

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 645**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/55** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08869561 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2227246**

54 Título: **Tratamiento de fibrosis y enfermedades hepáticas**

30 Prioridad:

**21.12.2007 EP 07450239**

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

**31.07.2014**

73 Titular/es:

**APEIRON BIOLOGICS AG (100.0%)  
CAMPUS-VIENNA-BIOCENTER 5  
1030 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**LOIBNER, HANS y  
SCHUSTER, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 481 645 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

Tratamiento de fibrosis y enfermedades hepáticas

La presente invención se refiere al campo del tratamiento de fibrosis y enfermedades hepáticas, particularmente enfermedades hepáticas inflamatorias.

5 Las fibrosis son afecciones que se caracterizan por la formación de tejido fibrótico o lesiones de tejido. A este respecto, se llega a una proliferación patológica de las células del tejido conectivo en tejido conectivo mismo o también en un órgano. A este respecto, se endurece el tejido del órgano afectado y se generan alteraciones cicatriciales que conducen en un estado avanzado a la limitación de la función del órgano respectivo.

10 Se entiende por fibrosis por tanto la proliferación excesiva de tejido conectivo en todos los órganos humanos, cuyo origen se encuentra en la sobreproducción de proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno. Los procesos de regulación molecular compleja que conducen a esta sobreproducción son conocidos solo en parte. Hasta hoy, han podido identificarse sin embargo numerosos desencadenantes como, por ejemplo, sustancias tóxicas, factores de crecimiento, fragmentos peptídicos de proteínas de matriz y hormonas, entre otros, que estimulan fibroblastos, como miofibroblastos y células estrelladas, como células diana de la formación elevada de proteínas de matriz.

15 El hígado es sumamente activo metabólicamente y un órgano de alta regeneración que, también ante grandes daños, es capaz de formar nuevas células hepáticas y regenerarse así. En las enfermedades hepáticas, se llega así, según la intensidad, a una alta remodelación de tejido, con lo que existe también un alto riesgo de formación de tejido fibrótico.

20 Huentelman *et al.* (Exp. Physiol. 90 (5) (2005): 783-790) se refiere al uso de un vector lentivírico que codifica ACE2 de ratón (lenti-mACE2), que se ha utilizado para la investigación de fibrosis cardíacas. El modelo de ensayo se basaba en ratas a las que se había administrado Ang II con la ayuda de bombas implantadas. Se ha mostrado que, mediante la administración de Ang II, se causa la fibrosis en el corazón así como se eleva la producción de colágeno. Ambos efectos se atenuaban por la transformación con el vector de ACE2.

25 Herath *et al.* (Journ. of Hepatology 47 (2007): 387-395) se refiere a un estudio de modelos de fibrosis hepática (ratas BDL) con una fibrosis inducida por intervención quirúrgica. Este documento no se refiere a ninguna terapia de esta fibrosis, particularmente a ninguna administración de ACE2, sino simplemente a la observación de los valores de ACE2 y angiotensina (1-7).

30 En Warner *et al.* (Clinical Science 113 (2007): 109-118) se resume la actividad de la angiotensina II, particularmente la actividad sobre la inflamación y el control de la curación de heridas. En heridas crónicas, se regula positivamente la ruta de ACE2 del SRA de forma natural, particularmente con el desarrollo de fibrosis hepática.

Díez-Freire *et al.* (Physiol. Gen. 27 (2006): 12-19) representa un trabajo previo a los resultados de Huentelman *et al.* Según Díez-Freire *et al.*, se usaba igualmente el vector de transfección de lentivirus de ACE2, sobre todo para investigar el efecto de la transferencia génica de ACE2 sobre la presión sanguínea.

35 Katovich *et al.* (Exp. Physiol. 90 (3) (2005): 299-305) describe el potencial de ACE2 como diana potencial para la terapia génica de trastornos hipertónicos.

40 Huentelman M. ("HIV-1 based viral vector development for gene transfer to the cardiovascular system" (2003) (defensa de tesis)) muestra sistemas vectoriales para transferencia génica a sistemas cardiovasculares. Las páginas 11 y 12 tratan allí brevemente de ACE2. Allí se ocupan de ratones con desactivación génica de ACE2 y comprueban que el sistema de ACE2 representa otro sistema para la regulación de la presión sanguínea que contrarresta al sistema de ACE. Se sugiere además en la página 71 utilizar el vector de lentivirus descrito por Huentelman *et al.* para la transfección de ACE2.

Kuba *et al.* (Curr. Opin. In Pharmac. 6 (2006): 271-276) describe la función protectora de ACE2 en modelos animales de SDRA e infecciones de SRAG por coronavirus, ya que ACE2 es un receptor de SRAG crítico.

45 Huentelman *et al.* (Regul. Peptides 122 (2004): 61-67) se refiere a la clonación de la forma hidrosoluble secretada de ACE2. La forma truncada de ACE2 se clonaba en un vector lentivírico para transfección ("Lenti-shACE2"). Como diana, se citan particularmente células cardíacas o células endoteliales de las arterias coronarias. En comparación con ACE2 unido a membrana, se comprobó una mayor secreción y por tanto una concentración más elevada de ACE2 en la circulación.

50 El documento WO 2004/000367 A1 describe la activación de ACE2 para el tratamiento de afecciones cardíacas, pulmonares y renales.

Es un objetivo de la presente invención prevenir desarrollos que conduzcan a fibrosis y enfermedades hepáticas, frenar su progresión y tratar fibrosis y enfermedades hepáticas.

La presente invención se refiere al uso de una proteína ACE2 hidrosoluble recombinante que contiene más de un 20 % en peso de azúcar (según el peso de ACE2 total) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de una fibrosis, y en el que la composición se administra por vía sistémica.

5 La presente invención y divulgación se refieren a una proteína o un ácido nucleico que codifica la proteína, en los que la proteína es ACE2, para el tratamiento terapéutico o la prevención de una enfermedad hepática o fibrosis. Se refieren igualmente la presente invención y la presente divulgación al uso de una proteína ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE2 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedad hepática o fibrosis.

10 Se ha mostrado por primera vez que el sistema de renina-angiotensina ejerce una influencia decisiva sobre el proceso patológico de diversas afecciones orgánicas y que una inactivación del mismo por toma terapéutica de ACE2 puede tanto amortiguar los síntomas agudos como curar los crónicos. Se destaca especialmente en este punto que, según la presente invención y la presente divulgación, en el caso de un modelo de fibrosis hepática especialmente agresiva, la activación de células estrelladas, que originalmente se consideran responsables del desarrollo de una disfunción orgánica causada por fibrosis del hígado, podría inhibirse completamente. Por tanto, 15 podría pararse el desarrollo patológico e incluso revertirse. Este conocimiento puede emplearse, debido a la similitud de los procesos patológicos, en una pluralidad de afecciones fibróticas.

20 La enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) es una enzima esencial del sistema de renina-angiotensina-aldosterona que se expresa como glicoproteína anclada a membrana en diversos órganos, como corazón, riñones, hígado y pulmones, pero también en vasos sanguíneos. ACE2 se descubrió en 1997 como enzima homóloga de ACE (acc. a Genbank: BAB40370, codificada por un ácido nucleico de secuencia según acc. a Genbank: AB046569). Al principio, se le asignó la misma actividad enzimática que ACE (documento US 6.989.363). Solo más tarde se descubrió que ACE2 presenta un modo de acción totalmente distinto, incluso antagonista, de ACE (documento WO 2004/000367). ACE2 es una carboxipeptidasa que escinde numerosos sustratos peptídicos con una selectividad y actividad altamente diferentes. ACE2 es también un copartícipe de unión celular de coronavirus de SRAG. La regulación negativa de ACE2 o la administración de ACE2 para bloquear los receptores de virus puede 25 reducir por tanto la susceptibilidad de células presentadoras de ACE2 (documento WO 2006/122819). Las funciones descritas de ACE2 son sobre todo la transformación de Ang II en Ang 1-7, presentando sustrato y producto de esta reacción propiedades antagonistas. Ang II actúa esencialmente como vasoconstrictor e hipertensor. Ang 1-7 actúa como vasodilatador y presenta en enfermedades renales, pulmonares y cardíacas un efecto protector (documento WO 2004/000367). El producto de ACE2 Ang 1-7 inhibe además ACE, la enzima que es responsable decisivo de la producción de Ang II. El sistema de renina-angiotensina desempeña un papel esencial en la patología de enfermedades hepáticas, en especial de fibrosis hepática. La presencia de Ang II es responsable del efecto profibrogénico en células estrelladas del hígado (HSC, hepatic stellate cells). Ha podido mostrarse que la expresión y actividad de ACE2 aumentan en pacientes afectados por infección crónica por HCV. En este sentido, se trata aparentemente de un mecanismo protector que sin embargo no basta para iniciar la regeneración del órgano. Es por 30 tanto productivo un aumento de la actividad de ACE2.

35 Al inhibir la formación de fibrosis puede prevenirse una fibrosis, o al impedir el empeoramiento de la fibrosis acelerar el proceso de curación. Es por tanto posible una terapia profiláctica con ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE. Dicha terapia profiláctica no debe sin embargo entenderse en un sentido absoluto, sino únicamente que disminuye el riesgo de aparición de una fibrosis o se mitigan los síntomas de fibrosis o la intensidad de una fibrosis en desarrollo. Particularmente, la presente invención y la presente divulgación se refieren al tratamiento o la prevención de la progresión de una fibrosis o enfermedad hepática. Es particularmente razonable una aplicación profiláctica en pacientes de riesgo con una probabilidad elevada de desarrollar una fibrosis o enfermedad hepática (en comparación con individuos sanos) como, por ejemplo, alcohólicos o pacientes con una infección por hepatitis C. 40

45 En una forma de realización preferida, la fibrosis es una fibrosis local de un tejido u órgano. Dichas fibrosis específicas de órgano son fibrosis hepáticas, fibrosis pulmonares, fibrosis de tejido conectivo, particularmente fibrosis de los septos musculares, fibrosis renal y fibrosis cutánea, por ejemplo en combinación con una inflamación-esclerodermia. Preferiblemente, la fibrosis es una fibrosis de un órgano interno, por ejemplo de hígado, riñones, pulmones, corazón, estómago, intestino, páncreas, una glándula, un músculo, un cartílago de tendones y ligamentos o una articulación. Es una forma especial de fibrosis la fibrosis quística o fibrosis reumática. 50

55 Se prefiere la fibrosis atribuida a una deposición excesiva de los componentes de la matriz extracelular, particularmente proteínas como colágeno. El colágeno es una proteína estructural del tejido conectivo, particularmente de la matriz extracelular. La formación de colágeno, particularmente en relación con el marcador SMA (actina de músculo liso en inglés), se correlaciona directamente con la progresión de la fibrosis. Según la invención, ha podido observarse una inhibición especialmente eficaz de la deposición de colágeno por ACE2.

60 Además, es también posible el tratamiento de fibrosis crónicas basándose en el mecanismo general. Particularmente, la fibrosis puede estar causada por daños mecánicos o químicos de células o tejidos o heridas, cáncer o tumores, infecciones, particularmente de patógenos como virus, bacterias u hongos, por implantes, incluyendo implantes de órganos, así como medicamentos. Las infecciones pueden ser específicas de órgano, por ejemplo, como por ejemplo infección por virus de la hepatitis, particularmente por HCV. Son otras afecciones

fibróticas que pueden tratarse preferiblemente según la presente invención y según la presente divulgación con ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE2, por ejemplo, fibrosis primarias o secundarias, particularmente fibrosis causadas por una reacción autoinmunitaria, enfermedad de Ormond o fibrosis retroperitoneal.

5 El hígado es un órgano de metabolismo sumamente activo y altamente regenerativo que, también en daños elevados, es capaz de formar nuevas células hepáticas y regenerarse así. En las enfermedades hepáticas, se llega así, según la intensidad, a una alta remodelación de tejido, existiendo también un alto riesgo de formación de tejido fibrótico. Por tanto, la aplicación presente de ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE2 es adecuada para el tratamiento de enfermedades hepáticas, particularmente para prevenir o tratar síntomas fibróticos como efecto secundario o indicación principal. Además, ha podido mostrarse que la ALT (alanina aminotransaminasa), un  
10 indicador de la función hepática, podía elevarse significativamente por el tratamiento con ACE2. Por tanto, la presente divulgación es particularmente adecuada para el establecimiento o mantenimiento de la función hepática en una enfermedad hepática. En formas de realización especiales, la enfermedad hepática está relacionada con daños hepáticos o daños de células hepáticas.

15 En formas de realización especiales, la fibrosis o enfermedad hepática aparece junto con una inflamación, por ejemplo en una hepatitis (enfermedad hepática inflamatoria). Las inflamaciones de diversos órganos o tejidos se curan a menudo mal al menos parcialmente y pueden conducir también a la formación de tejido fibrótico. Una reacción inflamatoria es un proceso en el que las células de defensa se encaminan hacia una fuente de infección y aseguran allí la eliminación del origen. Esta inflamación puede estar causada, a saber por ejemplo, por una infección. Se liberan en este sentido distintos mediadores que contribuyen a la eliminación, pero que producen  
20 también síntomas de inflamación. Por falta de regulación de la reacción, estos síntomas pueden causar los daños principales o ser generalmente la fuente de la afección. Las inflamaciones pueden estar causadas también artificialmente, por ejemplo, por trasplantes de órganos, que dado el caso pueden conducir al rechazo del órgano extraño. Pueden causarse igualmente inflamaciones como efecto secundario por determinados medicamentos.

25 La expresión de ACE2 se controla por diversos estímulos. Se ha encontrado ahora también que ACE2 se regula negativamente por la aparición de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-4, lo que conduce como consecuencia a diversas enfermedades y a una acumulación de Ang II en los compartimentos afectados y a una potenciación de la respuesta inmunitaria inducida. Las citocinas sirven esencialmente para la comunicación de diversos tipos de células del sistema inmunitario. Habitualmente, una de las primeras etapas consiste en una inflamación naciente que capta sustancias antigénicas por células presentadoras de antígeno (APC) y las clasifica  
30 como extrañas. Como consecuencia, se llega a un primer rechazo de las citocinas inflamatorias por las APC afectadas, que alerta así a otras células del sistema inmunitario. Este mecanismo está altamente regulado y controlado para inducir una respuesta inmunitaria solo cuando sea realmente justificable y esta se desactiva cuando se ha neutralizado la sustancia antigénica. No obstante, puede suceder que esta respuesta inmunitaria inducida se des controle y se vuelva contra el propio organismo. La acumulación de Ang II, por ejemplo en diversas  
35 enfermedades renales, cardíacas y pulmonares, causa una inflamación progresiva y también una infiltración aumentada del tejido afectado por células del sistema inmunitario, y como consecuencia un exceso de respuesta inmunitaria. Es siempre una etapa clave en este sentido sin embargo la respuesta inmunitaria celular como reacción ante un estímulo que supera con creces con una cascada de amplificación autopotenciada el fin primario, neutralizar una sustancia extraña, y como consecuencia daña el organismo.

40 La primera etapa de la respuesta inmunitaria naciente es la emisión de señales inflamatorias en forma de citocinas. Son representantes importantes de las mismas, por ejemplo, IL-4, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ . Son productos terapéuticos empleables sustancias que tienen la propiedad de suprimir o debilitar esta expresión de citocina después de la estimulación de las células inmunitarias para atenuar una respuesta inmunitaria excesiva. La expresión de ACE2 se reduce fuertemente en presencia de citocinas inflamatorias a niveles celulares que conducen a una potenciación de  
45 la inflamación sobre todo por acumulación de Ang II, por la disminución de Ang 1-7 y por la falta de reducción de la replicación de Ang II así causada. Las concentraciones de Ang II por lo tanto fuertemente crecientes fomentan, a causa de las propiedades fuertemente inflamatorias de Ang II, la potenciación adicional de la inflamación, que conduce como consecuencia a una atenuación aún más clara de la expresión de ACE2. Para escapar de este círculo vicioso, se administra terapéuticamente ACE2 según la invención y por tanto se previene una acumulación de  
50 Ang II y se amortigua así la inflamación: ACE2 reduce inmediatamente el alto título de Ang II, lo que debilita la inflamación creciente continua por Ang II. Se replica Ang 1-7 y debilita igualmente la inflamación mediante su actividad antiinflamatoria. Además, Ang 1-7 limita la producción posterior de Ang II por su propiedad de inhibir ACE. La terminación de la inflamación causa que las citocinas segregadas regresen a una medida estándar y que se llegue de nuevo a una expresión de ACE2 endógeno que proporcione sosteniblemente la degradación de Ang II y la  
55 generación de Ang 1-7 y conduzca de nuevo a un SRA funcional estable. Como consecuencia, se ajusta de nuevo un equilibrio autorregulador permanente de los componentes operativos del SRA. Por tanto, puede suprimirse completamente una nueva toma de ACE2 cuando el estímulo original del sistema inmunitario se ha neutralizado. Se reproduce una representación esquemática de los mecanismos mencionados en la Fig. 5. Mediante la toma de ACE2, se crea una salida a la inflamación autopotenciada.

60 Los datos indicados en los ejemplos permiten las siguientes conclusiones sobre la actividad de ACE2 como inmunorregulador. Debido a un estímulo antigénico, se llega a una segregación de citocinas inflamatorias. En presencia de citocinas inflamatorias, se llega a una pérdida de la expresión de ACE2. En ausencia de ACE2, se

acumula el péptido proinflamatorio Ang II, ya que no puede degradarse por ACE2. En ausencia de ACE2, se acumula igualmente la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ . ACE2 posee propiedades antiinflamatorias y reduce la expresión de citocinas inflamatorias en linfocitos. Una toma terapéutica de ACE2 compensa por tanto la expresión de ACE2 endógeno perdida y puede detener una inflamación naciente mediante la reducción de los títulos de Ang II, mediante la formación de Ang 1-7 y mediante otros efectos. Una toma terapéutica de ACE2 posibilita, incluso en el caso de una sepsis grave por infusión continua de LPS, reducir de nuevo el título de Ang II al nivel de un sujeto sano y reestablecer la regulación del SRA por consiguiente. Una toma terapéutica de ACE2 posibilita además, incluso en el caso de una sepsis grave por infusión continua de LPS, reducir de nuevo el título de TNF- $\alpha$  al nivel de un sujeto sano. Ha podido observarse el mismo efecto igualmente en el caso de daños pulmonares mecánicos masivos por aspiración de meconio.

Preferiblemente, la proteína es ACE2 recombinante. Las secuencias de ACE2 son suficientemente conocidas y puede producirse sin problemas mediante la inserción de vectores adecuados, que codifican ACE2, en sistemas de expresión, particularmente eucarióticos. Dichos sistemas son, por ejemplo, estirpes celulares de mamíferos como células de CHO (ovario de hámster chino) y células de ratón NS0 o células de insectos, por ejemplo, Sf9. Para la expresión, uno de dichos vectores puede presentar determinados promotores específicos de célula o generales.

Preferiblemente, la proteína (que codifica también el ácido nucleico de ACE2) es ACE2 hidrosoluble, particularmente sin dominio de membrana. La secuencia de ACE2 humana se indica por la SEQ ID NO: 1:

MSSSSWLLLSLVAVTAAQSTIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNYNTNITEENVQNM-  
 NNAGDKWSAFLKEQSTLAQMYPLQEIQNLTVKLQLQALQONGSSVLSSEDKSKRLNTILNTMS-  
 TIYSTGKVCNPDNPQECLLLEPGLNEIMANSLDYNERLWAWESWRSEVKGQLRPLYEEYVVLKN  
 EMARANHYEDYGDYWRGDYEVNGVDGYDYSRGLIEDVEHTFEEIKPLYEHLHAYVRAKLM-  
 NAYPSYISPIGCLPAHLLGDMWGRFWTNLYSLTVPFQKPNIDVTDAMVDQAWDAQRIF-  
 KEAEKFFVSVGLPNMTQGFWENSMLTDPGNVQKAVCHPTAWDLGKGFRIILMCTKVTMDDFLTA  
 HHEMGHIQYDMA YAAQPFLLRNGANEGFHEAVGEIMSLSAATPKHLKSIGLLSPDFQEDNE-  
 TEINFLKQALTI VGTLPFTYMLEKWRWVFKGEIPKDQWMKKWEMKREIVGVVEPVPHDE-  
 TYCDPASLFHVSNDYSFIRYYTRTLYQFQFQEQEALCQAAKHEGPLHKCDISNSTEAGQKLFNMLR  
 LGKSEPWTALENVVGAKNMNVRPLLNYFEPLFTWLKDQNKNSFVGWSTDWSPYADQSIK-  
 VRISLKSALGDKAYEWNENEMYLFRSSVAYAMROYFLKVKNQMILFGCEEDVRVANLK-  
 PRISFNFFVTAPKNVSDIIPRTEVEKAIRMSRSRINDAFRLNDNSLEFLGIQPTLGGPPNQPPVS

A este respecto, se escinde la secuencia señal autóloga (subrayada) por las células hospedadoras para la segregación. Preferiblemente, la proteína ACE2 comprende por tanto una secuencia de ACE2 correspondiente a la SEQ ID NO: 1 desde la posición 18. En otra forma de realización, el polipéptido de ACE2 no presenta dominio transmembrana. Este dominio transmembrana se encuentra en el extremo C de la SEQ ID NO:1. Se trata por tanto entonces de una ACE2 soluble. Las formas de realización especialmente preferidas comprenden a este respecto polipéptido de ACE2 soluble cuya cadena polipeptídica comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO:1 hasta la posición aminoacídica 740, o fragmentos enzimáticamente activos de la misma. Otra proteína ACE2 soluble está compuesta por los aminoácidos 18-615 de la SEQ ID NO: 1.

La solubilidad de una proteína se determina no solo por su secuencia aminoacídica, sino también por su plegamiento así como por modificaciones postraduccionales. Son sobre todo las estructuras de azúcar cargadas las que elevan significativamente la solubilidad de una proteína e influyen en su perfil farmacológico. La sección soluble de ACE2 contiene 7 sitios de N-glucosilación. Preferiblemente, al menos un 80 % de las posiciones de N-glucosilación posibles están glucosiladas y/o la proteína ACE2 presenta una proporción de azúcar de más de 10 % (% en masa del ACE2 total) u 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, preferiblemente más de 15 % o 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, particularmente más de 20 % o 21 %, 22 %, 23 %, 24 % o 25 %.

Aunque se prefiere ACE2 humana para la mayoría de formas de realización, es posible también ACE2 de ratón, rata, hámster, cerdo, primates o bovinos. ACE2 es una enzima universal en todos los mamíferos con el sustrato Ang II idéntico. Por tanto, es utilizable también en organismos extraños. Por ello, pueden tratarse con la proteína (o su ácido nucleico), independientemente del origen de la ACE2, por ejemplo personas, ratones, ratas, hámsteres, cerdos, primates o bovinos.

Según la presente invención y la presente divulgación, puede ponerse a disposición una composición farmacéutica que comprende la proteína ACE2 o un ácido nucleico que codifica ACE2. Dichas composiciones pueden comprender sales farmacéuticamente adecuadas de las mismas, adicionalmente tampones, componentes de tonicidad o portadores farmacéuticos adecuados. Particularmente, los ácidos nucleicos de ACE2 pueden proporcionarse a

5 sistemas vectoriales terapéuticos adecuados. Las sustancias portadoras farmacéuticas sirven para una mejor compatibilidad de la composición y posibilitan una mejor solubilidad, así como una mejor biodisponibilidad de las sustancias activas. Son ejemplos de ellos emulsionantes, espesantes, componentes rédox, almidones, disoluciones alcohólicas, polietilenglicol o lípidos. La selección de un portador farmacéutico adecuado depende en gran medida del tipo de administración. Para administraciones orales, pueden usarse portadores líquidos o sólidos, para inyecciones son necesarias composiciones finales líquidas.

10 Preferiblemente, el medicamento para usar comprende sustancias tamponadoras o sustancias tónicas. Mediante el tampón, puede ajustarse el valor de pH del medicamento a condiciones fisiológicas y además pueden debilitarse o amortiguarse las oscilaciones de pH. Es un ejemplo de ello un tampón fosfato. Las sustancias tónicas sirven para ajustar la osmolaridad y pueden comprender sustancias iónicas como, por ejemplo, sales inorgánicas como NaCl, o también sustancias no iónicas como, por ejemplo, glicerina o hidratos de carbono.

La composición se acondiciona adecuadamente para administración sistémica, tópica, oral o intranasal. Estas formas de administración del medicamento posibilitan una absorción rápida y sencilla. Para administración oral, pueden tomarse por ejemplo medicamentos sólidos o líquidos directamente o disueltos o diluidos.

15 El medicamento para usar se acondiciona adecuadamente preferiblemente para administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o subcutánea. Para ello, son adecuadas por ejemplo inyecciones o transfusiones. Las administraciones directamente a la corriente sanguínea tienen la ventaja de que el principio activo del medicamento se distribuye por todo el cuerpo y se alcanzan rápidamente los tejidos diana.

Figuras:

20 Fig. 1: Formación de colágeno en el hígado de ratones de tipo silvestre y con desactivación génica de ACE2 después de BDL de 21 días medida mediante tinción con rojo Sirio (izquierda) y determinación de ARNm (derecha) en comparación con un grupo de control.

Fig. 2: Medida del contenido de SMA en tejido hepático (A) y su ARNm (b) en el hígado de ratones de tipo silvestre y ratones con desactivación génica de ACE2 después de BDL de 21 días en comparación con un grupo de control.

25 Fig. 3: Medida del contenido de SMA en tejido hepático (A) y su ARNm (B) en el hígado de ratones de tipo silvestre y ratones con desactivación génica de ACE2 después de BDL de 21 días en comparación con un grupo de control.

Fig. 4: Modelo de BDL en ratones de tipo silvestre: medida del contenido de ALT en muestras de suero de ratones de tipo silvestre no tratados y aquellos que han recibido una terapia de ACE2.

30 Fig. 5: Representación esquemática de la regeneración de un SRA funcional mediante terapia de ACE2. Las flechas rojas (+) representan efectos de la inmunorreactividad excesiva, mientras que las flechas azules (-) designan alteraciones causadas por la terapia de ACE2.

Fig. 6: Análisis de FACS específico de ACE2 de preparaciones de células Vero A6 después de 48 horas de incubación con IL-4, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  10 ng/ml (curvas con pico en medio) en comparación con un grupo de control no estimulado (curvas rojas con pico a la derecha) y una serie de control (curvas negras con pico a la izquierda).

35 Fig. 7: Medida de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo de PBMC 16 horas después de estimulación con LPS, PHA y LPS + PHA, sin (barras negras, izquierda) o en presencia de ACE2 (barras grises, en medio) o ACE2 y Ang II (barras azules, derecha).

40 Fig. 8: Concentración de Ang II medida en un modelo de sepsis inducido por LPS en cerdos: curvas azules: animales tratados con APN 01 (rACE2), curvas grises: animales tratados con placebo, curvas grises (puntos negros): animales sanos después de la administración de APN 01.

Fig. 9: Actividad de ACE2 medida en ratones, cerdos y monos *Rhesus*.

Fig. 10: Concentración sérica de TNF- $\alpha$  en un modelo de sepsis inducida por LPS en cerdos. Se representaron los animales tratados con ACE2 en azul y los animales tratados con placebo en gris. Se normalizaron las concentraciones de TNF- $\alpha$  a los valores de partida respectivos al inicio de la terapia (100 %).

45 Fig. 11: Concentración sérica de TNF- $\alpha$  en un modelo de SDRA inducido por aspiración de meconio en cerdos. Se representaron los animales tratados con ACE2 en azul y los animales tratados con placebo en gris.

### Ejemplos:

#### Ejemplo 1: Modelo de fibrosis hepática, importancia de ACE2 en la fibrosis hepática

50 Se evaluaron ratones con desactivación génica de ACE2 y de tipo silvestre de ACE2 después de ligamiento del conducto biliar (bile duct ligation, BDL) después de 21 [?] y se compararon con grupos de control de tratamiento ficticio. La investigación patológica del hígado mostró deposiciones de colágeno claramente elevadas en los

animales que habían experimentado BDL (Fig. 1). Se investigó el almacenamiento de colágeno en tejido hepático mediante coloración específica con rojo Sirio y era sorprendentemente 2,5 veces mayor en ratones con desactivación génica de ACE2 que en los del grupo de tipo silvestre (Fig. 1). El número de células productoras de colágeno del hígado se determinó mediante medida de SMA, un marcador de células estrelladas activadas, mediante transferencia Western y medida de ARNm. La Fig. 2 representa la relación entre la falta de actividad de ACE2 y el daño hepático y muestra claramente que el número de células productoras de colágeno está claramente elevado.

Este enfoque muestra que hay una correlación entre la ausencia de ACE2 y la deposición de colágeno en el hígado dañado. La deposición de colágeno es un síntoma patológico esencial del daño hepático progresivo.

#### 10 **Ejemplo 2: Modelo terapéutico**

En un segundo enfoque, se administró a ratones de tipo silvestre después de realizada la BDL durante 14 días ACE2 recombinante intravenoso como inyección embolada diaria de 2 mg/kg. Estos animales se compararon de nuevo con un grupo de control que recibía solo la administración de una disolución salina, después del final de la terapia. La Fig. 3 muestra muy claramente que la concentración de SMA en tejido, y por tanto el número de células productoras de colágeno en tejido hepático dañado de animales de tipo silvestre, aumenta muy claramente, mientras que la SMA en el hígado de ratones tratados con ACE2 no era detectable mediante transferencia Western. El análisis del ARNm de SMA confirma este resultado. En la Fig. 4, se representa la concentración sérica de ALT de los grupos investigados al final del experimento. Ha podido mostrarse igualmente aquí que ALT en el grupo tratado con ACE2 alcanzaba concentraciones menores.

20 Ambos estudios muestran muy claramente que una actividad reducida de AE2 conduce a un empeoramiento de los síntomas hepáticos. Una actividad de ACE2 elevada reduce el número de células productoras de colágeno, así como el enriquecimiento en colágeno en tejido. Ha podido confirmarse además un efecto terapéutico mediante la toma sistémica de ACE2 soluble recombinante.

#### **Ejemplo 3: Pérdida de la expresión de ACE2 en presencia de citocinas inflamatorias**

25 La estirpe celular renal Vero E6 (*Ceropithecus aethiops*) expresa en condiciones de cultivo habituales ACE2 como glucoproteína anclada a membrana. Se incubaron Vero E6 durante 48 horas con IL-4, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  10 ng/ml y se analizaron las alteraciones respecto a la expresión de superficie de ACE2 mediante análisis de FACS con el uso de un anticuerpo policlonal de cabra específico de ACE2 y un anticuerpo marcado con FITC específico de cabra. En la Fig. 6, se representan los histogramas respectivos. La valoración correspondiente se resume en la Tabla 1. Mediante incubación con IL-4, IFN- $\gamma$  o TNF $\alpha$ , se redujo claramente la expresión de ACE2. Mientras que se midió una positividad de ACE2 de 51 $\pm$ 3 % en células no estimuladas, esta se reducía a 28 $\pm$ 2, 22 $\pm$ 1 y 39 $\pm$ 2 % respectivamente después de estimulación con IL-4, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Fig. 6).

Tabla 1: Análisis FACS específico de ACE2 medido después de incubación de Vero E6 después de 48 horas de incubación con IL-4, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  10 ng/ml en comparación con un grupo de control no estimulado.

| Estimulación     | IL-4       | IFN- $\gamma$ | TNF- $\alpha$ | Ø          |
|------------------|------------|---------------|---------------|------------|
| Positividad      | 28 $\pm$ 3 | 22 $\pm$ 1    | 39 $\pm$ 2    | 51 $\pm$ 3 |
| Control negativo | 5          | 2             | 4             | 6          |

35

#### **Ejemplo 4: Atenuación de la inmunoreactividad de PBMC**

En este ejemplo, se expone el efecto de ACE2 sobre la expresión de citocinas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) estimulados. Se usó en el enfoque una preparación de PBMC, y por tanto el espectro de linfocitos totales del donante, para posibilitar la interacción de distintos linfocitos. Se extrajo sangre completa de un donante sano y se separaron los PBMC allí contenidos mediante centrifugación. Se incubaron estas células a continuación con sustancias fuertemente inmunogénicas, como lipopolisacárido (LPS, 100 ng/ml) y fitohemaglutinina (PHA, 20  $\mu$ g/ml), y se estimuló una combinación de ambas sustancias en presencia de Ang II, ACE2 y ACE2 con Ang II, y se incubó a 37 °C durante 16 h. Se investigó en los sobrenadantes el TNF- $\alpha$  y se comparó con una preparación de control que se llevó a cabo en ausencia de ACE2 y péptidos del SRA. Se representan gráficamente en la Fig. 7 los resultados de este ensayo: la incubación con LPS y PHA inducía en todos los casos la secreción de TNF- $\alpha$ . Las preparaciones de control respectivas, que se coincubaron sin ACE2, mostraban las mayores concentraciones de TNF- $\alpha$  (203, 352 y 278 mOD) respectivamente después de estimulación con LPS, PHA y combinación. En presencia de ACE2, la señal medida en todos los grupos era claramente menor y alcanzaba solo después de mOD valores de 181, 266 y 223 en los grupos respectivos. En ausencia de ACE2 y Ang II, sin embargo, las concentraciones de TNF- $\alpha$  medidas eran las menores y alcanzaban solo después de mOD 144, 247 y 183. Estos resultados muestran que la ausencia de ACE2 conduce a una producción claramente debilitada de citocinas inflamatorias, incluso cuando se usan para estimulación sustancias especialmente inmunogénicas como LPS o PHA. Esto confirma el efecto

50

antiinflamatorio de ACE2. Sorprendentemente, el mecanismo funciona ya en ausencia de Ang II y se refuerza en su presencia, lo que señala un principio dual. Una parte del efecto está causada por Ang II y su producto de degradación Ang 1-7, funcionando la otra parte aparentemente por la degradación de uno de los otros sustratos de ACE2 y no estando ligada al Ang II presente (Fig. 7).

#### 5 **Ejemplo 5:** Restablecimiento del título de Ang II del organismo sano

En este ejemplo, se ha mostrado cómo la toma de ACE2 exógeno retoma bajo control un SRA desregulado. Se administró para ello APN 01 (ACE2 humano soluble recombinante) en un modelo de sepsis inducida por la toma de LPS. Se infundió continuamente LPS a los animales desde el punto temporal -120 minutos, lo que condujo a una inflamación masiva y como consecuencia a una sepsis. Se llegó, a causa de la segregación masiva de citocinas inflamatorias, a la inactivación de la expresión de ACE2, lo que como consecuencia condujo a una acumulación del péptido inflamatorio Ang II (véase la Fig. 8).

A partir del punto temporal 0 minutos, se administró APN 01 a una dosificación de 400 µg/kg como bolo intravenoso. Se llegó enseguida a una disminución de Ang II en el grupo tratado, y el título de Ang II osciló durante las siguientes horas al mismo nivel que se había medido también en animales sanos. Además, la toma de APN 01 a la misma dosis en animales sanos produjo igualmente una pequeña caída del título de Ang II, que se volvía a aproximar igualmente después de varias horas a los valores de los animales sanos. Los animales tratados con placebo mostraban en cambio un valor de Ang II de nuevo creciente hasta el final del experimento. Este sorprendente fenómeno puede explicarse solo por un restablecimiento del SRA altamente regulado, ya que hasta el final del experimento se ponía a disposición de los animales enzima activa igual que antes (véase la Fig. 9). Se midió un tiempo de vida medio de aprox. 8 horas.

#### **Ejemplo 6:** Atenuación de la expresión de citocinas inflamatorias en la sepsis

En el siguiente ejemplo se muestra cómo la concentración de citocina inflamatoria crece rápidamente en un modelo de sepsis en cerdos y, después de la toma de ACE2, recae al nivel del animal sano. Se infundió a los animales desde el punto temporal de -120 minutos continuamente LPS a alta dosificación, lo que condujo a una inflamación masiva y como consecuencia a una sepsis. Se llegó, a causa de la segregación masiva de citocinas inflamatorias, a la inactivación de la expresión de ACE2, lo que como consecuencia condujo no solo a una acumulación del péptido inflamatorio Ang II, sino igualmente de la citocina inflamatoria TNF-α (Fig. 10). A partir del punto temporal de 0 minutos, se administró por embolada intravenosa a los animales (6 animales en el grupo tratado, 5 animales en el grupo de control) ACE2 a una dosificación de 0,4 mg/kg o disolución de tampón. Mientras se seguía administrando continuamente LPS a la misma alta concentración, se observaron los animales durante 3 horas más, se obtuvieron muestras de suero y se analizó el TNF-α. Pudo mostrarse que la concentración de TNF-α en el grupo de control permanecía elevada hasta el final del experimento, mientras que en el grupo tratado con ACE2 se llegaba tras una sola administración de ACE2 y con toma constante de LPS a una reducción clara ( $p < 0,001$ ) de la concentración de TNF-α. Se volvieron a alcanzar, a pesar de la sepsis masiva, valores aproximadamente iguales a los medidos también en animales sanos. Mediante la toma de ACE2, pudo reducirse por tanto, incluso en un modelo de sepsis muy agresiva, la expresión de TNF-α rápidamente al nivel sano, y detener además una inflamación autopotenciada (Fig. 10).

#### **Ejemplo 7:** Atenuación de la expresión de todas las citocinas inflamatorias después de daño pulmonar mecánico local

En este ejemplo, se mostró la influencia de ACE2 administrada sistémicamente sobre la expresión de citocinas inflamatorias en un modelo de daño pulmonar en cerdos. Se consideraron 14 animales en este estudio con anonimato controlado por placebo. Todos experimentaron en la primera fase del experimento una aspiración triple de una disolución de meconio al 20 %, induciéndose un daño comparable en todos los animales por los parámetros hemodinámicos elevados. En la segunda fase del experimento, la terapéutica, se administró a la mitad de los animales ACE2 humana soluble recombinante por embolada intravenosa a una dosificación de 0,4 mg/kg. Los demás recibieron una disolución fisiológica de sal común. Se extrajeron muestras de suero en los puntos temporales de -30, 0, 30, 60, 90 y 150 minutos, en los que se midieron las concentraciones de las citocinas inflamatorias más importantes. El punto temporal 0 era en este sentido el punto de partida de la terapia, en el que todos los animales mostraban ya síntomas de SRDA. Como se ilustra en la Fig. 11, hay una influencia muy clara de la administración de ACE2 sobre la concentración sérica de TNF-α. Aunque la del grupo de placebo aumentaba fuertemente a más de 230 ng/ml, en el grupo tratado caía al cabo de 30 minutos después de la administración a menos de 40 ng/ml y se aproximaba a los 90 minutos después de la toma a 25 ng/ml.



**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Apeiron Biologics Forschungs- und Entwicklungsgesellschaft M.B.H.
- <120> Tratamiento de fibrosis y enfermedades hepáticas
- 5 <130> r53547
- <150> EP07450239.4
- <151> 21-12-2007
- 10 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
- <211> 740
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1

Met Ser Ser Ser Ser Trp Leu Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Thr Ala  
 1 5 10 15

Ala Gln Ser Thr Ile Glu Glu Gln Ala Lys Thr Phe Leu Asp Lys Phe  
 20 25 30

Asn His Glu Ala Glu Asp Leu Phe Tyr Gln Ser Ser Leu Ala Ser Trp  
 35 40 45

Asn Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Glu Glu Asn Val Gln Asn Met Asn Asn  
 50 55 60

Ala Gly Asp Lys Trp Ser Ala Phe Leu Lys Glu Gln Ser Thr Leu Ala  
 65 70 75 80

Gln Met Tyr Pro Leu Gln Glu Ile Gln Asn Leu Thr Val Lys Leu Gln  
 85 90 95

Leu Gln Ala Leu Gln Gln Asn Gly Ser Ser Val Leu Ser Glu Asp Lys  
 100 105 110

Ser Lys Arg Leu Asn Thr Ile Leu Asn Thr Met Ser Thr Ile Tyr Ser  
 115 120 125

Thr Gly Lys Val Cys Asn Pro Asp Asn Pro Gln Glu Cys Leu Leu Leu  
 130 135 140

Glu Pro Gly Leu Asn Glu Ile Met Ala Asn Ser Leu Asp Tyr Asn Glu  
 145 150 155 160

Arg Leu Trp Ala Trp Glu Ser Trp Arg Ser Glu Val Gly Lys Gln Leu  
 165 170 175

Arg Pro Leu Tyr Glu Glu Tyr Val Val Leu Lys Asn Glu Met Ala Arg  
 180 185 190

ES 2 481 645 T3

Ala Asn His Tyr Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Trp Arg Gly Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Val Asn Gly Val Asp Gly Tyr Asp Tyr Ser Arg Gly Gln Leu Ile Glu  
 210 215 220

Asp Val Glu His Thr Phe Glu Glu Ile Lys Pro Leu Tyr Glu His Leu  
 225 230 235 240

His Ala Tyr Val Arg Ala Lys Leu Met Asn Ala Tyr Pro Ser Tyr Ile  
 245 250 255

Ser Pro Ile Gly Cys Leu Pro Ala His Leu Leu Gly Asp Met Trp Gly  
 260 265 270

Arg Phe Trp Thr Asn Leu Tyr Ser Leu Thr Val Pro Phe Gly Gln Lys  
 275 280 285

Pro Asn Ile Asp Val Thr Asp Ala Met Val Asp Gln Ala Trp Asp Ala  
 290 295 300

Gln Arg Ile Phe Lys Glu Ala Glu Lys Phe Phe Val Ser Val Gly Leu  
 305 310 315 320

Pro Asn Met Thr Gln Gly Phe Trp Glu Asn Ser Met Leu Thr Asp Pro  
 325 330 335

Gly Asn Val Gln Lys Ala Val Cys His Pro Thr Ala Trp Asp Leu Gly  
 340 345 350

Lys Gly Asp Phe Arg Ile Leu Met Cys Thr Lys Val Thr Met Asp Asp  
 355 360 365

Phe Leu Thr Ala His His Glu Met Gly His Ile Gln Tyr Asp Met Ala  
 370 375 380

Tyr Ala Ala Gln Pro Phe Leu Leu Arg Asn Gly Ala Asn Glu Gly Phe  
 385 390 395 400

His Glu Ala Val Gly Glu Ile Met Ser Leu Ser Ala Ala Thr Pro Lys  
 405 410 415

His Leu Lys Ser Ile Gly Leu Leu Ser Pro Asp Phe Gln Glu Asp Asn  
 420 425 430

Glu Thr Glu Ile Asn Phe Leu Leu Lys Gln Ala Leu Thr Ile Val Gly  
 435 440 445

Thr Leu Pro Phe Thr Tyr Met Leu Glu Lys Trp Arg Trp Met Val Phe  
 450 455 460

Lys Gly Glu Ile Pro Lys Asp Gln Trp Met Lys Lys Trp Trp Glu Met

## ES 2 481 645 T3

465                      470                      475                      480  
 Lys Arg Glu Ile Val 485 Gly Val Val Glu Pro 490 Val Pro His Asp Glu 495 Thr  
 Tyr Cys Asp Pro 500 Ala Ser Leu Phe His 505 Val Ser Asn Asp Tyr Ser Phe 510  
 Ile Arg Tyr Tyr Thr Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gln Phe 525 Gln Glu Ala  
 Leu Cys Gln Ala Ala Lys His 535 Glu Gly Pro Leu His 540 Lys Cys Asp Ile  
 Ser Asn Ser Thr Glu Ala 550 Gly Gln Lys Leu Phe 555 Asn Met Leu Arg Leu 560  
 Gly Lys Ser Glu Pro 565 Trp Thr Leu Ala Leu 570 Glu Asn Val Val Gly Ala 575  
 Lys Asn Met Asn Val Arg Pro Leu Leu 585 Asn Tyr Phe Glu Pro 590 Leu Phe  
 Thr Trp Leu Lys Asp Gln Asn Lys 600 Asn Ser Phe Val Gly 605 Trp Ser Thr  
 Asp Trp Ser Pro Tyr Ala Asp 615 Gln Ser Ile Lys Val 620 Arg Ile Ser Leu  
 Lys Ser Ala Leu Gly Asp 630 Lys Ala Tyr Glu Trp 635 Asn Asp Asn Glu Met 640  
 Tyr Leu Phe Arg Ser 645 Ser Val Ala Tyr Ala 650 Met Arg Gln Tyr Phe Leu 655  
 Lys Val Lys Asn 660 Gln Met Ile Leu Phe 665 Gly Glu Glu Asp Val 670 Arg Val  
 Ala Asn Leu Lys Pro Arg Ile Ser 680 Phe Asn Phe Phe Val 685 Thr Ala Pro  
 Lys Asn Val Ser Asp Ile Ile 695 Pro Arg Thr Glu Val 700 Glu Lys Ala Ile  
 Arg Met Ser Arg Ser Arg Ile Asn Asp Ala Phe 715 Arg Leu Asn Asp Asn 720  
 Ser Leu Glu Phe Leu 725 Gly Ile Gln Pro Thr 730 Leu Gly Pro Pro Asn Gln 735  
 Pro Pro Val Ser 740

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una proteína ACE2 humana soluble recombinante que comprende una proporción de azúcar de más de 20 % (% en masa de la ACE2 total) para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una fibrosis, y en el que la composición se administra por vía sistémica.
2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la fibrosis es una fibrosis local de un tejido u órgano.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la fibrosis comprende fibrosis hepáticas, fibrosis pulmonares, fibrosis de tejido conectivo, fibrosis cutánea o fibrosis renal.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la fibrosis comprende fibrosis hepáticas.
5. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4 para aplicación terapéutica antes de una fibrosis.
6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la fibrosis está relacionada con una inflamación.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que la inflamación está relacionada con hepatitis.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la fibrosis o inflamación está causada por una infección o herida.
9. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la proteína ACE2 no tiene dominio de membrana.

Fig. 1

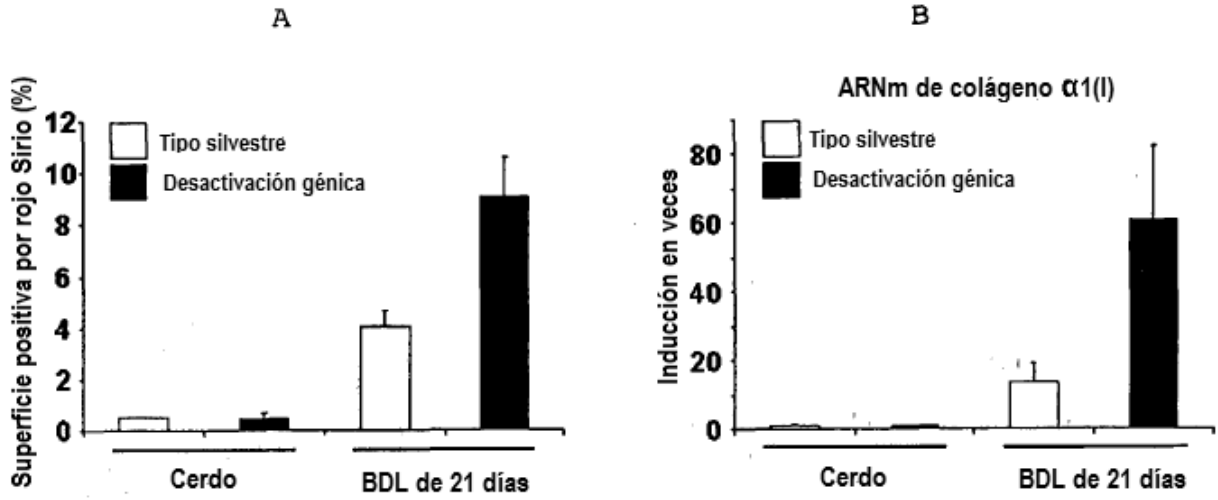


Fig. 2

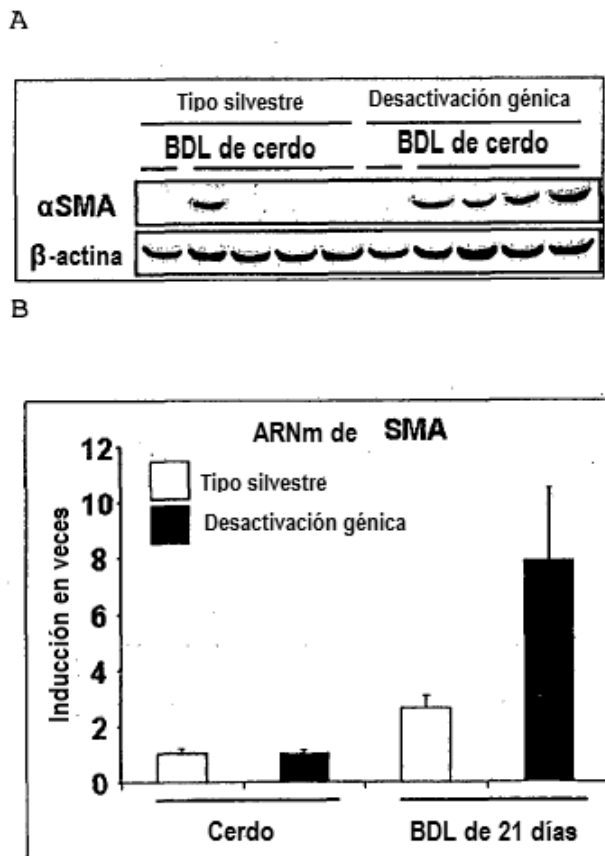


Fig. 3

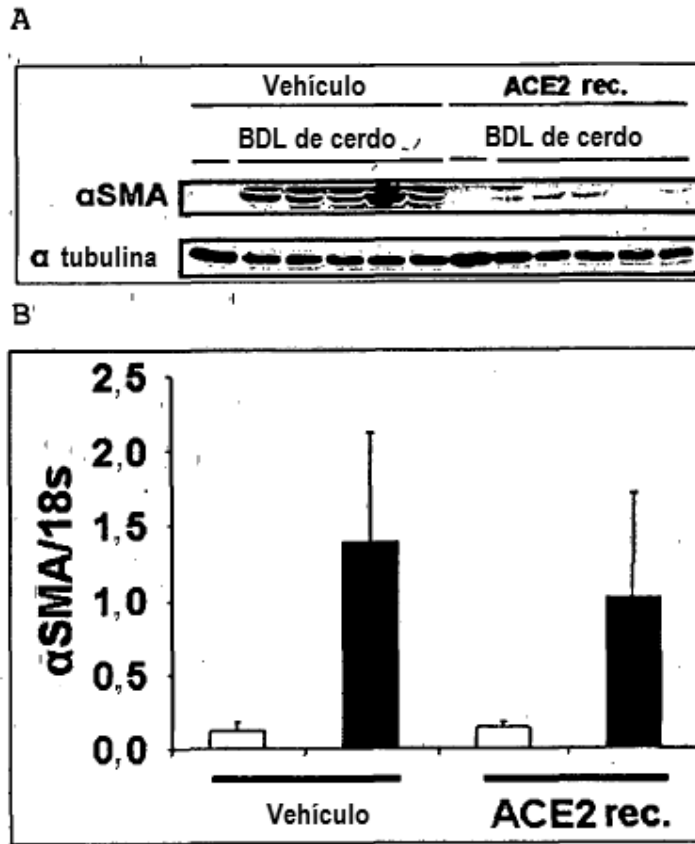


Fig. 4

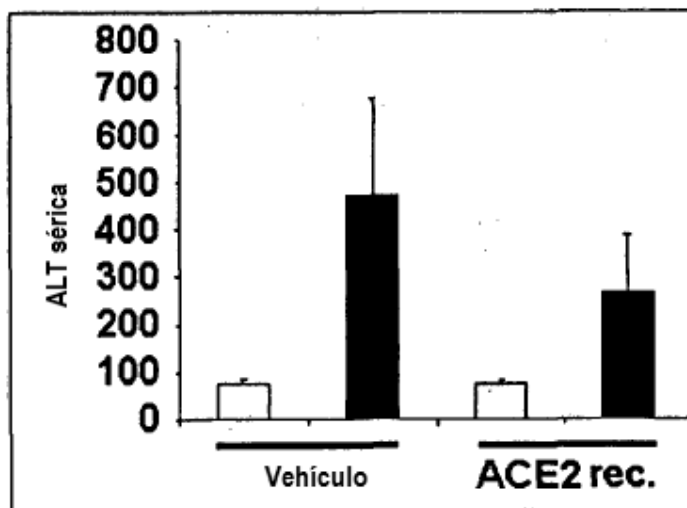


Fig. 5

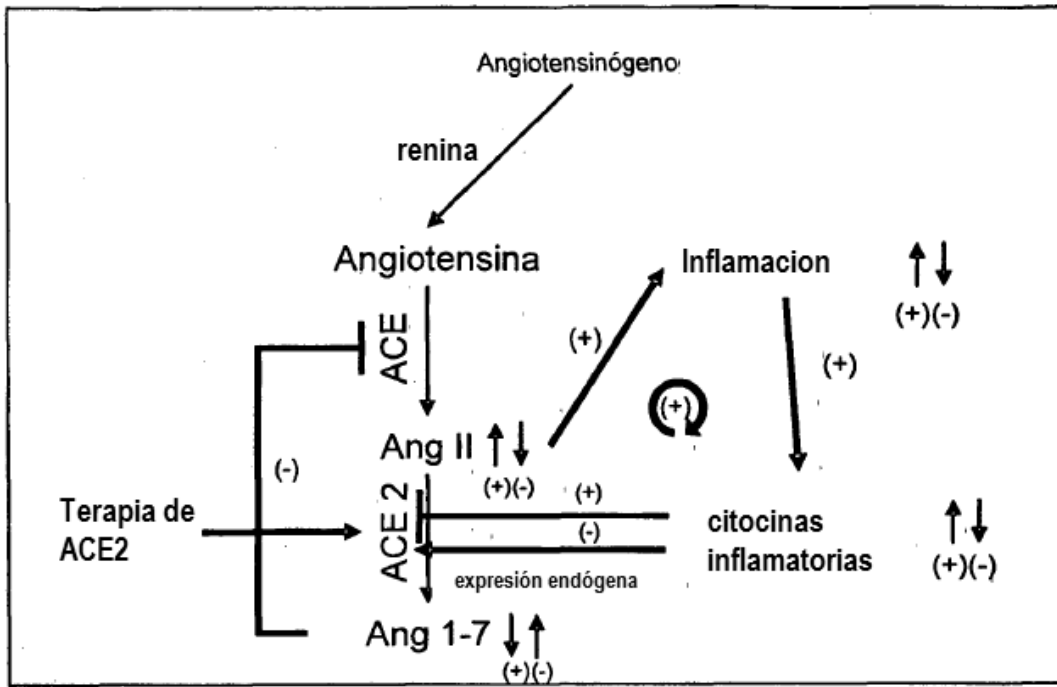


Fig. 6A

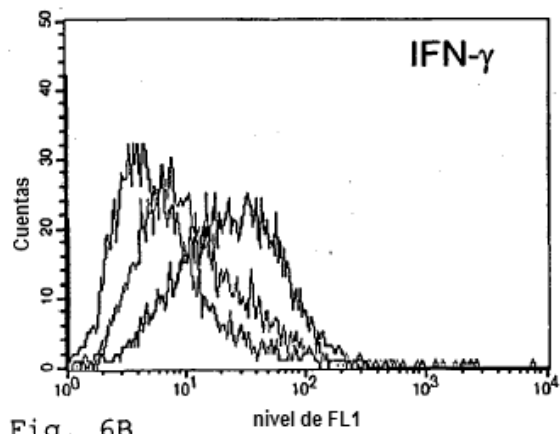
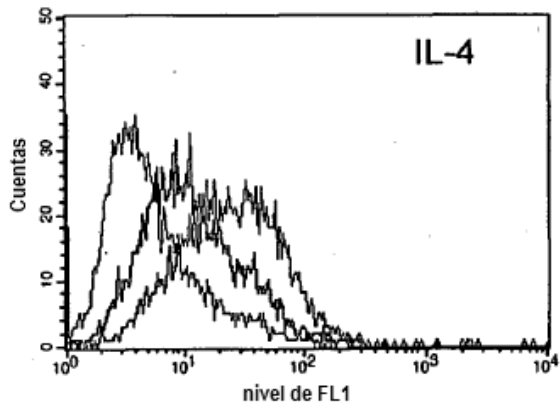


Fig. 6B

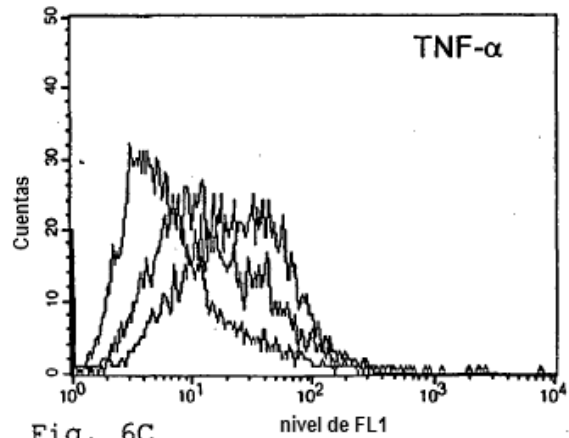


Fig. 6C

Fig. 7

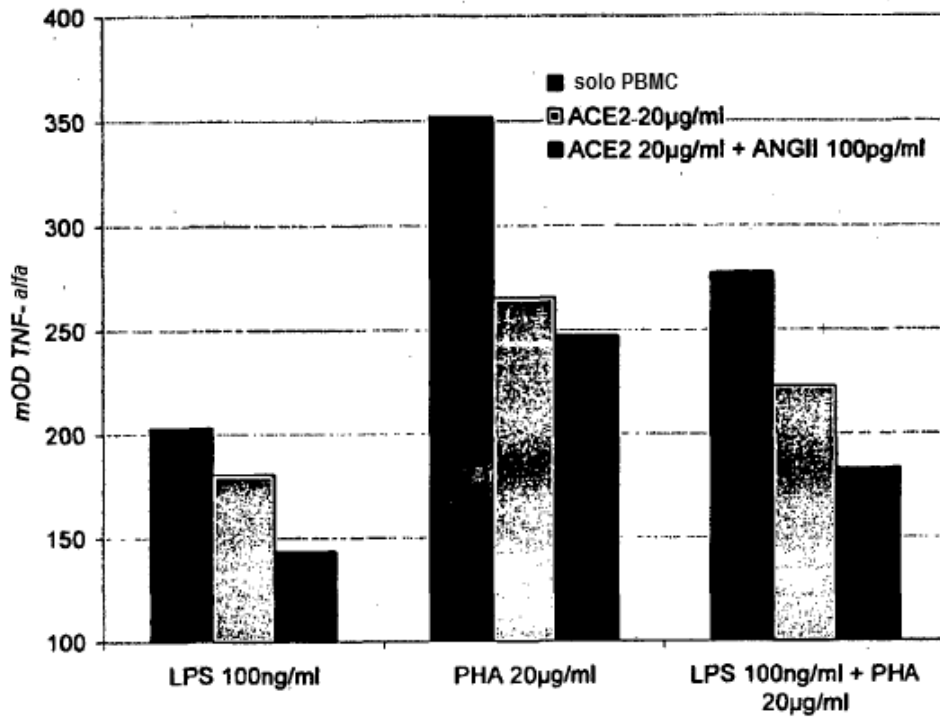


Fig. 8

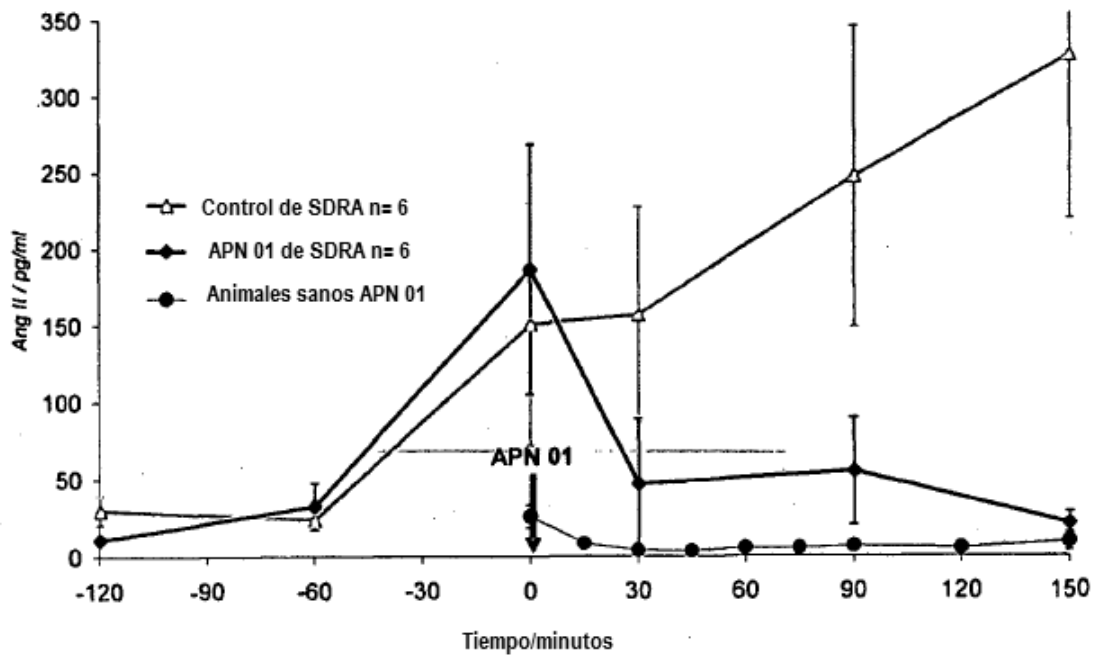




Fig. 9

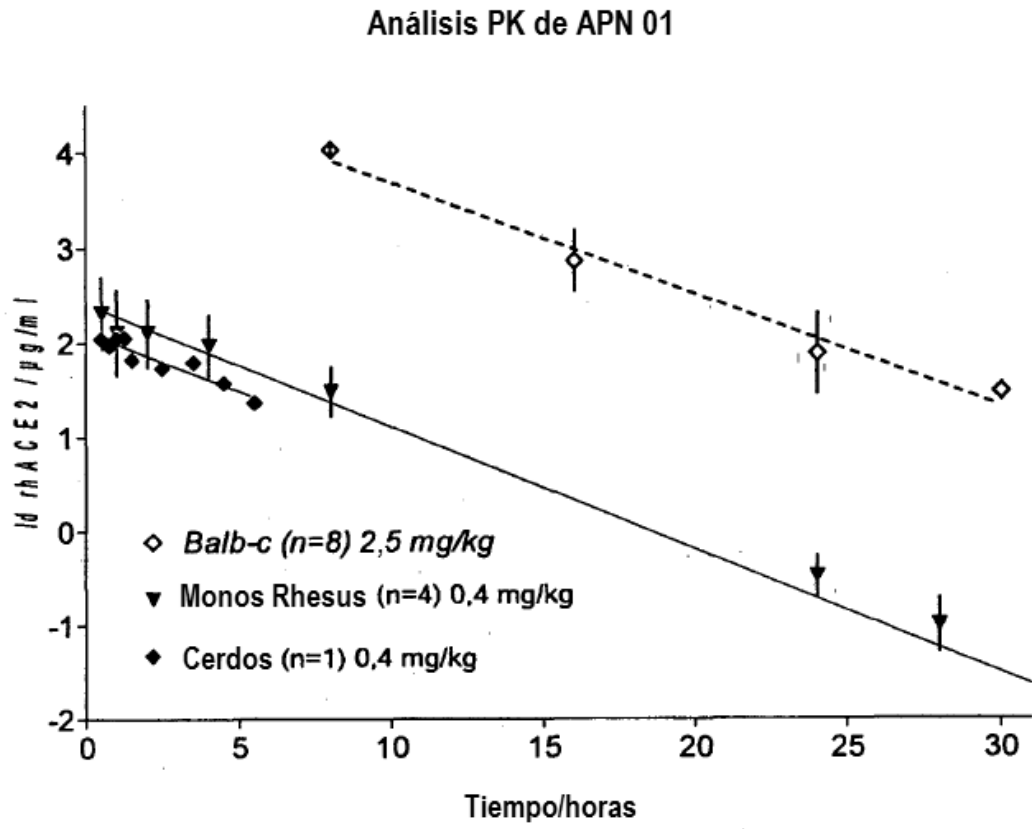


Fig. 10

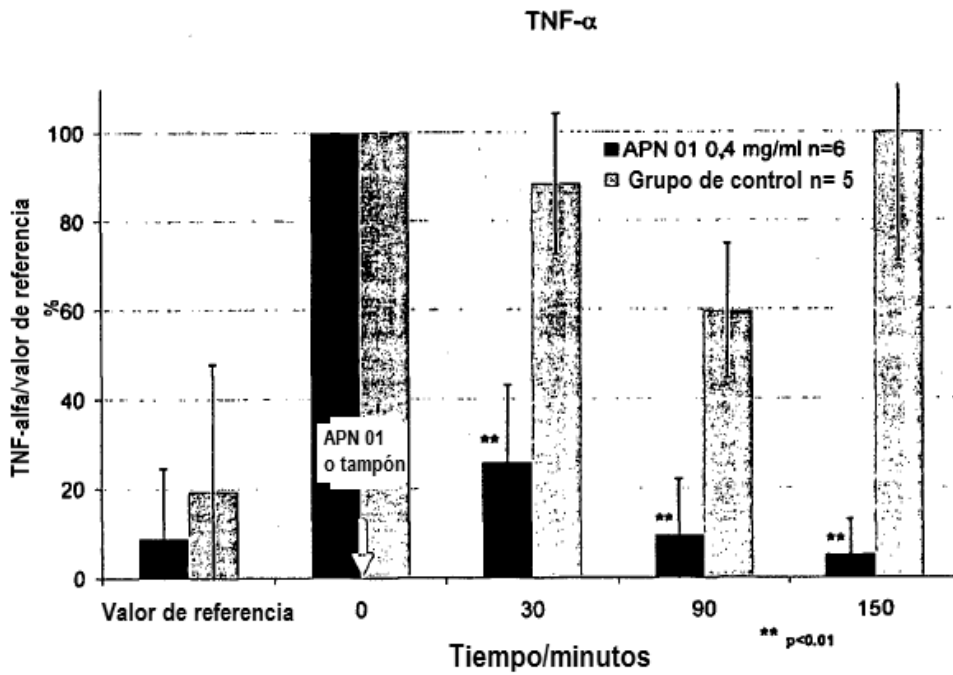


Fig. 11

