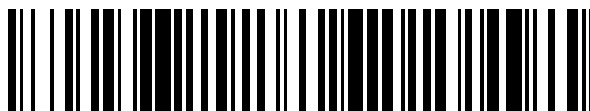


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 329**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/335** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2010 E 10777977 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2433631**

54 Título: **Composición antiinflamatoria que contiene macrolactina y un derivado de la misma como ingredientes activos**

30 Prioridad:

**22.05.2009 KR 20090044900**

**31.03.2010 KR 20100029016**

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

**28.01.2014**

73 Titular/es:

**DAEWOO PHARMACEUTICAL IND. CO., LTD.**  
**(100.0%)**

**579 Sinpyeong 2-dong Saha-gu**  
**Busan 604-032, KR**

72 Inventor/es:

**JI, YOUNG-HOON;**  
**KIM, DONG-HEE;**  
**KANG, JAE-SEON;**  
**KIM, CHUN-GYU;**  
**CHUNG, SUNG-UK;**  
**HWANG, SUNG-WOO y**  
**KANG, KYUNG-RAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 440 329 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

Composición antiinflamatoria que contiene macrolactina y un derivado de la misma como ingredientes activos

## 5 Sector técnico

La presente invención se refiere a la utilización como antiinflamatorio de compuestos de macrolactina, tales como macrolactina A (a continuación "MA"), 7-O-malonil macrolactina A (a continuación, "MMA"), y 7-O-succinil macrolactina A (a continuación, "SMA"), que son producidas a partir de *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P). concretamente, la presente invención se refiere a la utilización de compuestos de macrolactina que tienen una actividad antiinflamatoria superior que es debida a la inhibición de la formación de sintetasa de óxido nítrico inducible (a continuación, "iNOS") y ciclooxigenasa-2 (a continuación, "COX-2"), y de factor alfa de necrosis tumoral (a continuación, "TNF- $\alpha$ "), interleuquina-1 $\beta$  (a continuación, "IL-1 $\beta$ "), interleuquina-6 (a continuación, "IL-6") y factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (a continuación, "GM-CSF") que son citoquinas pro-inflamatorias.

## Antecedentes técnicos

Los compuestos de macrolactina son antibióticos macrolidos que tienen un anillo de lactona de 24 miembros (J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 7519-7524). Se ha dado a conocer que los compuestos son producidos a partir de bacterias oceánicas no clasificadas, cepas actinomyces y *Bacillus* strains, y se han identificado 21 compuestos de macrolactina. Estos compuestos de macrolactina tienen una serie de actividades farmacológicas. Los estudios anteriores de las actividades farmacológicas de los compuestos de macrolactina son los siguientes.

William Fenical dio a conocer la actividad antivírica de MA contra Herpes simplex y HIV en 1989. Ick-Dong Yoo obtuvo MA a partir de cepa *Actinomyces* sp. en 1997 y estudió la protección de neurocitos derivados de glutamato utilizando la MA. En 2001, Hiroshi Sano aisló MA de la cepa *Bacillus* sp. PP19-H3 y estudió la actividad antibacteriana de MA contra las cepas *Staphylococcus aureus* IFO 12732 y *Bacillus subtilis* IFO 3134. Sung-Won Choi obtuvo MA a partir de la cepa *Streptomyces* sp. YB-401 en 2003 y dio a conocer el efecto de inhibición de MA sobre la biosíntesis de colesterol. En 2004, Keun-Hyung Park separó MA de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CH0104 y estudió la actividad antibacteriana de MA contra *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Escherichia coli* KCTC 2593 y *Botrytis cinerea*. Joo-Won Suh obtuvo MA a partir de la cepa *Bacillus* sp. Sunhua en 2005 y estudió la inhibición de *Streptomyces scabies* que induce la costra por hongos común de la patata utilizando la MA. En 2006, Gabriella Molinari aisló MA, MMA y SMA a partir de la cepa *Bacillus subtilis* DSM 16696 y estudió la actividad antibacteriana de cada uno de dichos compuestos contra las cepas resistentes a vancomicina *Enterococci* (VRE), resistentes a metilicina *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Burkholderia cepacia*. En este estudio se informó de que tanto MMA como SMA tienen actividad antibacteriana superior contra las bacterias de prueba, mientras que MA mostró efectos antibacterianos solamente contra MRSA.

Aunque se sabe que los compuestos de macrolactina tienen varias actividades farmacológicas, no se han dado a conocer hasta el momento estudios con respecto al efecto antiinflamatorio de los compuestos de macrolactina.

La inflamación es una respuesta defensiva a una lesión que ha tenido lugar en la parte afectada de un ser vivo. Es decir, una respuesta inflamatoria es una respuesta defensiva para restablecer el estado original como respuesta a un estímulo perjudicial y eliminando la lesión causada por dicho estímulo.

El óxido nítrico (a continuación, "NO"), una de las sustancias que induce inflamación, es producido en las células endoteliales o macrófagos en estado normal. El NO, mediador que participa en la base de la vasodilatación, adhesión de plaquetas y agregación, neurotransmisión, movimiento del sistema digestivo y erección, etc. Se produce en células inflamatorias y células no inmunes y lleva a cabo también una acción defensiva contra la infección por microorganismos. La estimulación debida a lipopolisacáridos (a continuación, "LPS"), factores que inducen inflamación e irradiación, etc. Inducen la expresión de la proteína intracelular iNOS y produce NO de manera continua induciendo enfermedades inflamatorias.

Otra sustancia inductora de inflamación, prostaglandina E2 (a continuación, "PGE2") es un tipo de hormona derivado del ácido araquidónico, y participa en varios aditivos fisiológicos. La PGE2 es producida por la expresión de la proteína COX-2. Los medicamentos que suprimen la expresión de COX-2 tienen efectos analgésicos, antiedémicos, antipiréticos, antiinflamatorios y anticoagulantes, etc. Por la inhibición de la producción de PGE2 en focus inflamatorios y, por lo tanto, se pueden utilizar para la prevención y tratamiento de trombos, edemas, infartos, apoplejía y enfermedades cerebrovasculares.

Las dos sustancias anteriores inductoras de inflamación iNOS y COX-2, están íntimamente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el NO producido por exceso puede afectar la expresión de COX-2. De acuerdo con ello, un inhibidor de la actividad de iNOS y COX-2 se considera que tiene elevado potencial para su desarrollo como medicamento para la prevención y tratamiento de varias enfermedades (por ejemplo, enfermedades inflamatorias), provocadas por la producción excesiva de metabolitos de NO y PGE2.

Hasta el momento, los medicamentos esteroides y no esteroides antiinflamatorios (los NSAID) se han utilizado de manera apropiada para el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas. No obstante, los agentes convencionales antiinflamatorios tienen efectos secundarios considerablemente adversos, especialmente cuando se utilizan durante largo tiempo. Por lo tanto, es muy necesario desarrollar un nuevo agente inflamatorio con pocos efectos secundarios.

Materia de la invención

Problema técnico

Considerando el problema anterior de los agentes antiinflamatorios convencionales, el objetivo de la presente invención es el de dar a conocer la utilización antiinflamatoria de compuestos de macrolactina, tales como MA, MMA y SMA, que son producidos a partir de *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P). Especialmente, la presente invención da a conocer la utilización de compuestos de macrolactina que tienen una superior actividad antiinflamatoria que es debida a la formación de iNOS y COX-2.

Además, es objetivo de la presente invención dar a conocer una composición farmacéutica que comprende los anteriormente mencionados compuestos de macrolactina como ingredientes activos para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias.

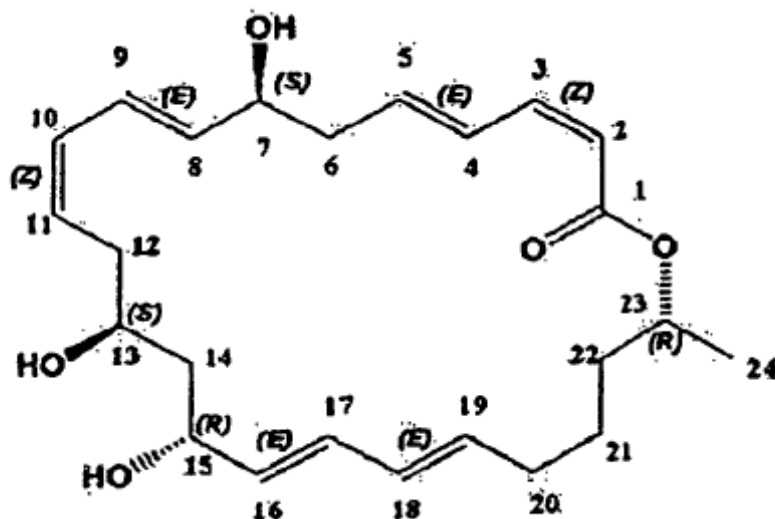
Solución técnica

En un aspecto, la presente invención da a conocer una utilización antiinflamatoria de MA de fórmula (1), MMA de fórmula (2) y SMA de fórmula (3) que son producidas a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P).

En otro aspecto, la presente invención da a conocer la utilización antiinflamatoria de las macrolactinas anteriormente citadas, tales como MA, MMA y SMA para la inhibición de la formación de las proteínas iNOS y COX-2 y citoquinas pro-inflamatorias.

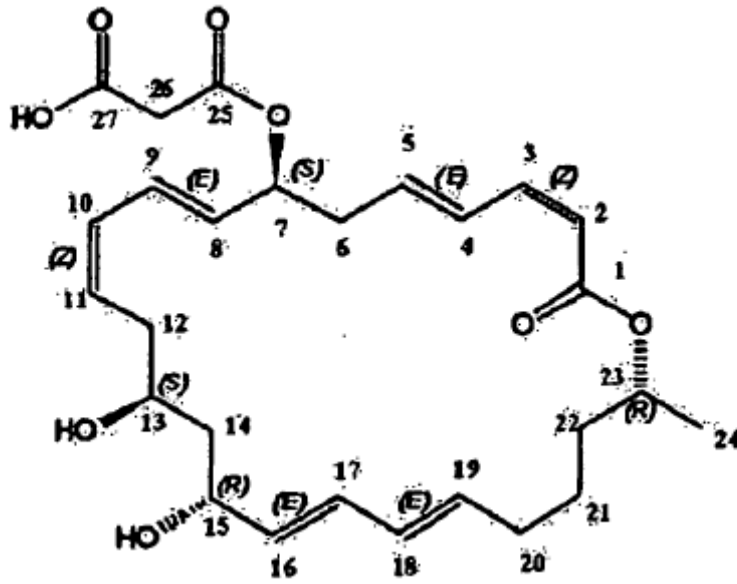
En otro aspecto adicional, la presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende los compuestos de macrolactina anteriormente citados para la prevención y tratamiento de enfermedades inflamatorias.

[Fórmula 1]



$C_{24}H_{34}O_5$   
 Peso molecular: 402,52  
 Macrolactina A

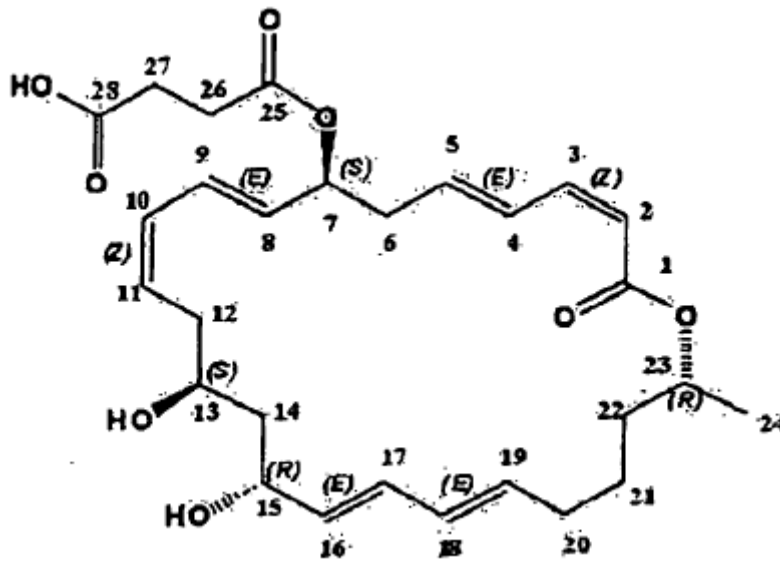
[Fórmula 2]



$C_{28}H_{36}O_8$   
 Peso molecular: 488,57  
 7-O-malonil macrolactina A

5

[Fórmula 3]



$C_{28}H_{38}O_8$   
 Peso molecular: 502,6  
 7-O-succinil macrolactina A

10

15 La presente invención se explicará de manera más detallada a continuación

A efectos de obtener MA de fórmula (1) y MMA de fórmula (2), se hace fermentar, en un medio de MA, *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P), que es separado por los presente inventores. El caldo fermentado es extraído mediante acetato de etilo y el extracto es concentrado. El producto objetivo es separado y purificado de acuerdo con procedimientos del ejemplo 1.

20

A efectos de obtener SMA de fórmula 3, la cepa anterior es fermentada en caldo de soja trípico (TSB) que contiene la resina HP-20. El producto objetivo es separado y purificado de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 1.

25

Estructuras de los productos purificados son analizadas por LC/Masas y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Hasta la actualidad no se ha dado a conocer investigaciones con respecto a los efectos antiinflamatorios de los compuestos de macrolactina antes indicados MA, MMA y SMA.

Los presentes inventores han confirmado los efectos antiinflamatorios de los compuestos de macrolactina antes indicados para conseguir la presente invención. A efectos de investigar los efectos antiinflamatorios, se estimuló una línea celular de macrófago murino RAW264.7 tratado con cada uno de los compuestos purificados por LPS (0,1 µg/ml o 1,0 µg/ml, Sigma), y a continuación se analizó la formación de sustancias inductoras de inflamación 1) NO y 2) PEG2 y la expresión de enzimas relacionadas a su formación. La formación de 3) citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y GM-CSF se analizó también por los mismos procedimientos.

1) La supresión de la formación de NO fue determinada por la formación de Griess. Como resultados, se confirmó que MA, MMA y SMA inhibían fuertemente la formación de NO, en comparación con el grupo de control tratado solamente con LPS. El efecto de inhibición sobre la formación de NO de los compuestos de macrolactina era especialmente comparable o superior al de la hidrocortisona.

La formación de NO está relacionada con la proteína iNOS. Una vez se ha inducido la actividad de iNOS se forma una gran cantidad de NO durante un tiempo prolongado. Se sabe que NO tiene un efecto adverso en un sistema vivo, tal como en la vasodilatación patológica, citotoxicidad, daños en tejidos, etc. Y también se sabe que acelera dichas respuestas inflamatorias, tales como permeabilidad vascular y edema y agrava la inflamación al favorecer la biosíntesis de mediadores inflamatorios en condiciones de inflamación.

Para investigar el mecanismo de acción para suprimir la formación de NO, se estimuló un macrófago murino RAW264.7 tratado con cada uno de los compuestos de macrolactina por medio de LPS para inducir la formación de iNOS, y a continuación se determinó la extensión de la supresión de la formación de iNOS en cada compuesto por PCR en tiempo real y análisis western.

Como resultado, todos las MA, MMA y SMA suprimieron fuertemente la expresión de iNOS mRNA en la expresión de gen por PCR en tiempo real, y los efectos de la supresión eran comparables o superiores a los de la hidrocortisona. En el nivel de expresión de proteína determinado por análisis western, los presentes compuestos de macrolactina mostraron también intensos efectos de supresión en comparación con el grupo de control tratado solamente con LPS.

Por los resultados anteriores, los presentes compuestos de macrolactina se considera que suprimen la formación de NO por la acción de supresión de la expresión de la proteína iNOS.

2) La supresión de otro mediador inflamatorio de PGE2 fue determinado utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA) mediante kit. Como resultado, se confirmó que todos las MA, MMA y SMA inhibían fuertemente la formación de PGE2, en comparación con el grupo de control tratado solamente con LPS. Especialmente, el efecto de inhibición de la formación de PGE2 de los compuestos de macrolactina fue comparable o superior al de la hidrocortisona. Muchos medicamentos antiinflamatorios tienen un mecanismo de acción para suprimir la síntesis de PGE2, que es debida a la inhibición de la formación y actividad de la proteína COX-2. La PGE2 sintetizada por COX-2 intermedia la respuesta inflamatoria. Es sabido que la PGE2 producida por la proteína COX-2 estimula la respuesta inflamatoria, la respuesta inmune y vasculogénesis y está involucrada en el inicio de cáncer. Para investigar el enlace entre la supresión de la síntesis de PGE2 y la supresión de la síntesis de la proteína COX-2, se estimuló por LPS un macrófago murino RAW264.7 tratado con cada uno de los compuestos de macrolactina para inducir la formación de COX-2, y a continuación se determinó la extensión de la supresión de la proteína de COX-2 de cada compuesto por PCR en tiempo real y análisis western. Como resultado, los compuestos de macrolactina de la presente invención suprimieron intensamente la expresión de COX-2 mRNA, y las actividades de supresión eran comparables o superiores a las de la hidrocortisona. En la expresión de la proteína COX-2 determinada por análisis western, los presentes compuestos de macrolactina mostraron también fuertes efectos de supresión en comparación con el grupo de control tratado solamente con LPS.

De acuerdo con los resultados anteriores, los presentes compuestos de macrolactina se considera que inhiben intensamente la formación de PGE2 al suprimir la expresión de la proteína COX-2.

Por los resultados anteriores, se ha confirmado que los presentes compuestos de macrolactina inhibían intensamente la formación de NO y PGE2 por la acción de supresión de la formación de iNOS y la proteína COX-2.

3) La supresión de citoquinas pro-inflamatorias por los presentes compuestos de macrolactina fue determinada utilizando un kit ELISA de ratón (KOMA Biotech).

Como resultado de la determinación de TNF- $\alpha$  se confirmó que todos las MA, MMA y SMA inhibían la formación de TNF- $\alpha$ , en comparación con el grupo de control tratado solamente con LPS. Además, el efecto de inhibición sobre la

formación de TNF- $\alpha$  de los compuestos de macrolactina fue comparable o superior al de hidrocortisona. MA tiene un efecto de inhibición especialmente superior en la formación de TNF- $\alpha$  en comparación con otras sustancias de control.

5 Como resultado de la determinación de IL-1 $\beta$ , se confirmó que cada uno de MA y SMA inhibía intensamente la formación de IL-1 $\beta$  y el efecto de inhibición en la formación de IL-1 $\beta$  de los compuestos de macrolactina era comparable o superior al de la hidrocortisona.

10 Como resultado de la determinación de IL-6, se confirmó que todos las MA, MMA y SMA inhibían intensamente la formación de IL-6. Los efectos de inhibición en la formación de IL-1 $\beta$  de los compuestos de macrolactina no era superior al de la hidrocortisona.

15 Como resultado de la determinación GM-CSF, se confirmó que cada uno de las MA y SMA inhibía intensamente la formación de GM-CSF. Los efectos de inhibición sobre la formación de GM-CSF de los compuestos de macrolactina fue superior a la de la hidrocortisona.

De acuerdo con los resultados anteriores, los presentes compuestos de macrolactina se consideran que inhiben intensamente las citoquinas pro-inflamatorias que están involucradas en inflamación aguda y crónica.

20 Además, se determinaron las citotoxicidades en un macrófago murino RAW264.7 de los compuestos actuales de macrolactina e hidrocortisona utilizados típicamente como agente antiinflamatorio por análisis de bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (a continuación, "MTT"). Como resultado, las citotoxicidades de los presentes compuestos de macrolactina fueron inferiores al de la hidrocortisona.

25 Descripción de los dibujos

La figura 1 es un cromatograma MPLC de extracto de caldo fermentado de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2.

30 La figura 2 es un cromatograma MPLC de extracto de cultivo de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2.

La figura 3 es el resultado de un análisis LC/Masas de macrolactina A producida por la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS- 2: a) cromatograma LC determinado a 262 nm; b) espectro UV y c) espectro de ionización por electropulverización (espectro ESI).

35 La figura 4 es el resultado de un análisis LC/Masas de 7-O-malonil macrolactina A producida por la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2: a) cromatograma LC determinado a 262 nm; b) espectro UV y c) espectro de ionización por electropulverización (espectro ESI).

40 La figura 5 es el resultado de un análisis LC/Masas de 7-O-succinil macrolactina A producida por la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2: a) cromatograma LC determinado a 262 nm; b) espectro UV y c) espectro de ionización por electropulverización (espectro ESI).

45 La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de NO en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

La figura 7 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de PGE2 en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

50 La figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la expresión de iNOS mRNA en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

La figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la expresión de COX-2 mRNA en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

55 La figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la producción de iNOS y proteína COX-2 en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

60 La figura 11 es un gráfico que muestra la citotoxicidad sobre células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

La figura 12 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de TNF- $\alpha$  en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

65 La figura 13 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de IL-1 $\beta$  en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

La figura 14 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de IL-6 en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

- 5 La figura 15 es un gráfico que muestra el efecto de inhibición de la formación de GM-CSF en células RAW264.7 de acuerdo con los presentes compuestos de macrolactina.

Modalidad preferente

- 10 La presente invención se explica en más detalle por los siguientes ejemplos. No obstante, estos ejemplos están destinados a ilustrar solamente al presente invención y el alcance de la misma no está limitada por ellos.

Ejemplo 1: producción de macrolactina A 7-O-malonil macrolactina A y 7-O-succinil macrolactina A a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, separación y análisis de las mismas

- 15 [Etapa 1: producción de macrolactina A y 7-O-malonil macrolactina A a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, y separación de las mismas]

- 20 Se llevó a cabo un proceso de fermentación utilizando la cepa de *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P) aislada por los presentes inventores en medio MA para obtener MA y MMA. La composición del medio MA era la siguiente:

Caldo nutriente (Difco) 16 g/L, leche desnatada 10 g/L, 2,5  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , 500  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 13 mM KCl.

- 25 El proceso de fermentación fue llevado a cabo en la situación de 0,143 vvm de aire entrante y 200 rpm a 30°C, y el pH 6,8 fue mantenido por 1N HCl y 3N NaOH. El caldo fermentado fue extraído por acetato de etilo y a continuación fue concentrado. El concentrado fue disuelto por metanol para preparar una muestra para cromatografía líquida de presión media (a continuación, "MPLC"). Se utilizó un sistema Buchi MPLC (bomba Buchi C-605, columna 1,5x23 cm, colector de fracciones Buchi C-660) y se llenó en la columna LiChroprep C-18 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck). La detección se llevó a cabo a 262 nm, y la fase móvil era 40% de acetonitrilo con un caudal de 15 mL/min. Después de que el extracto de caldo fermentado fue inyectado en la columna MPLC, se concentraron las fracciones correspondientes a los picos 1 y 2 de la figura 1 para formar muestras para el análisis posterior.

- 35 [Etapa 2: producción de 7-O-succinil macrolactina A a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, y separación de la misma]

- 40 La cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P) aislada por los presentes inventores fue inoculada en caldo de soja triptico (TSB) conteniendo 10% de resina HP-20 (Mitsubishi Chemical) y se cultivó a 200 rpm y 30°C durante 2,5 días. Después del cultivo, la resina HP-20 fue recogida y lavada con agua. Se utilizó metanol para eluir la sustancia combinada. El eluido de metanol fue concentrado para formar una muestra para MPLC. Las condiciones de funcionamiento de MPLC fueron las mismas que se han descrito. La fracción correspondiente al pico indicado de la figura 2 fue concentrada para formar una mezcla para análisis sucesivos.

- 45 [Etapa 3: condición de análisis y elucidación de estructura]

- 50 Cada una de las sustancias purificadas en las etapas 1 y 2 fue analizada mediante el siguiente equipo y condiciones. El análisis de masas fue llevado a cabo mediante agilent 1100 serie LC/Masa, equipado con columna Zorbax SB-C18 (tamaño de partículas 5  $\mu\text{m}$ , 4,6X 250 mm). La fase móvil de LC era acetonitrilo y agua conteniendo 0,1% de ácido fórmico y las condiciones de análisis LC utilizaron un disolvente como gradiente de 0 a 100% acetonitrilo durante 20 minutos a 1 mL/min y con detección a 262 nm. Las condiciones del análisis de masa eran AP-ESI (presión atmosférica-ionización electropulverización) utilizando 13 L/min de flujo de gas de secado, 50 psi de presión de vapor y 350°C de temperatura el gas de secado. El voltaje capilar era de 4000 V en modalidad catiónica y 3500 V en modalidad aniónica, el rango de masas era de 100 m/z a 1000 m/z, y el voltaje era de 150 V. cada una de las sustancias purificadas en las etapas 1 y 2 fue analizada bajo las condiciones anteriores y las figuras 3 a 5 muestran los resultados. Los resultados del análisis de masas de cada compuesto fueron los siguientes.

- 60 En la figura 1, la fracción nº1 fue identificada como  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  425,4 m/z,  $[\text{M}+\text{K}]^+$  441,4 m/z, absorbancia máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 262 nm, y pureza 98,3%, y la fracción nº2, como  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  511,7 m/z, absorbancia máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 258 nm, y pureza 84,88%. La fracción de la figura 2 fue identificada como  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  526,0 m/z,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  502,0 m/z, absorbancia máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 258 nm y pureza 97,02%.

- 65 Unos 30 mg de cada sustancia purificada fueron disueltos en solución de DMSO- $d_6$  y a continuación analizados por RMN para identificar su estructura química. Para la identificación se utilizaron varias técnicas RMN tales como  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT- 90, DEPT- 135, Horno COZY, HMQC, y HMBC y se utilizó también un procedimiento de desacoplamiento de protones para solucionar el problema del espectro  $^1\text{H}$ -RMN.

Como resultado del análisis RMN, se identificaron la fracción nº1 de la figura 1 y de la figura 3 como MA, mostrándose los resultados en las tablas 1 y 4. La rotación específica de la sustancia determinada por polarímetro (POLAX-D, Atago) era -10 a 17°C (c=4,0, metanol), que confirmó que la sustancia era MA, el mismo compuesto de la fórmula 1.

5

Tabla 1

Resultado de análisis RMN de macrolactina A producida a partir de la cepa <i>Bacillus polyfermenticus</i> KJS-2						
Nº	$\delta_H$ (500MHz)	m	J [Hz]	$\delta_C$ (129MHz)		HMBC
1	-	-	-	165,8870	C	
2	5,55	d	11,68	117,0377	CH	C 1, 4
3	6,65	dd	11,54, 11,51	143,8163	CH	C 1, 4, 5
4	7,06	dd	11,56, 15,13	128,4909	CH	C 3, 6
5	6,19	dt	15,17, 14,68	142,7268	CH	C 3, 4, 6, 7
6	2,32	m	-	42,2335	CH <sub>2</sub>	C 4, 5, 7, 8
7	4,16	m	-	70,0227	CH	C 5, 6, 8, 9
8	5,71	dd	5,23, 15,16	137,8565	CH	C 6, 7, 10, 11
9	6,48	dd	15,06, 11,21	124,0051	CH	C 7, 8, 10, 11
10	6,02	dd	10,9, 10,85	129,9103	CH	C 8, 9, 12
11	5,49	m	-	128,1563	CH	C 9, 12
12a	2,36	m	-			C 10, 11, 13
12b	2,14	m	-	35,8599	CH <sub>2</sub>	C 10, 11, 13, 14
13	3,64	m	-	67,1403	CH	C 11, 15
14	1,42	m	-	43,8152	CH <sub>2</sub>	C 15, 16
15	4,14	m	-	67,5901	CH	C 13, 14, 16, 17
16	5,49	dd	6,15, 14,85	136,4129	CH	C 14, 15, 17, 18, 19
17	6,04	dd	14,84, 10,35	128,6258	CH	C 18, 19
18	5,96	dd	10,5, 14,62	130,6756	CH	C 16, 17
19	5,59	dt	14,36, 14,18	133,4554	CH	C 17, 20, 21
20	2,07	m	-	31,8226	CH <sub>2</sub>	C 18, 19, 21, 22
21	1,44	m	-	24,4871	CH <sub>2</sub>	C 19
22	1,52	m	-	34,7418	CH <sub>2</sub>	C 21, 23
23	4,9	m	-	70,5721	CH	C 1, 21
24	1,2	d	6,27	19,9672	CH <sub>2</sub>	C 22, 23

Como resultado del análisis RMN, se identificaron la fracción nº2 de la figura 1 y la figura 4 como MMA, mostrándose los resultados en las tablas 2 y 4. La rotación específica de la sustancia determinada por polarímetro (POLAX-D, Atago) era -5 a 17°C (c=4,0, metanol), que confirmó que la sustancia era MMA, el mismo compuesto de la fórmula 2.

10



Tabla 2

Resultado de análisis RMN de 7-O-malonil macrolactina A producida a partir de la cepa Bacillus polyfermenticus KJS-2						
Nº	$\delta_H$ (500MHz)	m	J [Hz]	$\delta_C$ (129MHz)		HMBC
1	-	-	-	165,75	C	-
2	5,58	d	11,38	117,88	CH	C 1, 3, 4
3	6,62	dd	11,34, 11,92	143,3	CH	C 1, 4, 5
4	7,1	dd	11,74, 15,65	129,35	CH	C 2, 3, 6
5	6,1	dt	15,23, 14,62	139,72	CH	C 3, 6, 7
6	2,54	m	-	38,74	CH <sub>2</sub>	C 4, 5, 7
7	5,39	m	-	73,64	CH	C 5, 6, 8, 9, 25
8	5,72	dd	5,68, 15,41	131,03	CH	C 6, 7, 10
9	6,53	dd	15,26, 11,08	126,93	CH	C 7, 11
10	6,04	dd	11,33, 10,63	129,26	CH	C 8, 9, 11, 12
11	5,59	m	-	130,26	CH	C 9, 10, 12
12a	2,4	m	-	35,8	CH <sub>2</sub>	C 11, 13, 14
12b	2,17	m	-	67,07	CH	C 11, 14, 15
13	3,67	m	-	43,81	CH <sub>2</sub>	C 12, 15, 16
14	1,4	M	-	67,53	CH	C 13, 14, 16, 17
15	4,16	m	-	136,48	CH	C 14, 15, 18
16	552	dd	6,04, 14,62	128,62	CH	C 15, 18, 19
17	6,03	m	-	130,67	CH	C 16, 17, 20
18	6,0	dd	10,58, 14,52	133,31	CH	C 17, 18, 20, 21
19	5,57	m	-	31,74	CH <sub>2</sub>	C 18, 19, 21, 22
20	2,07	m	-	24,49	CH <sub>2</sub>	C 19, 20, 22 23
21a	1,54	m	-	34,72	CH <sub>2</sub>	C 20, 21, 23, 24
21b	1,41	m	-	70,61	CH	C 1, 21, 22, 24
22a	1,56	m	-	19,96	CH <sub>2</sub>	C 21, 22, 23
22b	1,42	m	-	166,47	C	-
23	4,93	m	-	42,02	CH <sub>2</sub>	C 7, 25, 27
24	1,2	d	6,27	168,27	C	-
25	-	-	-			
26	3,39	s	-			
27	-	-	-			

Como resultado del análisis RMN, se identificaron de la figura 2 y de la figura 4 como SMA, mostrándose los resultados en las tablas 3 y 4. La rotación específica de la sustancia determinada por polarímetro (POLAX-D, Atago) era -15 a 17°C (c=4,0, metanol), que confirmó que la sustancia era MMA, el mismo compuesto de la fórmula 3.

5

Tabla 3

Resultado de análisis RMN de 7-O-succinil macrolactina A producida a partir de la cepa Bacillus polyfermenticus KJS-2						
Nº	$\delta_H$ (500MHz)	m	J [Hz]	$\delta_C$ (129MHz)		HMBC
1	-	-	-	165,2841	C	-
2	5,56	d	11,47	117,3471	CH	C 1, 3, 4, 23
3	6,63	dd	11,48, 11,51	142,8233	CH	C 1, 4, 5
4	7,09	dd	11,63, 15,1	128,8817	CH	C 2, 3, 6
5	6,08	dt	15,15, 14,71	139,5009	CH	C 3, 6, 7
6	2,56	m	-	38,3741	CH <sub>2</sub>	C 4, 5, 7, 8
7	5,38	m	-	72,2324	CH	C 5, 6, 8, 9, 25
8	5,71	dd	5,48, 15,24	130,9006	CH	C 6, 7, 9, 10
9	6,47	dd	15,15, 11,17	126,0905	CH	C 7, 8, 10, 11
10	6,052	dd	11,08, 10,5	128,7842	CH	C, 8, 9, 11, 12
11	5,59	m	-	129,6256	CH	C 9, 10, 12, 13
12a	2,41	m	-	-	-	C 10, 11, 13, 14
12b	2,17	m	-	36,2705	CH <sub>2</sub>	C 10, 11, 13, 14
13	3,64	m	-	66,6737	CH	C 11, 14, 15
14	1,42	m	-	43,5422	CH <sub>2</sub>	C 12, 13, 15, 16
15	4,15	m	-	67,1329	CH	C 13, 14, 16, 17
16	5,52	dd	6,12, 14,52	135,9759	CH	C 14, 15, 18
17	6,055	dd	14,12, 10,63	128,1934	CH	C 15, 16, 18, 19
18	6,0	dd	10,53, 14,99	130,1854	CH	C 16, 17, 20
19	5,59	dt	14,52, 13,85	132,8811	CH	C 17, 20, 21
20	2,07	m	-	31,3294	CH <sub>2</sub>	C 18, 19, 21, 22
21	1,45	m	-	24,0792	CH <sub>2</sub>	C 19, 20, 22, 23
22	1,54	m	-	34,2894	CH <sub>2</sub>	C 20, 21, 23, 24
23	4,94	m	-	70,1668	CH	C 1, 21, 22, 24
24	1,2	d	6,27	19,4997	CH <sub>2</sub>	C 22, 23
25	-	-	-	171,3042	C	-
26	2,47	-	-	28,6109	CH <sub>2</sub>	C 7, 25, 27, 28
27	2,50	-	-	29,7757	CH <sub>2</sub>	C 25, 26, 28
28	-	-	-	173,1817	C	-

La tabla 4 muestra los procedimientos de producción, rendimientos, purezas y propiedades de MA, MMA y SMA producidas a partir de la cepa Bacillus polyfermenticus KJS-2, investigados por la presente invención.

Tabla 4

Procedimientos de producción, rendimientos, purezas y propiedades de MA, MMA y SMA producidas a partir de la cepa <i>Bacillus polyfermenticus</i> KJS-2											
Compuesto	Medio	Procedimiento de cultivo	Periodo de cultivo		Rendimiento mg/L	Pureza %	Fórmula de la molécula	Peso molecular	$\lambda_{max}$	$[\alpha]_D^{17}$ (c en MeOH)	ESI-MS m/z
			días	de cultivo							
MA	medio	Fermentación	2	58	98,3	$C_{24}H_{35}O_5$	402,52	230, 262	-10 (4,0)	425,4 [M+Na] <sup>+</sup> 441,4 [M+K] <sup>-</sup>	
	MA										
MMA	medio	Fermentación	0,5	16	84,9	$C_{27}H_{35}O_8$	488,57	230, 258	-5 (40)	511,7 [M+Na] <sup>+</sup> 487,7 [M+H] <sup>-</sup>	
	MA										
SMA	TSB	Incubación en matraz	2,5	138	97,02	$C_{23}H_{35}O_5$	502,6	230, 258	-15 (4,0)	525,6 [M+Na] <sup>+</sup> 501,6 [M+H] <sup>-</sup>	

MA, macrolactina A; MMA, 7-O-malonil macrolactina A; SMA, 7-0-succinil macrolactina A

Ejemplo 2: investigación de actividades antiinflamatorias de los compuestos de macrolactina sobre una línea celular RAW264.7 de macrófago murino

5 Se obtuvo una línea celular de macrófago murino RAW264.7 de Korean Cell Line Bank (KCLB). Se cultivó en medio Eagle modificado Dulvecco (DMEM, LONZA) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS, LONZA) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma) a un incubador a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y a continuación se subcultivó cuando al densidad de células alcanzó el 80%. Después de haber cultivado las células RAW264.7 durante 24 horas, se añadieron MA (1-100 µM), MMA (10 µM), SMA (10 µM) e hidrocortisona (10 µM), que es una sustancia bien conocida que tiene actividad antiinflamatoria. Una hora después de la adición, se añadió LPS (0,1 ó 1,0 µg/ml, Sigma) a la mezcla, que fue cultivada a continuación durante 8 o 16 horas. Se utilizó dimetil sulfóxido (a continuación, "DMSO") como control negativo, mientras que se utilizó LPS (0,1 ó 1,0 µg/ml, Sigma) como control positivo sin añadir compuestos de macrolactina.

#### 15 Experimento 1: efecto de inhibición sobre la formación de NO

Se determinó la concentración de NO en cultivo de células utilizando el kit de ensayo colorimétrico Nitrato/Nitrito (Cayman). Las células RAW264.7 de macrófago murino ajustadas a  $1 \times 10^5$  células/pocillo fueron cultivadas en una placa de 6 pocillos durante 24 horas en las condiciones mencionadas en el ejemplo 2 y a continuación se cultivaron adicionalmente durante 16 horas después de ser tratadas con los presentes compuestos de macrolactina y LPS (0,1 µg/ml, Sigma). Los medios cultivados fueron tratados con reactivo de Griess R1 (sulfanilamida) y a continuación reactivo de Griess R2 (N-(1-Naftil)-etilendiamina en una placa de 96 pocillos proporcionada por el fabricante y a continuación se detectó la formación del grupo azo púrpura a partir de nitrito. La cantidad de NO producido fue calculada utilizando la curva de calibración que se habría preparado por la solución estándar facilitada por el fabricante con una adsorbancia de 540 nm en un espectrómetro de UV.

Como resultado, tanto MA como hidrocortisona inhibieron intensamente la formación de NO, mientras que MMA y SMA mostraron bajas actividades de inhibición (ver figura 6).

#### 30 Experimento 2: efecto de inhibición sobre la formación de PGE2

Se determinó la cantidad de PGE2 formada, factor intracelular antiinflamatorio, utilizando un kit de sistema de inmunoensayo de enzimas biotrak E2 de prostaglandina Amersham Enzymeimmunoassay (EIA) (GE Healthcare). Se cultivaron células RAW264.7 de macrófago murino ajustadas a  $2 \times 10^4$  en una placa de 96 pocillo durante 24 horas en las condiciones mencionadas en el ejemplo 2 y a continuación se cultivaron durante 16 horas después de tratamiento con los presentes compuestos de macrolactina y LPS (0,1 µg/ml, Sigma). La cantidad de PGE2 producida fue calculada utilizando la curva de calibración que se había preparado por la solución estándar facilitada por el fabricante con una absorbancia de 450 nm en un espectrómetro de UV. El valor  $r^2$  de la curva de calibración contra la sustancia estándar fue superior a 0,99.

Como resultado, todas las MA, MMA y SMA inhibieron intensamente la formación de PGE2 y las actividades de inhibición fueron similares o comparables a las de la hidrocortisona (ver figura 7).

#### 45 Experimento 3: efecto en la expresión de iNOS y COX-2 mRNA

El efecto de los presentes compuestos de macrolactina sobre la expresión de factores inflamatorios intracelulares iNOS y COX-2 mRNA fue investigado. Se cultivaron células RAW264.7 de macrófago murino ajustadas a  $1 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos durante 24 horas en las condiciones mencionadas en el ejemplo 2 y a continuación se cultivaron durante 16 horas después de su tratamiento con los presentes compuestos de macrolactina y LPS (0,1 µg/ml, Sigma). El ARN total de las células cultivadas fue aislado por reactivo Trizol (Sigma) en condiciones de ausencia de ARNs. Se utilizó un kit de síntesis cADN (TAKARA) para obtener una plantilla para PCR utilizando el ARN total separado. A la mezcla de 1 µl de Oligo dT Primer (50 µM), 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno) y 2 µg de la plantilla ARN, se añadió dH<sub>2</sub>O libre de ARNs para ajustar el volumen total a 10 µl. La mezcla fue mantenida a 65°C durante 5 minutos y a continuación en hielo durante 2 minutos. Se añadieron a 10 µl de la muestra 4 µl de tampón 5x PrimeScript™, 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl) y 0,5 µl de PrimeScript™ RTase (200 U/µl), se añadió dH<sub>2</sub>O libre de ARNs para ajustar el volumen total a 20 µl. La mezcla se hizo reaccionar a 42 °C durante 30 minutos para sintetizar cADN.

A la mezcla de 25-50 ng de cADN sintetizado, 5 µl de tampón sensiMixPlus SYBR 2X (Quantance) y 0,25 pmol de cada cebador, tal como se muestra en la tabla 5, se añadió agua destilada para ajustar el volumen total a 10 µl. La extensión de la expresión de iNOS y COX-2 mRNA de la mezcla se determinó utilizando un amplificador de genes en tiempo real (Corbett Life Science Rotor-gene 6000). Las condiciones de funcionamiento del amplificador de genes en tiempo real fueron las siguientes: la desnaturalización inicial empezó a 95°C durante 5 minutos y se repitió 50 veces a 94°C durante 30 segundos, a 57°C durante 30 segundos y a 72°C durante 30 segundos. Cuando las expresiones de mRNA de las muestras fueron comparadas entre sí, la del gen doméstico fue determinada al mismo

tiempo y a continuación se calculó la cantidad relativa. Compensando la cantidad de ARN en cuanto al valor medido del gen doméstico, se calculó la cantidad de mRNA producida en cada muestra a valor Ct (ciclo umbral).

5 Como resultado, las MA, MMA y SMA inhibieron intensamente todas ellas las expresiones de iNOS y COX-2 mRNA, y las actividades de inhibición fueron similares o comparables a las de la hidrocortisona (ver figuras 8 y 9).

Tabla 5

Secuencia de nucleósidos y tamaños de fragmento de los cebadores utilizados en la amplificación de genes en tiempo real		
Gen	Secuencias primarias	Dimensión del fragmento (bp)
COX-2	F 5'-CAGCAAA TCCTTGCTGTTCC-3' R 5'-TGGGCAAAGAA TGCAAACAT-3'	450
iNOS	F 5'-ATGTCCGAAGCAAACATCACA-3' R 5'-TAATGTCCAGGAAGTAGGTGAGG-3'	450
GAPDH	F 5'-GGCATTGCTCTCAA TGACAA-3' R 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'	200

10 Experimento 4: efecto en la formación de iNOS y proteína COX-2

10 Se investigó el efecto de los presentes compuestos de macrolactina sobre la formación de factor inflamatorio intracelular de iNOS y proteína COX- 2. Se cultivaron células RAW264.7 de macrófago murino ajustadas a  $1 \times 10^6$  células/platillo en un platillo de 100 mm durante 24 horas en las condiciones mencionadas en el ejemplo 2 y a continuación se cultivaron durante 16 horas después de su tratamiento con los presentes compuestos de macrolactina y LPS (0,1 µg/ml, Sigma). Las células fueron lavadas 2~3 veces con PBS en frío y recogidas a continuación. Se añadieron 100 µl de 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,5 (0,1 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF) a las células recogidas que fueron sometidas a lisis utilizando nitrógeno líquido. El lisado fue centrifugado a 4°C durante 10 minutos al 13.000 rpm recogiendo el sobrenadante. Las proteínas fueron analizadas cuantitativamente por el método Bradford. Se sometieron 50 µg de la proteína a electroforesis de gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel SDS-PAGE fue transferido a membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 50 V durante 2 horas. La membrana de nitrocelulosa fue lavada dos veces con 1x Tris con tampón de solución salina (TBS; 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl), al que se le añadió 3% de solución de gelatina para bloquear la reacción de proteína no específica y a continuación reaccionó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar 3% de solución de gelatina, se añadió 1x Tris con tampón de solución salina-Tween (TBS-T; 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20). Para investigar la expresión de las proteínas iNOS y COX-2, se diluyeron iNOS anti-ratón (Cell Signaling), COX-2 anti-ratón (Cell Signaling) y GAPDH anti-ratón (Cell Signaling) con 1x TBS-T en una proporción 1:1000 y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo fue lavado 2 veces con 1x TBS-T y a continuación se hizo reaccionar con IgG anticonejo (Sigma) unido con fosfatasa alcalina anticuerpo secundaria y se diluyó con 1x TBS-T en una proporción 1:5000 durante 1 hora. El reactivo fue lavado 3 veces con 1x TBS-T, y se identificó la banda de proteínas correspondientes al anticuerpo utilizando Sustrato de Revaldo de Color BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro azul de tetrazolio, Promega).

35 Como resultado, todas las MA, MMA y SMA inhibieron intensamente la formación de las proteínas iNOS y COX-2, y las actividades de inhibición eran similares o comparables a las de la hidrocortisona (ver figura 10).

40 Experimento 5: efecto en la citotoxicidad

40 Se utilizó análisis MTT para investigar los efectos citotóxicos sobre las células RAW264.7 de macrófago murino de las presentes macrolactinas. Las células ajustadas a  $4 \times 10^4$  células/pocillo fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos durante 24 horas en las condiciones mencionadas en el ejemplo 2 y a continuación cultivadas durante 16 horas después de su tratamiento con los presentes compuestos de macrolactina. Después de eliminar el medio se añadieron 100 µl de solución MTT (2 mg/me PBS) y a continuación la mezcla fue cultivada en un incubador a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 4 horas. Después de eliminar la solución MTT se añadieron 100 µl de DMSO y a continuación la mezcla fue cultivada con agitación durante 30 minutos en oscuridad. Después del cultivo, se determinó la cantidad de formazan libre a 540 nm utilizando un lector ELISA.

45 Como resultado, se confirmó que todas las MA, MMA y SMA tenían bajas citotoxicidades en comparación con la de la hidrocortisona (ver figura 11).

50 Aplicabilidad industrial

55 La presente invención da a conocer compuestos de macrolactina, MA, MMA y SMA, que son producidos a partir de la cepa Bacillus polyfermenticus KJS-2 (KCCM10769P). los compuestos de macrolactina suprimen directamente la formación y expresión de sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) que son proteínas relacionadas con la formación de mediadores inflamatorios e inhiben la formación de mediadores inflamatorios e

5 inhiben la formación de sus metabolitos NO y PGE2, de manera que pueden ser utilizadas para tratar y prevenir varias enfermedades (por ejemplo, enfermedades inflamatorias), provocadas por la excesiva producción de metabolitos. Además, los compuestos de macrolactina tienen bajas citotoxicidades en comparación con las de agentes antiinflamatorios convencionales. De acuerdo con ello, los presentes compuestos de macrolactina se espera que solucionen el problema de los efectos contrarios provocados por los agentes antiinflamatorios convencionales

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica, para su utilización en un procedimiento para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias, que comprende macrolactina A como ingrediente activo producida, a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P).
- 10 2. Composición farmacéutica, para su utilización en un procedimiento para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias, que comprenden 7-O-malonil macrolactina A como ingrediente activo, producida a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P).
- 15 3. Composición farmacéutica, para su utilización en un procedimiento para prevenir y tratar enfermedades inflamatorias, que comprenden 7-O-succinil macrolactina A como ingrediente activo, producida a partir de la cepa *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (KCCM10769P).
- 20 4. Composición, para su utilización en un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la actividad antiinflamatoria es debida a la inhibición de la formación de óxido nítrico, prostaglandina E2, factor alfa de necrosis tumoral, interleuquina-1 $\beta$ , interleuquina-6 y factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos que son mediadores inflamatorios.
5. Composición, para su utilización en un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la actividad antiinflamatoria es debida a la inhibición de la actividad de la sintetasa de óxido nítrico inducible y ciclooxigenasa-2.

FIG. 1

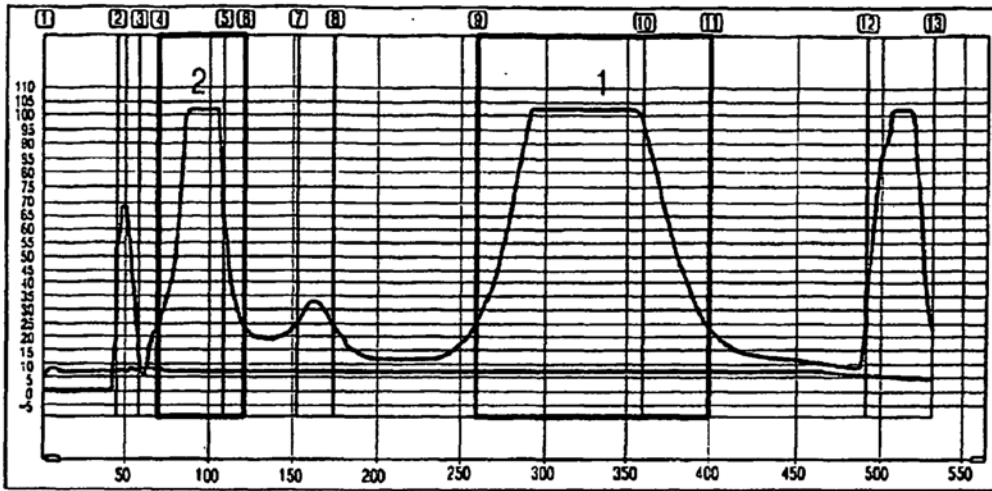


FIG. 2

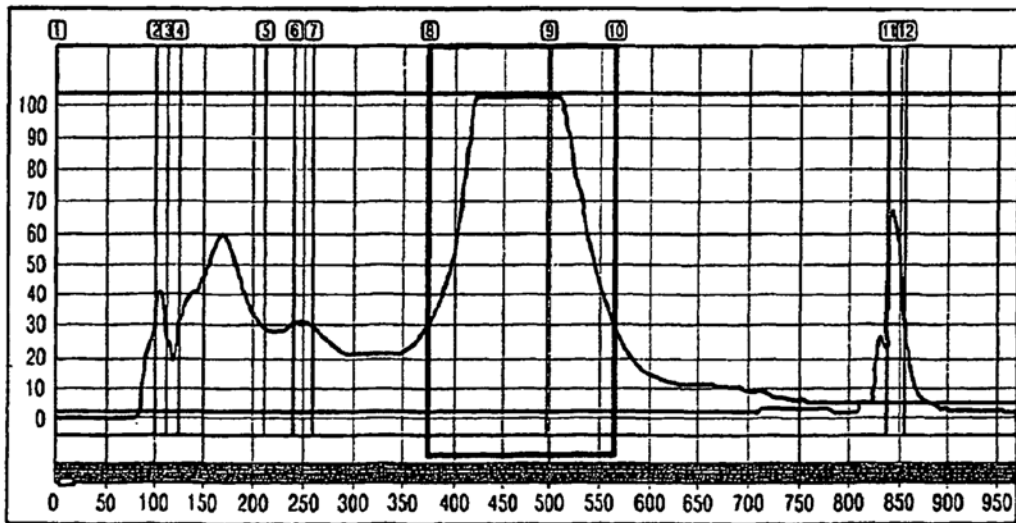




FIG. 3

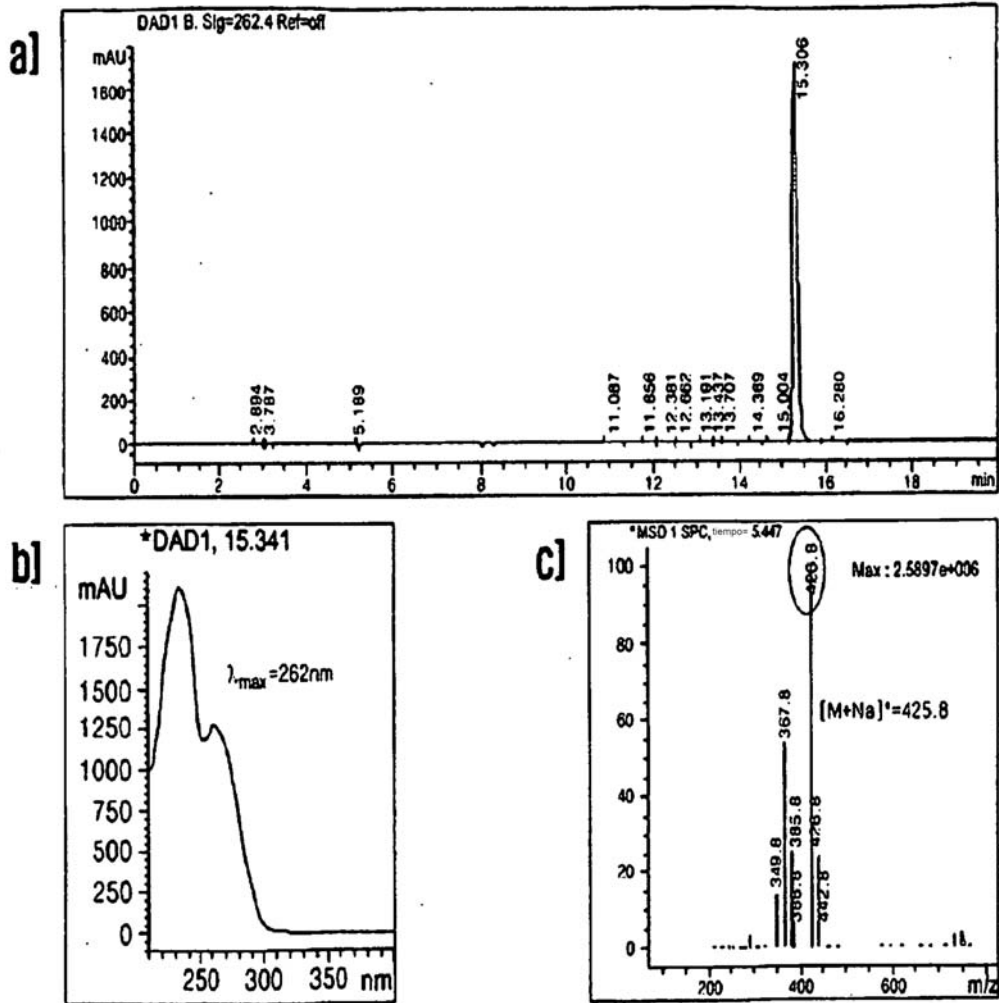




FIG 5

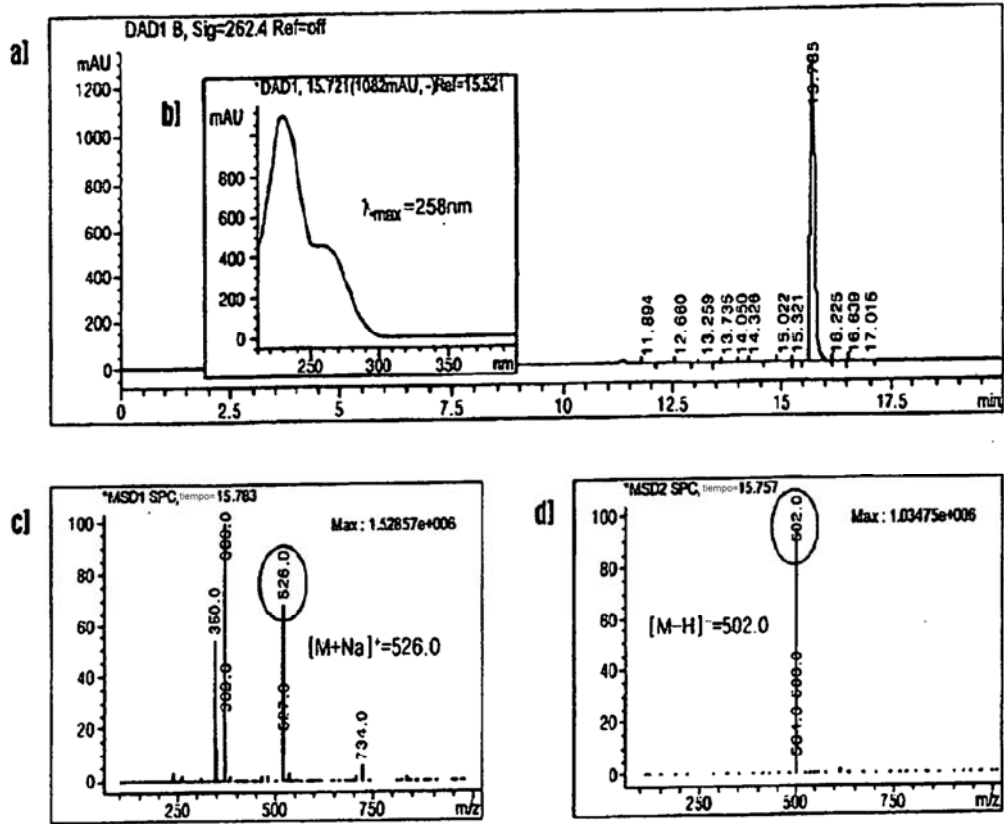


FIG 6

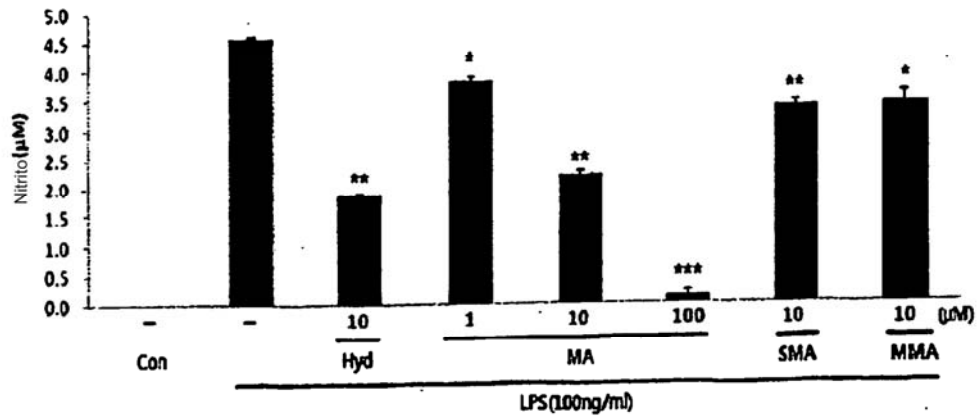


FIG. 7

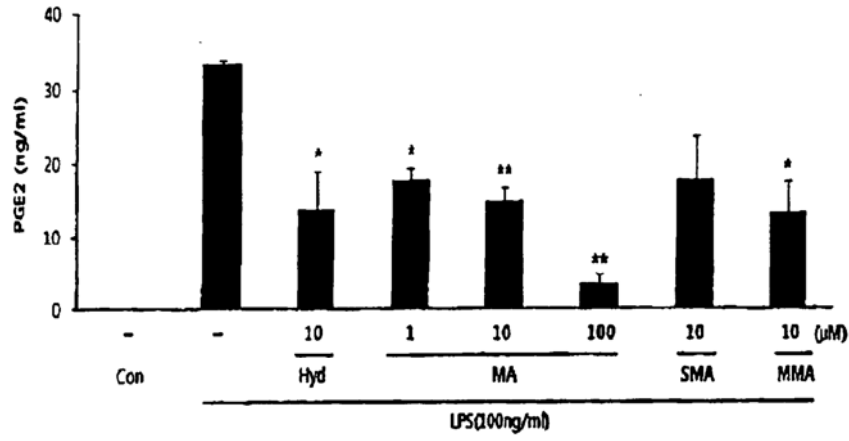


FIG. 8

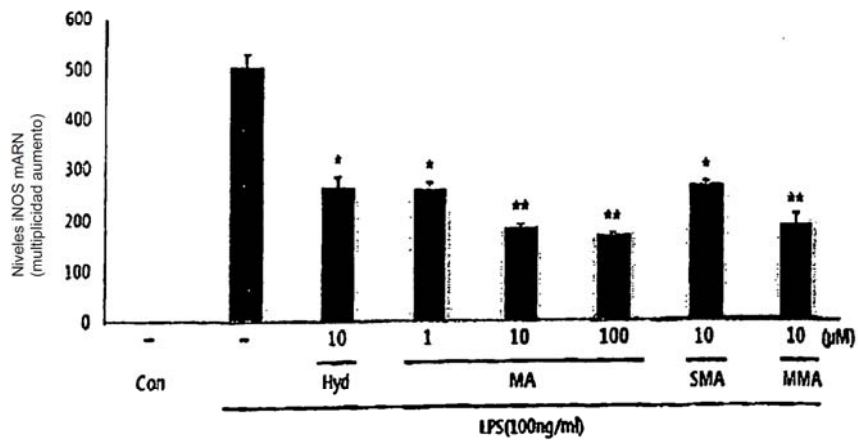


FIG 9

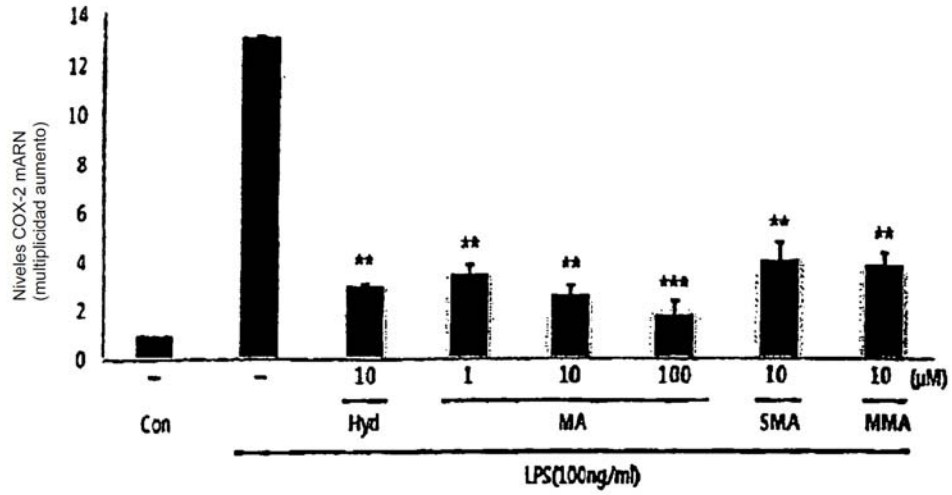


FIG 10

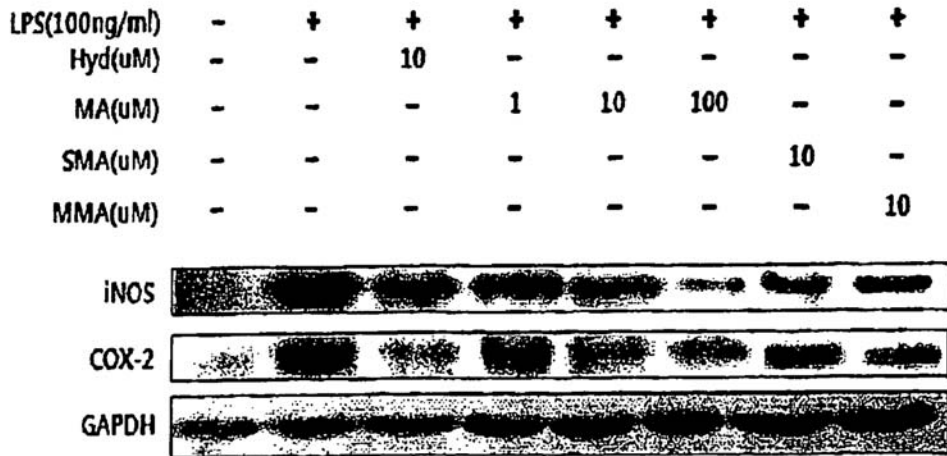


FIG 11

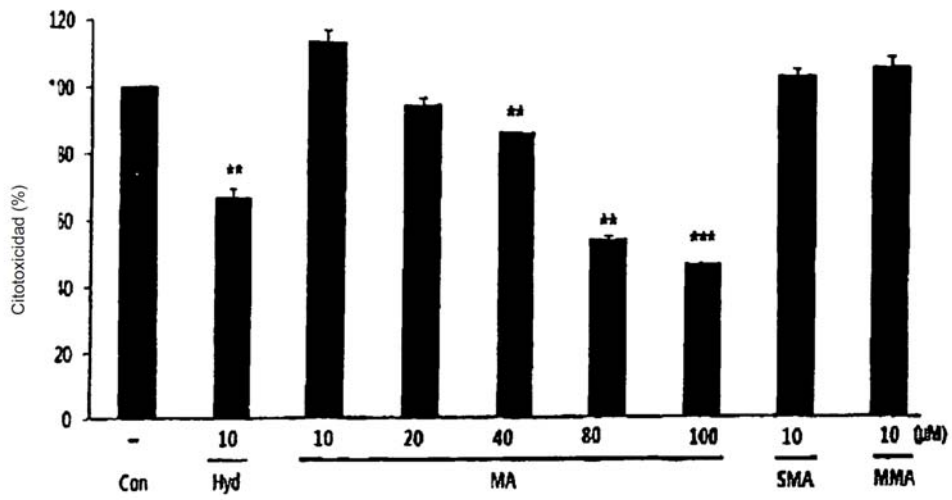


FIG 12

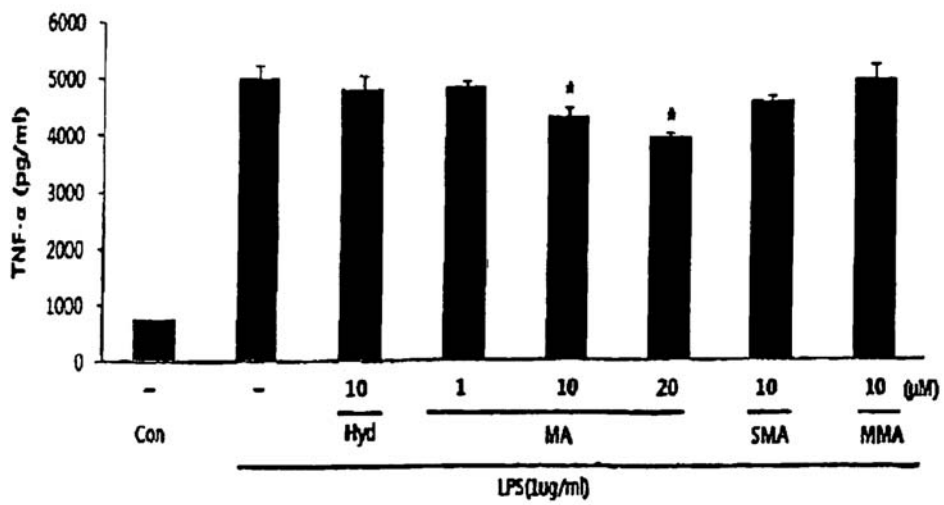


FIG 13

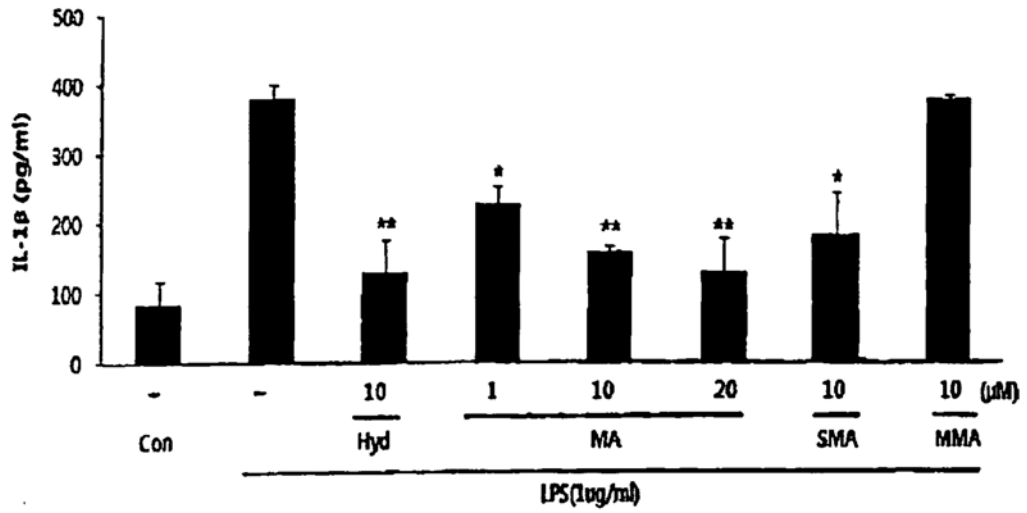


FIG 14

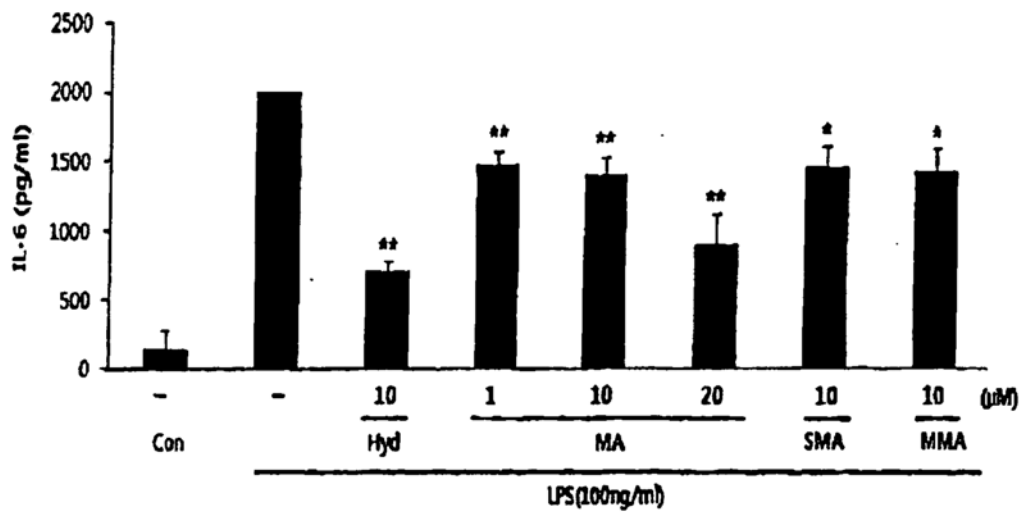


FIG 15

