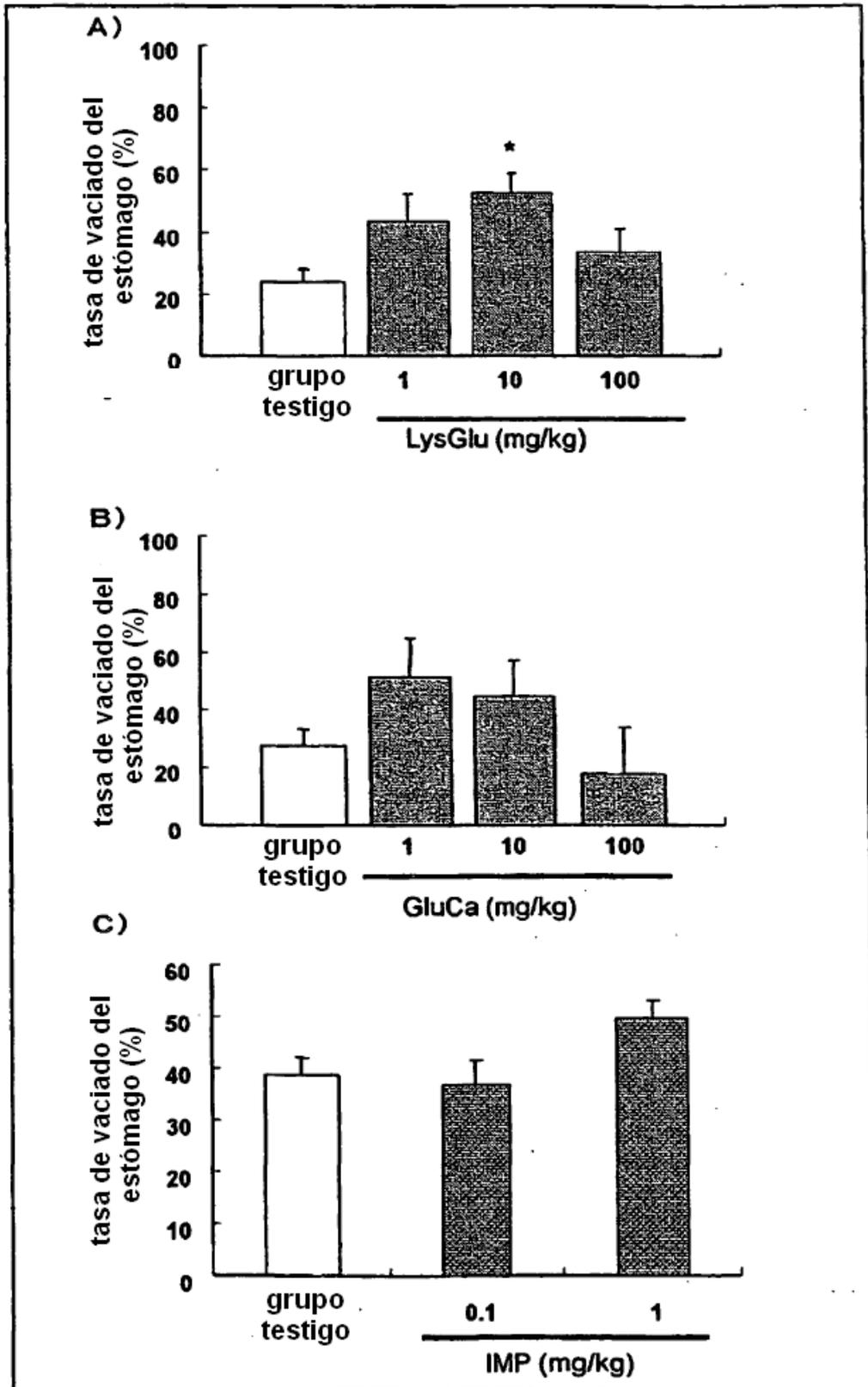


FIG. 8

