

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 491**

51 Int. Cl.:

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 36/254 (2006.01)

A61K 36/54 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2009 E 12181426 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2526955**

54 Título: **Estabilizador de los vasos linfáticos**

30 Prioridad:

18.06.2008 JP 2008159623

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

03.11.2014

73 Titular/es:

**SHISEIDO CO., LTD. (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP**

72 Inventor/es:

**KAJIYA, KENTARO y
OTA, MASAHIRO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 517 491 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

Estabilizador de los vasos linfáticos

Campo técnico

5 La presente invención proporciona un activador de Tie2 (agente de fosforilación) para su uso en el tratamiento o la prevención de las enfermedades de la piel atribuidas a la pérdida de linfa ocasionada por inestabilidad estructural de los vasos linfáticos.

Antecedentes de la técnica

10 La sangre es enviada desde el corazón y pasa a través de los capilares y venas después de lo cual regresa al corazón. Los vasos linfáticos son vasos que forman rutas para descargar fluidos tisulares independiente de este sistema de circulación. Los vasos linfáticos mantienen el volumen sanguíneo a un nivel constante y mantienen un sistema circulatorio cerrado devolviendo el fluido intersticial, proteína, grasa, células y similares que se han filtrado desde los vasos sanguíneos en los tejidos periféricos hacia el sistema vascular. En los capilares presentes en la piel, los exteriores de las células endoteliales están rodeados de una membrana basal, y los pericitos se unen además a ésta. Por otro lado, en los capilares linfáticos, casi no hay membrana basal rodeando los exteriores de las células endoteliales y los pericitos no se unen a la misma. Esta estructura es útil para la incorporación eficiente del fluido corporal y las células desde el intersticio (Documento no patente 1). Se han demostrado previamente que el receptor relacionado con la tirosinasa, el receptor 3 del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR-3), se expresa específicamente en células endoteliales linfáticas, y se ha demostrado que sus ligandos en forma de VEGF-C y VEGF-D inducen la linfangiogénesis. Adicionalmente, se ha demostrado claramente que el VEGF-A induce la linfangiogénesis mediada por el VEGFR2 expresado en células endoteliales linfáticas (Documento no patente 2). Además, se indica a continuación un ejemplo de un artículo que describe la función del conducto linfático. Aunque se observó una destacada linfangiogénesis en la oreja de ratón infectada con adenovirus que expresaba VEGF-A, además de anomalías estructurales, se vio claramente que se inhibía considerablemente la función de recuperación de los vasos linfáticos a partir de los resultados de un experimento en el cual se inyectaba carbono coloidal en la oreja (Documento no patente 3). En otras palabras, se piensa que se requiere que los vasos linfáticos estén adecuadamente organizados y alineados con las células endoteliales linfáticas con el fin de que funcionen. La solicitante ha definido esto como "estabilización de los vasos linfáticos".

15 La estimulación física o química de la piel induce permeabilidad vascular debida a la angiogénesis, al VEGF-A y similares, dando como resultado una acumulación de fluido en tejidos y la aparición de edema. Por otro lado, se sabe también que estos estímulos inducen directamente la neogénesis y la dilatación de los vasos linfáticos. Se ha observado que se induce la dilatación de los vasos linfáticos por inflamación ultravioleta, mientras que experimentos que implican la inyección de un colorante demostraron claramente que se inhibe la función de los vasos linfáticos. Se piensa que los vasos linfáticos se dilatan en un intento de recuperar el fluido intersticial asociado a la fuga de humedad en la dermis asociada a la vasodilatación. Sin embargo, se cree también que una dilatación excesiva de los vasos linfáticos retrasa el edema reduciendo por el contrario su función de recuperación (Documento no patente 4). En otras palabras, se cree que se requiere una "estabilización de los vasos linfáticos" que no induce una dilatación excesiva de los vasos linfáticos para una rápida recuperación del fluido intersticial.

20 Ejemplos de estados patológicos que se han conocido previamente que implican una disfunción de los vasos linfáticos incluyen linfedema congénito así como linfedema secundario asociado con filariasis, cirugía, tumores malignos e inflamación. Ejemplos de linfedemas congénitos incluyen enfermedad de Milroy, enfermedad de Meige y síndrome de linfedema-distiquiasis. Se ha comunicado aplasia o hipoplasia de los vasos linfáticos en la enfermedad de Milroy, mientras que se ha informado de hiperplasia de los vasos linfáticos en el síndrome de linfedema-distiquiasis. Basándose también en estos hallazgos se piensa que es necesaria mantener la función de recuperación no sólo a través de la linfangiogénesis, sino también a través de la estabilización de los vasos linfáticos (Documento no patente 5).

Documentos de la técnica anterior

Documentos no patente

Documento no patente 1: Jikken Igaku (Experimental Medicine), Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 133-138.

50 Documento no patente 2: Jussila, L. and Alitalo, K.: (2006) Vascular growth factors and lymphangiogenesis, *Physiol. Rev.*, 82, 673-700.

Documento no patente 3: Nagy, et al.: (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis, *J. Exp. Med.*, 196, 1497-1506.

Documento no patente 4: Kajiyama, K., Hirakawa, S. And Detmar, M.: (2006) VEGF-A mediates UVB-induced impairment of lymphatic vessel function, *Am. J. Pathol.*, 169, 1496-1503.

55 Documento no patente 5: *Experimental Medicine*, Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 139-143.

Documento no patente 6: *Experimental Medicine*, Vol. 20, No. 8 (2002), pp. 52-57.

Documento no patente 7: Jung, H.-J., et al.: (2003) *Planta Med.*, 69, 610-616.

Documento no patente 8: Kajiya, K., et al.: (2005) *Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function*, *EMBO J.*, 24, 2885-95.

Compendio de la invención

5 Problema técnico

Un propósito de la presente invención es proporcionar un fármaco efectivo para el mantenimiento y la aceleración de la función de recuperación de los vasos linfáticos a través de una estabilización de los vasos linfáticos.

Medios para resolver los problemas

10 Tras la clonación molecular de VEGF, las moléculas de la familia de VEGF y de la familia de la angiopoyetina (Ang) se han ido identificando sucesivamente como factores que actúan específicamente en la formación de los vasos sanguíneos. El VEGF y sus receptores están involucrados en una gama extremadamente amplia de formación de los vasos sanguíneos que se extiende desde la formación inicial de los vasos sanguíneos, denominada vasculogénesis, hasta la subsiguiente angiogénesis. Por otro lado, Ang actúa en la formación del lumen asociada a fenómenos celulares tales como germinación, ramificación, invaginación y regresión a cargo de las células endoteliales vasculares seguido de la vasculogénesis. Ang controla la adhesión entre las células endoteliales vasculares y las células de la pared vascular, como los pericitos y las células vasculares de los músculos lisos, mediada por el receptor relacionado de la tirosina quinasa con el dominio 2 de homología con EGF e Ig (Tie2) expresado en las células endoteliales vasculares, y, aunque se entiende que participa en la estabilización de la estructura vascular (Documento no patente 6), no se ha aclarado adecuadamente la relación entre Tie2 y los vasos linfáticos.

20 Cuando los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación que se centraba en la relación entre Ang-1 y Tie2 expresado en las células endoteliales linfáticas, se encontró que Ang-1 promueve la función de recuperación de los vasos linfáticos mediada por la activación de Tie2, lo que conduce a la terminación de la presente invención como se describe a continuación:

- 25 (1) un activador de Tie2 para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades de la piel atribuibles a la pérdida de linfa causada por inestabilidad estructural de los vasos linfáticos, donde el activador de Tie2 es un extracto de Ginseng Siberiano;
- (2) el activador para uso de acuerdo con (1), donde el extracto es un extracto acuoso; y,
- (3) el activador para uso de acuerdo con (1) o (2), donde la enfermedad es edema o la tumefacción.

30 **Efectos de la invención**

El uso de un extracto de Ginseng Siberiano como un activador de Tie2 hace posible el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades de la piel atribuibles a la pérdida de linfa causada por inestabilidad estructural de los vasos linfáticos como, por ejemplo, edema o tumefacción.

Breve descripción de los dibujos

35 La FIG. 1 es un gráfico en el que se registran los cambios en la función de recuperación en los vasos linfáticos inducidos por Ang-1 basados en una evaluación visual.

La FIG. 2 muestra los resultados de la fosforilación de Tie2 por extracto de corteza de canela.

La FIG. 3 muestra los resultados de la fosforilación de Tie2 por el extracto de Ginseng Siberiano.

Realizaciones de la invención

40 Ejemplos de activadores de Tie2 incluyen los activadores de Tie2 comúnmente conocidos como la angiopoyetina 1 que posee acción activante de Tie2, y activadores de Tie2 recién descubiertos por los inventores de la presente invención que presentan dicha actividad, como los extractos de plantas de la especie *Cinnamomum* (no según la presente invención), el extracto de Ginseng Siberiano, o el siringaresinol (no según la presente invención). Además, la activación de Tie2 como aquí se describe se refiere a la habilidad de ser capaz de convertir Tie2 en su forma activa (Tie2 fosforilada) mediante fosforilación.

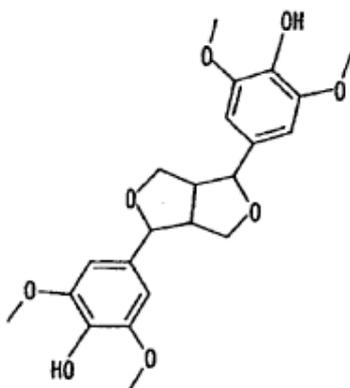
45 Miembros del género *Cinnamomum* se refieren a plantas que pertenecen al orden Lauraceae, familia Lauraceae, y consisten en más de 300 especies, ejemplos conocidos de los cuales incluyen *Cinnamomum cassia* Blume, *C. camphora*, *C. daphnoides*, *C. doederleinii*, *C. japonicum*, *C. pseudo-pedunculatum*, *C. sieboldii*, *C. verum* y *C. zeylanicum*. Preferiblemente un extracto derivado de *Cinnamomum cassia* Blume, y particularmente preferiblemente un extracto derivado de canela en rama, la cual es una rama joven de *Cinnamomum cassia* Blume, o la corteza de canela, se usa como activador de Tie2 en la presente invención. Aunque los extractos de corteza de canela se sabe que son útiles como un ingrediente activo en tónicos para el cabello (Patente japonesa no examinada N° de publicación H10-265350), su actividad de estabilización de los vasos linfáticos se ha desconocido totalmente hasta ahora.

Tradicionalmente se ha dicho que el extracto de Ginseng Siberiano es eficaz para la recuperación física o mental. Este extracto es extremadamente efectivo para las capacidades mentales y físicas disminuidas como la debilidad, la fatiga extrema o una concentración disminuida así como para la recuperación después de una enfermedad. Se usa en los EEUU como un suplemento dietético.

5 El extracto antes mencionado se puede obtener según métodos comunes y, por ejemplo, se puede obtener mediante la inmersión o calor a reflujo de una planta fuente con un disolvente de extracción o bien a temperaturas normales o mientras se calienta seguido de filtración y concentración. Se puede usar cualquier disolvente como disolvente de extracción siempre que sea un disolvente que se utilice normalmente para la extracción, ejemplos incluyen disolventes acuosos como el agua, solución salina fisiológica, tampón fosfato o tampón borato y disolventes orgánicos incluyendo alcoholes como el etanol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina, alcoholes que contienen agua, cloroformo, dicloroetano, tetracloruro de carbono, acetona, acetato de etilo y hexano, y estos pueden ser usados solos o en combinación. El agua se usa preferiblemente como disolvente. Los extractos obtenidos mediante extracción con los disolventes anteriormente mencionados pueden usarse tal cual, se pueden usar en forma de extracto concentrado obtenido mediante concentración por secado por congelación y similares, se pueden usar después de la eliminación de impurezas mediante resina de adsorción o de intercambio iónico y similares, o se pueden adsorber con una columna de polímero poroso (como la Amberlita XAD-2) seguido de elución con el disolvente deseado y luego concentrarse más a fondo.

Recientemente se demostró que la liriodendrina aislada mediante fraccionamiento cromatográfico guiado por bioensayo de un extracto de Ginseng Siberiano en acetato de etilo tiene actividad anti-inflamatoria y anticonceptiva. En opinión del autor, los efectos anti-inflamatorios y anticonceptivos de la liriodendrina tras administración oral eran atribuibles a la transformación in vivo de la liriodendrina en su hidrolizado siringaresinol (Documento no patente 7).

El siringaresinol es un compuesto de lignano antioxidante único en plantas, y se usa en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos debido a su efecto de mejoría de la hipertensión y su efecto inhibitor en *Helicobacter pylori* (ver, por ejemplo, Patente japonesa no examinada N° de publicación H8-268887 y Patente japonesa no examinada N° de publicación 2004-352652). El siringaresinol tiene la estructura química que se indica a continuación.



El siringaresinol es un compuesto conocido, y está contenido en *Cinnamomum cassia* Blume del orden de las Laurales, familia de las Lauraceae, y particularmente en las ramas jóvenes (canela en rama) o en la corteza (corteza de canela) del mismo. Sin embargo, sus efectos de estabilización de los vasos linfáticos y de activación de Tie2 son completamente desconocidos. El siringaresinol se puede extraer a partir de una fuente natural como la canela en rama o la corteza de canela, o se puede sintetizar.

El siringaresinol puede estar en forma de una sal inorgánica o de una sal orgánica. Ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a, sales inorgánicas como hidroclouros, sulfatos, fosfatos, hidrobromuros, sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de calcio o sales de amonio. Ejemplos de sales orgánicas incluyen, acetatos, lactatos, maleatos, fumaratos, tartratos, citratos, metanosulfonatos, p-toluensulfonatos, sales de trietanolamina, sales de dietanolamina y sales de aminoácidos.

Según la presente invención, el activador de Tie2 se usa como un producto farmacéutico o cosmético efectivo para el tratamiento y/o prevención de varias enfermedades de la piel como el edema (tumefacción) atribuible a pérdida de linfa originada por inestabilidad estructural de los vasos linfáticos. Ejemplos de edema incluyen linfedema secundario asociado con radiación ultravioleta, filariasis, cirugía, tumores malignos e inflamación, y linfedema congénito como la enfermedad de Milroy, la enfermedad de Meige y el síndrome linfedema-distiquiasis.

El activador de Tie2 también se puede usar en un método cosmético para la disminución y/o prevención de la hinchazón o las bolsas bajo los ojos. Este método cosmético se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, aplicación del activador de Tie2 en un sitio donde existe tumefacción o similar y, o bien dejar en reposo como está o

promover el flujo de la linfa mediante masaje en la dirección del flujo linfático. Ejemplos de localizaciones donde se aplica este método incluyen sitios que abarcan todo el cuerpo como la cara, el cuello, las manos y los pies.

La dosis, el método de aplicación y la forma del activador de Tie2 se pueden determinar adecuadamente según el propósito de uso de los mismos. Por ejemplo, no existen limitaciones particulares en la forma de administración del activador de Tie2 y, aunque puede ser en forma de administración oral, administración parenteral o aplicación externa, es preferible en forma de aplicación externa. Ejemplos de formas farmacéuticas incluyen preparaciones externas como ungüentos, crema, loción lechosa, loción, paquete facial o aditivo para el baño, preparaciones parenterales como una preparación para inyección, preparación para infusión o supositorios, y preparaciones orales como comprimidos, polvos, cápsulas, granulados, extractos o jarabes. Además, otro ejemplo de una aplicación del activador de Tie2 es en alimentos funcionales.

Aunque la cantidad de activador de Tie2 en una preparación que contiene el activador de Tie2 se puede determinar adecuadamente de acuerdo con la aplicación, típicamente es de 0,0001 a 20 % en moles y preferiblemente de 0,0001 a 10,0 % en moles basándose en la cantidad total de la preparación.

Adicionalmente se pueden incorporar adecuadamente según sea necesario en la preparación, además del activador de Tie2, un vehículo, un desecante, un conservante, un agente de refuerzo, un espesante, un emulsionante, un antioxidante, un edulcorante, un saborizante amargo, un condimento, un colorante o un aroma usados normalmente en alimentos o productos farmacéuticos, o un agente blanqueador, un humectante, un componente oleoso, un absorbente de ultravioleta, un tensioactivo, un espesante, alcohol, componente en polvo, un colorante, un componente acuoso, agua o varios tipos de nutrientes de la piel usados normalmente en productos cosméticos.

Por otra parte, en el caso de usar el activador de Tie2 en forma de preparación externa para la piel, se puede incorporar adecuadamente un agente auxiliar comúnmente usado en la preparación externa para la piel, ejemplos del cual incluyen agentes quelantes de metales como el edetato disódico, el edetato trisódico, el citrato sódico, el polifosfato sódico, el metafosfato sódico o el ácido glucónico, fármacos como la cafeína, tanino, verapamil, ácido tranexámico y derivados de los mismos, extracto de regaliz, glabridina, extracto de membrillo en agua caliente, varias hierbas medicinales, acetato de tocoferol o ácido glicirricínico y derivados o sales de los mismos, agentes blanqueadores como la vitamina C, el fosfato de ascorbilo y magnesio, glucósido del ácido ascórbico, albutina o ácido kójico, azúcares como la glucosa, fructosa, manosa, sacarosa o trehalosa, y sustancias de vitamina A como el ácido retinoico, retinol, acetato de retinol o palmitato de retinol.

A continuación se ofrece una descripción más detallada de la presente invención a través de ejemplos de los mismos. Las cantidades incorporadas se indican como porcentaje en peso (%peso).

Métodos experimentales

Ensayos de drenaje linfático

Se infectaron con una jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV) las aurículas de ratones de 8 semanas de edad con adenovirus (1×10^9 ufi/ratón), en el cual se incorporó el gen de la angiopoyetina-1 (Ang-1) derivada de ratón en un vector AdenoX. Los ratones se infectaron también con adenovirus que incorporaba solamente un vector AdenoX como control. Se inyectó 1 μ l de solución de carbono coloidal (Kamei Co., Ltd., Japan) en la punta de la aurícula con una jeringa Hamilton seguido de análisis de los cambios en el flujo de la linfa a lo largo del tiempo. Como resultado, se observó que se promovía la función de recuperación de los vasos linfáticos en las orejas de los ratones con alta expresión de Ang-1 (datos no mostrados). Adicionalmente, se llevó a cabo una evaluación visual de los cambios en la función de recuperación de los vasos linfáticos, y se hicieron las comparaciones puntuando de acuerdo con uno de los niveles (5: toda la tinta permanece en los vasos linfáticos, 1: toda la tinta es recuperada y ya no está presente en los vasos linfáticos), los resultados de los cuales se muestran en la FIG. 1. De acuerdo con la FIG. 1, se observó una estimulación notable de la función de recuperación de los vasos linfáticos en comparación con el control debido a la expresión del activador de Tie2, Ang-1, demostrando así que los vasos linfáticos se estabilizan por la activación de Tie2.

Además, tras el sacrificio de los animales mediante anestesia, se recogieron simultáneamente las orejas de los animales y se machacaron en nitrógeno líquido seguido de extracción de la proteína con el reactivo de extracción Phosphosafe (Novagen, Madison, WI). La cantidad total de proteína se determinó con el kit RC DC Protein Assay Kit (BIO-RAD, Hercules, CA) y se detectó mediante transferencia Western de la forma que se describe a continuación. Se sometió a SDS-PAGE una cantidad igual de proteína total en un gel de poliacrilamida al 15% (NPU-7,5L, ATTO, Japan), y se confirmó la expresión de la proteína Ang-1 mediante tinción con un kit ECL usando un anticuerpo Ang-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Transferencia Western de las células endoteliales linfáticas

Se aislaron células endoteliales linfáticas a partir de prepucio infantil humano como células CD-31 positivas, CD-34 negativas, CD45 negativas (Documento no patente 8). Las células endoteliales linfáticas se cultivaron en EBM-2 (Cambrex, Verviers, Belgium) enriquecido con factores adicionales, y se extrajo la proteína con el reactivo de extracción Phosphosafe (Novagen, Madison, WI) en presencia de varios fármacos (Ang-1, extracto de corteza de canela, extracto de Ginseng Siberiano y siringaresinol). Se prepararon células enriquecidas con DMSO como control.

Además, el extracto de corteza de canela y el siringaresinol se prepararon de la forma indicada a continuación. El extracto de Ginseng Siberiano (Ask Intercity) se obtuvo por extracción de raíz de Ginseng Siberiano con etanol al 30%. Este extracto se confirmó que contenía 1,01% en peso de siringaresinol mediante HPLC. Este extracto se disolvió entonces con DMSO para su uso como muestra de ensayo. La cantidad total de proteína se determinó con el kit RC DC Protein Assay Kit (BIO-RAD, Hercules, CA), y se detectó mediante transferencia Western de la forma que se describe a continuación. Se sometió una cantidad igual de proteína a SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida al 7,5% (NPU-7,5 L, ATTO, Japón), y se confirmó la expresión de la proteína Tie2 y Tie2 fosforilada mediante tinción con el kit ECL usando un anticuerpo Ang-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La FIG. 2 muestra que el extracto de corteza de canela fosforila (activa) Tie2 de la misma manera que Ang-1. La FIG. 3 muestra que el extracto de Ginseng Siberiano fosforila (activa) Tie2 de la misma forma que Ang-1. Además, aunque no se muestran los datos, el siringaresinol se confirmó también que activa Tie2 de la misma forma que Ang-1.

Preparación de residuo seco del extracto de canela en rama en agua caliente

Se añadieron 400,7 g de canela en rama (*Cinnamomum cassia* Blume) a 2 L de agua seguido de calentamiento y extracción durante 3 horas y filtración. Se añadieron 2 L de agua al residuo resultante seguido de repetición del mismo procedimiento y calentamiento y extracción dos veces más. El líquido resultante se secó por congelación para obtener 37,9 g de residuo seco del extracto en agua caliente.

Fraccionamiento y aislamiento del residuo seco del extracto en agua caliente

Se sometieron 31,0 g de residuo seco del extracto en agua caliente a fraccionamiento en crudo usando un Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech AB). Se obtuvieron una fracción de solución acuosa (2,7 g), una fracción eluida al 50% de metanol (8,5 g), una fracción eluida con metanol (4,9 g), una fracción eluida con acetona (0,5 g) y una fracción no eluida (7,4 g). El siringaresinol (2,08 g) se aisló por fraccionamiento de la fracción eluida con metanol con columna de Amberlita XAD2 (Organo) seguido de HPLC preparativo (columna: Capcell Pak C18 AQ, Shiseido, detección: 210 nm UV, fase móvil: mezcla $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$).

REIVINDICACIONES

1. Activador de Tie2 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades de la piel atribuibles a pérdida de linfa causada por inestabilidad estructural de los vasos linfáticos, en el que dicho activador de Tie2 es un extracto de Ginseng Siberiano.
- 5 2. El activador para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho extracto es un extracto acuoso.
3. El activador para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha enfermedad es edema o tumefacción.

Fig. 1

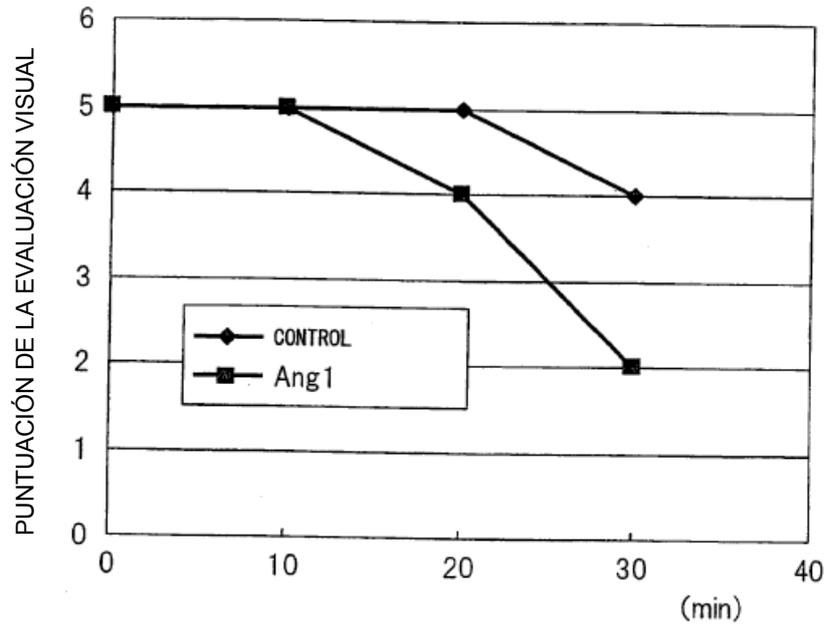


Fig. 2

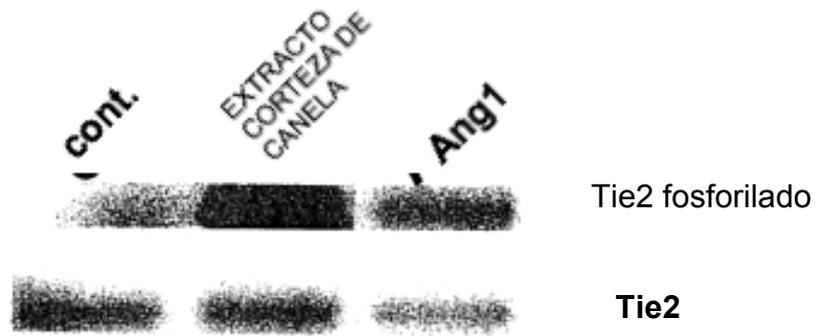


Fig.3

