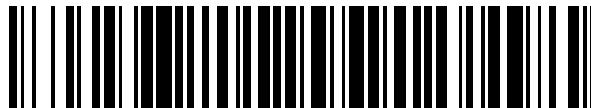


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 841**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/51** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008** **E 08857855 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014** **EP 2223699**

54 Título: **Agente terapéutico radical para queloide y cicatriz hipertrófica**

30 Prioridad:

**07.12.2007 JP 2007317294**

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

**02.12.2014**

73 Titular/es:

**SEIKAGAKU CORPORATION (50.0%)**  
**6-1, Marunouchi 1-chome Chiyoda-ku**  
**Tokyo 100-0005, JP y**  
**SUZUKI, SHIGEHICO (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, SHIGEHICO;**  
**NAITO, MOTOKO y**  
**IKEDA, MIKA**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 523 841 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

Agente terapéutico radical para queloides y cicatriz hipertrófica

## 5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un agente de promoción de formación de fibras elásticas.

## 10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las abreviaturas usadas en el presente documento son las siguientes.

GAG: glicosaminoglicano

CS: sulfato de condroitina

15 CS-A: sulfato de condroitina A

CS-B: sulfato de condroitina B

CS-C: sulfato de condroitina C

CSPG: sulfato de condroitina proteoglicano

GAGasa: glicosaminoglicano liasa

20 CSasa: condroitinasa (sulfato de condroitina liasa)

CSasa-ABC: condroitinasa ABC

CSasa-B: condroitinasa B

CSasa-AC: condroitinasa AC

25 Las cicatrices hipertróficas y queloides se caracterizan por, para decirlo de una manera, una anomalía en la cicatrización de heridas, en la que se forma un tejido fibroso llamado "tejido cicatricial", en el proceso de cicatrización de heridas producido en la piel, sin regeneración del tejido normal original (Documentos no de Patente 1 y 2). Mientras que una cicatriz hipertrófica se produce como resultado de la interferencia en la cicatrización de heridas, tal como una herida grande y profunda, infección, contacto con un cuerpo extraño o sutura inapropiada, un queloide puede surgir a partir de una herida de muy poca importancia, como una picadura de insecto o una punción por una vacuna. Los queloides se caracterizan por su crecimiento más allá de los límites del sitio inicial de la herida (Documentos no de Patente 2 y 3). Sin embargo, las cicatrices hipertróficas y queloides tienen en común que en ambas de sus partes lesionadas existe una lesión elevada de color rojo, que se caracteriza principalmente por una acumulación excesiva de matriz extracelular y proliferación celular. Las partes lesionadas son extremadamente duras, limitando notablemente, por lo tanto, la elasticidad de la piel. Debido a esto, estas zonas afectadas no sólo están acompañadas de dolor, sino que también causan un impedimento funcional si se encuentran localizadas sobre una articulación, tal como la restricción del rango de movimiento de la articulación. Las partes lesionadas también pueden causar trastornos del crecimiento si el paciente es un niño; por lo tanto, el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides es importante no sólo por razones cosméticas, sino también desde perspectivas funcionales. Sin embargo, no existe un modelo adecuado para la experimentación en animales para las cicatrices hipertróficas y queloides, por tanto la aclaración de la etiología y la patología no han visto muchos avances hasta la actualidad.

Los métodos de tratamiento que se emplean en la actualidad son los siguientes.

45

1) Terapia de fijación con presión

En general, se aplica una esponja con un agente adhesivo en un lado (tal como Reston o Fixton (marcas registradas)) como un parche directamente sobre la superficie de la parte lesionada y se presiona con cinta quirúrgica y se fija (Documentos no de Patente 4 a 6). En los casos en los que la parte lesionada se encuentra ubicada sobre una parte móvil, la parte lesionada se envuelve adicionalmente con una correa de soporte o apósito por encima de la cinta quirúrgica, o se usa una faja o corsé (Documento no de Patente 7). Esta presión aplanará la parte lesionada y aliviará el dolor y el picor; sin embargo, la finalización de dicha presión da como resultado la re-inflamación de la parte lesionada y reparación de dolor y picor.

55

2) Terapia quirúrgica:

Cuando la parte lesionada es pequeña o en el caso de una cicatriz hipertrófica estrecha, los síntomas se alivian mediante la escisión o la sutura quirúrgica plástica apropiada de la misma. Sin embargo, se requiere terapia de fijación con presión durante aproximadamente tres meses, incluso después de la retirada de la sutura (Documento no de Patente 8). Además, el tratamiento quirúrgico no es aplicable a una parte lesionada o cicatriz hipertrófica amplia que se extiende a lo largo de un área grande, tal como una lesión térmica. Adicionalmente, en el caso de un queloide, incluso si la parte lesionada se ha aplanado en una ocasión, la parte lesionada aparecerá nuevamente a partir de la misma y regenerará una parte lesionada que se extiende sobre un área más grande que la de antes de la cirugía (Documento no de Patente 16). Con el fin de prevenir esta reparación, es necesaria radioterapia después de la eliminación de la lesión; sin embargo, la radioterapia no hace nada más que reducir el índice de reparación;

65

por lo tanto, esta terapia no es un tratamiento radical (Documento no de Patente 16).

3) Terapia utilizando un material de cubierta:

5 Desde el informe de Perkins *et al.* (Documento no de Patente 9), las cicatrices hipertróficas y los queloides se han tratado aplicando una lámina de gel de silicona como un parche y, en algunos casos, los síntomas se mejoran. El mecanismo de acción de los mismos se cree que es la acción hidratante; sin embargo no están claros los detalles del mismo (Documento no de Patente 10). También se ha utilizado un material de cubierta de hidrocoloide en lugar de gel de silicona. Sin embargo, esta terapia no hace nada más que mejorar los síntomas y los efectos de la misma no son estables. Además, ha habido muchos casos en los que no se observó una mejora de los síntomas; por lo tanto, esta terapia no es un tratamiento radical.

4) Farmacoterapia:

15 Se han inyectado fármacos esteroides (solución de triamcinolona) por vía tópica en la parte lesionada de una cicatriz hipertrófica y queleide (Documento no de Patente 11). Esta inyección no sólo aplanar la parte lesionada, sino que también elimina el enrojecimiento y alivia el picor. Sin embargo, dependiendo de la dosis, pueden aparecer efectos secundarios sistémicos, tales como atrofodermia, hipopigmentación, pigmentación excesiva y telangiectasias; por lo tanto, estos fármacos esteroides no se pueden administrar durante un período prolongado. Además, la inyección tampoco es aplicable a las lesiones que se extienden a lo largo de un área grande (Documento no de Patente 12 y Documento no de Patente 16). Adicionalmente, las mujeres también pueden experimentar un efecto secundario tal como irregularidad menstrual, incluso en pequeñas dosis. Además, puesto que la reaparición se observa en muchos pacientes tras finalización de la inyección del fármaco esteroide, los fármacos esteroides no son un tratamiento radical y los pacientes se ven obligados a asistir a un hospital durante un periodo de tiempo prolongado. La acción de un fármaco esteroide se basa en un efecto antiinflamatorio, tal como inhibición de citoquinas y una reducción posterior en el número de células queloides (fibroblastos grandes que tienen rasgos característicos de queloides). La reaparición en la terapia con esteroides indica que una simple inducción de una reducción en el número de células de queleide por efecto antiinflamatorio no conduce a un cuidado radical (Documento no de Patente 16). También existe un método en el que un agente de cinta que contiene un esteroide tal como betametasona o fludrocortida se aplica como un parche diferente a la inyección tópica; sin embargo, los efectos del mismo no van más allá de la mejora de los síntomas y son inestables. Además, algunos pacientes pueden desarrollar erupciones en la piel debido a dicha cinta. Como una terapia con medicamentos, se utiliza tranilast (Documento no de Patente 13). Igualmente, esto no hace nada más que mejorar los síntomas tales como picor en algunos casos y, en muchos casos, tiene que tomarse por no menos de 3 meses.

De esta manera, a pesar de que a estas terapias convencionales para cicatrices hipertróficas y queloides se les llama "tratamiento", no son más que medidas paliativas. Es decir, las terapias convencionales no hacen nada más que simplemente aplanar la parte lesionada abultada en una cicatriz hipertrófica y queleide y mejorar temporalmente los síntomas. En el campo de la medicina que se refiere a cicatrices hipertróficas y queloides, no ha habido un concepto *per se* para tratar radicalmente un tejido lesionado y convertirlo en un tejido normal. Por consiguiente, hasta la presente fecha, el mundo nunca ha visto un agente terapéutico que normalice las cicatrices hipertróficas y los queloides (es decir, que permita que las cicatrices hipertróficas y queloides recuperen la condición de tejido normal), es decir, un agente terapéutico radical.

45 Los colágenos, fibras elásticas y GAG se conocen como los constituyentes principales de la piel humana. En cicatrices hipertróficas y queloides se ha informado la acumulación excesiva de colágenos de Tipo I, Tipo III y Tipo VI (Documentos no de Patente 14 y 15) y deficiencias en la estructura normal de las fibras elásticas (Documentos no de Patente 17 y 18). Las fibras elásticas, cuyo componente principal es la elastina, son fibras que, al igual que una goma y un resorte, son altamente elásticas y fácilmente estirables, las cuales vuelven a su estado original cuando se retira la fuerza. Los detalles del mecanismo de formación de fibras elásticas no están claros; sin embargo, se cree que las fibras elásticas se forman cuando las proteínas de elastina se depositan y entrelazan alrededor de una fibra llamada microfibrilla. La Fibrilina-1 se conoce como uno de los principales componentes de la microfibrilla. En la matriz extracelular del tejido lesionado de cicatrices hipertróficas y queloides, existe una deficiencia en el depósito y la reticulación de elastinas a fibrilina-1 (Documento no de Patente 17).

55 El Documento de Patente 1 describe que las CSAsas se usan para reducir el tamaño del tejido fibroso, sobre la base de los resultados que muestran que CSasa-B y CSasa-AC inhibían la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, aunque esto se aplicara a queloides, no proporcionaría nada más allá del concepto convencional de aplanamiento de la parte lesionada mediante la inhibición de la proliferación de fibroblastos. En vista de que los fármacos esteroides, los cuales tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, no pueden utilizarse para un tratamiento radical de cicatrices hipertróficas y queloides y que los queloides y similares reaparecen tras la finalización de la administración del fármaco esteroide, no se puede esperar la normalización de la parte lesionada simplemente inhibiendo la proliferación de fibroblastos.

65 El tejido de la parte lesionada de un paciente de queleide es diferente del tejido lesionado de un paciente de psoriasis o el tejido dérmico de un modelo animal de psoriasis (ratón) y se caracteriza por haces de fibras de

colágeno densos intrincados formados por colágenos depositados de forma anormal, hialinización de estos haces de fibras de colágeno y acumulación anormal de CSPG en la matriz extracelular. Además, como una característica de los tejidos de queloide, se sabe que los tejidos de queloide tienen una deficiencia de fibras elásticas (fibras formadas mediante depósito y reticulación de elastina a fibrilina-1), las cuales se encuentran en tejidos normales de seres humanos.

En animales diferentes a seres humanos, las heridas se sanan sin desarrollar un queloide o similares; por lo tanto, como se ha descrito anteriormente, no se ha desarrollado hasta la fecha ni siquiera un sistema de ensayo capaz de evaluar el efecto del tratamiento radical de queloides. Por lo tanto, ni siquiera ha existido un concepto de tratamiento radical, en el cual, al igual que en la presente invención, el propio tejido lesionado de un queloide y similares se recupera hasta un tejido normal. Es decir, se ha considerado que un tratamiento radical de este tipo es imposible.

Documento de Patente 1: documento JP-A-2004-504262.

Documento no de Patente 1: Abergel, R. P., Pizzurro, D. Meeker, C. A., *et al.* (1985) Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J. Invest. Dermatol.* 84, 384-390.

Documento no de Patente 2: Heenan, P. J. (1997) Tumors of the Fibrous Tissue Involving the Skin. En: *Lever's Histopathology of the Skin* (eds Elder, D., *et al.*), págs. 847-887. East Washington Square, Filadelfia, Pensilvania: Lip-pincott-Raven Publishers.

Documento no de Patente 3: Ooura, T. *et al.* (1993) Definition and Classification of Keloid Hypertrophic Scar. *Japanese Journal of Plastic Surgery* 36: 265-274.

Documento no de Patente 4: R. Fujimori: Pressure therapy of keloids. *J. of Operation*, 44: 3-13, 1990.

Documento no de Patente 5: Costa AM, *et al.*: Mechanical Force Induce Scar Remodeling: *Am J Pathol.* 155: 1671-1679, 1999.

Documento no de Patente 6: Suzuki, S. y Naito, M.: Treatment of keloids and hypertrophic scars. *Japan Medical Journal*, 4516: 29-32, 2003.

Documento no de Patente 7: Suzuki, S.: Treatment of cicatricial keloid. *MB Derma*, 67: 134-138, 2002.

Documento no de Patente 8: Suzuki, S.: Operation: Operation of keloid and/or hypertrophic scar. 50: 1557-1561, 1996.

Documento no de Patente 9: Perkins K, *et al.*: Silicone gel: a new treatment for burn scars and contractures. *Burns* 9; 201-204, 1983.

Documento no de Patente 10: Ooura, T. *et al.*: Results of Experimental Use of Silicone Gel Sheet for Treatment of Hypertrophic Scar and Keloid. *Journal of Clinical Therapeutics and Medicines* 14; 2921-2937, 1998.

Documento no de Patente 11: Maguire H C: Treatment of keloids with triamcinolone acetone injected intralesionally, *JAMA*, 192: 325-329, 1956.

Documento no de Patente 12: Suzuki, S. y Fujimori R. Treatment of itching of hypertrophic scar and keloid. *MB Derma*, 30:14-19, 1999.

Documento no de Patente 13: Namba, Y. *et al.*: Clinical evaluation of tranilast on keloid and hypertrophic scar. *Japanese Journal of Burn Injuries* 18:30-45, 1992.

Documento no de Patente 14: Peltonen, J., Hsiao, L. L., Jaakkola, S. *et al.* (1991) Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA. *J. Invest. Dermatol.* 97: 240-248.

Documento no de Patente 15: Naitoh, M., Hosokawa, N., Kubota, H. *et al.* (2001) Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1316-1322.

Documento no de Patente 16: Robles DT, Moore E, Draznin M, Berg D. Keloids: Pathology and management. *Dermatology Online Journal* 13(3): 9 (2007).

Documento no de Patente 17: N.V. Kamath, A. Ormsby, W.F. Bergfeld y N.S. House, A light microscopic and immunohistochemical evaluation of scars. *J Cutan Pathol* 29 (2002): 27-32.

Documento no de Patente 18: K.S. Bhangoo, J.K. Quinlivan y J.R. Connelly, Elastin fibers in scar tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 57 (1976): 308-13.

## RESUMEN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico que cure radicalmente (normalice) una cicatriz hipertrófica y queloide, los cuales son trastornos refractarios únicos para el ser humano, permitiéndoles que recuperen la condición de tejido normal.

Los presentes inventores estudiaron intensamente para solucionar los problemas descritos anteriormente y, antes que el resto del mundo, tuvieron éxito en el desarrollo de un sistema de ensayo capaz de evaluar de forma correcta los efectos terapéuticos en pacientes de queloide. Este sistema ha permitido evaluar incluso el proceso de normalización de tejido, lo cual conduce a un tratamiento radical de queloides y similares, además de una reducción en el volumen de tejido de queloides y similares. En el presente documento, el proceso de normalización se refiere a la regeneración de la formación de fibras elásticas en un tejido queloide, una reducción en el número de células de queloide que han proliferado de forma anormal, una reducción de los haces de fibras de colágeno acumulados de forma excesiva, desaparición de hialinización, una reducción del tejido queloide y similares. Este sistema de ensayo novedoso incluye un método en el cual se recogen los tejidos lesionados de un paciente de queloide que tienen un

tamaño de 5 mm x 5 mm y mediante el uso de una técnica precisa, por ejemplo, una combinación de producción de bolsillos subcutáneos de un tamaño mínimo y suturas de anclaje, los tejidos lesionados recogidos se implantan y fijan por vía subcutánea en la espalda de un ratón desnudo. Este método permitió que los tejidos lesionados del paciente de queloide mantuvieran las características del queloide durante un período prolongado dentro de la dermis de una piel de animal, permitiendo de este modo la evaluación de los efectos terapéuticos mediante la administración de una sustancia de ensayo a la parte lesionada.

Adicionalmente, en relación con la normalización del tejido de un queloide o similares, los presentes inventores desarrollaron un ensayo para la formación de fibras elásticas (ensayo de elastogénesis), el cual es un sistema de evaluación *in vitro*. Este sistema de ensayo es uno que es capaz de medir la propiedad inhibidora de fibras elásticas (fibras formadas por el depósito y reticulación de elastina a fibrilina-1) mediante una sustancia de ensayo. Por otra parte, mediante el uso de estos sistemas de ensayo, los presentes inventores estudiaron adicionalmente de forma intensa y, como resultado, descubrieron que una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C ofrece un nuevo enfoque para promover la formación de fibras elásticas y para el tratamiento radical de queloides y cicatrices hipertróficas, completando de ese modo la presente invención.

Es decir, el sumario de la presente invención es el siguiente.

(1) Uso *in vitro* de condroitinasa ABC para promover formación de fibras elásticas.

(2) El uso *in vitro* de acuerdo con (1), caracterizado por que dicha condroitinasa ABC se obtiene a partir de *Proteus vulgaris*.

(3) Condroitinasa ABC para su uso en el tratamiento radical de queloides y/o cicatrices hipertróficas.

(4) La condroitinasa ABC de acuerdo con (3), caracterizada por que dicha enzima promueve una asociación entre elastina y fibrilina.

(5) La condroitinasa ABC de acuerdo con (3), caracterizada por que la condroitinasa ABC se obtiene a partir de *Proteus vulgaris*.

También se describe un uso de la enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C en la producción del agente de promoción de formación de fibras elásticas, así como también un uso de la enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C en la producción del agente terapéutico radical para queloides y/o cicatrices hipertróficas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[Fig. 1] La Fig. 1 son figuras (fotografías) que muestran el resultado de la observación bajo un microscopio de un tejido de la piel de un paciente de queloide que contiene una parte lesionada y parte de piel normal. La región indicada con una línea oblicua es la parte lesionada con queloide y la parte adyacente estructuralmente diferente es la parte de piel normal. La figura de la izquierda muestra una muestra de ensayo sometida a tinción con hematoxilina y eosina (HE), mientras que la figura de la derecha muestra una muestra de ensayo sometida a tinción de Elástica-van Gieson (EVG). La tinción de EVG es un método que puede teñir fibras elásticas de negro.

[Fig. 2] La Fig. 2 son figuras (fotografías) que muestran los resultados de la expresión de los constituyentes de la fibra elástica en un tejido de queloide y tejido de piel normal. La Fig. 2A es una figura (fotografía) que muestra los resultados de electroforesis de ARNm amplificados por RT-PCR de los constituyentes de la fibra elástica en ambos tejidos. La Fig. 2B son figuras (fotografías) que muestran las expresiones de las proteínas de los constituyentes de la fibra elástica en tejido de queloide y la existencia de localización de la misma en la matriz extracelular, que se detectaron mediante tinción inmunohistoquímica. La figura superior de la Fig. 2B es una muestra de ensayo sometida a tinción de elastina. La figura inferior izquierda de la Fig. 2B es una muestra de ensayo sometida a tinción de fibrilina-1. La figura inferior derecha de la Fig. 2B es una muestra de ensayo en la que los núcleos de las células de queloide se tiñeron con Hoechst.

[Fig. 3] La Fig. 3 son figuras (fotografías) que muestran los resultados de los análisis de los CS acumulados en tejidos de queloide. La figura superior izquierda es una muestra de ensayo en la que un corte de tejido de piel normal se tiñó con azul Alcian sin un tratamiento enzimático. La figura inferior izquierda es una muestra de ensayo en la que un corte de tejido de queloide se tiñó con azul Alcian sin un tratamiento enzimático. Las figuras de la derecha son fotografías de muestras de ensayo en la que un corte de tejido de queloide se tiñó con azul Alcian después de un tratamiento con, desde la parte superior de las tres figuras, CSasa-ABC, CSasa-B o CSasa-AC.

[Fig. 4] La Fig. 4 son figuras (fotografías) que muestran la formación de fibras elásticas evaluada mediante ensayo *in vitro* de formación de fibras elásticas (ensayo de elastogénesis). La figura de la izquierda muestra el resultado de la tinción que muestra la localización de fibras de elastina en la matriz extracelular, mientras que la figura de la derecha muestra el resultado de la tinción que muestra la localización de fibrilina-1 en la matriz extracelular.

[Fig. 5] La Fig. 5 es una figura (gráfico) que muestra el efecto inhibitor de diversos CS (CS-A, CS-B o CS-C en solitario y combinaciones de estos CS) sobre la formación de fibras elásticas, evaluado mediante ensayo *in vitro* para formación de fibras elásticas. Después de teñir las fibras de elastina depositadas en la matriz extracelular, las zonas de depósito de elastina se convirtieron en valores numéricos. Las proporciones relativas de diversos grupos con CS añadido en términos de la zona de depósito de elastina con respecto a la del grupo sin CS se expresaron en un gráfico.

[Fig. 6] La Fig. 6 son figuras (fotografías) que muestran los resultados de los efectos terapéuticos de inyección de CSasa-ABC sobre la formación de fibras elásticas *in vivo*. Las dos fotografías de la Fig. 6A son una fotografía de la lesión de queloide de un paciente y una fotografía de muestra de ensayo histopatológica de la misma (antes del implante). La figura de la derecha es una ampliación de la parte indicada con un círculo en la figura de la izquierda. Las dos figuras (fotografías) de la Fig. 6B muestran la eficacia de CSasa-ABC inyectada en los tejidos de queloide que se implantaron por vía subcutánea en dos sitios en la espalda de un ratón desnudo. La figura de la izquierda de la Fig. 6B muestra los sitios de implante inmediatamente después del implante y la figura de la derecha de la Fig. 6B muestra los sitios de implante el día 35 después del implante con los tratamientos de CSasa-ABC o tampón. Las dos figuras (fotografías) de la Fig. 6C se tomaron el día 35 después del implante y muestran los resultados bajo un microscopio en los tejidos de queloide del grupo al que se inyectó CSasa-ABC o tampón. Desde la parte superior, las figuras (fotografías) muestran el tejido de queloide teñido con Elástica-van Gieson (EVG) del grupo al que se inyectó tampón y el del grupo al que se inyectó CSasa-ABC.

[Fig. 7] La Fig. 7 son figuras (fotografías) que muestran los resultados de los efectos terapéuticos de inyección de tampón, inyección de CSasa-ABC, inyección de CSasa-B e inyección de CSasa-AC sobre la formación de fibras elásticas *in vivo*. Las dos fotografías de la Fig. 7A muestran la muestra de ensayo histopatológica de la parte lesionada de un paciente (izquierda) y una ampliación de la parte encerrada en un círculo (derecha) (antes del implante). La Fig. 7B son figuras (fotografías) tomadas el día 35 después del implante, que muestran los resultados de observación de los efectos terapéuticos de inyección de tampón, inyección de CSasa-ABC, inyección de CSasa-B e inyección de CSasa-AC, inyecciones que se llevaron a cabo después del implante subcutáneo de los tejidos de queloide en la espalda de un ratón desnudo.

[Fig. 8] La Fig. 8 son figuras (fotografías) tomadas el día 35 después del implante, que muestran los resultados de exámenes histológicos con respecto a los efectos terapéuticos de inyección de tampón, inyección de CSasa-ABC, inyección de CSasa-B e inyección de CSasa-AC, inyecciones que se llevaron a cabo después del implante subcutáneo de los tejidos de queloide en la espalda de un ratón desnudo. Desde la izquierda, las fotografías muestran los resultados de inyección de tampón, inyección de CSasa-ABC, inyección de CSasa-B e inyección de CSasa-AC. La fila superior son micrografías tomadas a bajo aumento, que capturan las zonas de tejidos implantados restantes. La fila intermedia son micrografías tomadas a medio aumento, que capturan la condición de regeneración de estructuras de fibra elástica, así como también las condiciones de haces de fibras de colágeno e hialinización de las mismas. La fila inferior son micrografías tomadas a gran aumento, que capturan las células de queloide restantes. Las fotografías en las filas superior e intermedia muestran los resultados de tinción de Elástica-van Gieson (EVG). Las fotografías en la fila inferior muestran los resultados de tinción de HE. Las fotografías de tinción de EVG en la fila intermedia muestran el grado de regeneración de fibras elásticas en los tejidos en los que se inyectó tampón, CSasa-ABC, CSasa-B o CSasa-AC. Las zonas de los tejidos implantados restantes, el grado de la regeneración de fibras elásticas y el número de células de queloide humanas en los tejidos después de los tratamientos de inyección de tampón, inyección de CSasa-ABC, inyección de CSasa-B o inyección de CSasa-AC se mostraron con fotografías tomadas a diferentes aumentos.

#### DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES

La presente invención se describirá a continuación con más detalle.

<1> El agente de promoción de acuerdo con la presente invención

El agente de promoción de formación de fibras elásticas de acuerdo con la presente invención es un agente de promoción de formación de fibras elásticas que contiene una enzima o enzimas que degradan CS-A, CS-B y CS-C (en lo sucesivo en el presente documento, denominado también "el agente de promoción de acuerdo con la presente invención").

En el presente documento, degradación de CS-A se refiere a una acción para generar un disacárido-4-sulfato no saturado escindiendo el enlace N-acetilhexosaminida en CS-A mediante reacción de eliminación. La degradación de CS-B se refiere a una acción para generar un disacárido o tetrasacárido no saturado actuando sobre CS-B y la degradación de CS-C se refiere a una acción para generar disacárido (o tetrasacárido)-6-sulfato no saturado escindiendo el enlace N-acetilhexosaminida en CS-C mediante reacción de eliminación.

Como la enzima usada en el agente de promoción de acuerdo con la presente invención, se puede usar específicamente CSasa-ABC (obtenida a partir de *Proteus vulgaris*; documento JP-A-1994(H6)-153947, T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi y S. Suzuki: J. Biol. Chem., 243, 1523(1968); y S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata, K. Anno, N. Seno, Y. Kawai y T. Furuhashi: J. Biol. Chem., 243, 1543(1968)). Además, como la CSasa-ABC usada en la presente invención, se pueden usar las que están disponibles en el mercado. Por ejemplo, se ilustra Condroitinasa ABC (número de catálogo: 100332), fabricada por Seikagaku Corporation.

Además, como la enzima que se puede usar en los Ejemplos, se conocen además de las anteriores CSasa-ABC, CSasa-AC (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*; T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, J. Biol. Chem., 243, 1523(1968)), CSasa-ACII (obtenida a partir de *Arthrobacter aureoscens*; K. Hiyama y S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824 (1975); y K. Hiyama y S. Okada, J. Biochem. (Tokio), 80, 1201(1976)), CSasa-ACIII (obtenida a partir de *Flavobacterium* sp. Hp102; H. Miyazono, H. Kikuchi, K. Yoshida, K. Morikawa y K. Tokuyasu, J. Biochem.,

61, 1023 (1989)), CSasa-B (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*; Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973(1974), Y. M. Michelacci y C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121(1975) y K. Maeyama, A. Tawada, A. Ueno y K. Yoshida, J. Biochem., 57, 1189 (1985)) y similares. También se puede usar cualquiera de estas condroitinasas.

5 Además, se conoce que la CSasa-ABC anterior usada en la presente invención, además del componente principal de CSasa-ABC (en lo sucesivo en el presente documento, denominada también "liasa I"), también contiene la denominada "sulfato de condroitina liasa II" (documento JP-A-1998(H10)-262660; en lo sucesivo en el presente documento, denominada "liasa II"). Como la enzima usada en la presente invención, se puede usar una forma que  
10 incluye la liasa II y también se puede usar una fracción altamente purificada que contiene únicamente una fracción de cada liasa. Entre éstas, se prefiere usar una fracción altamente purificada que contiene únicamente liasa I.

15 Para el método de obtener la fracción de CSasa-ABC de alta pureza (fracción de liasa I) y fracción de liasa II descritas anteriormente, por ejemplo, se puede hacer referencia al documento JP-A-2002-335968 y al documento JP-A-1998(H10)-262660.

Adicionalmente, la expresión "obtenida a partir de" con respecto a una CSasa-ABC usada en el presente documento, significa que el origen de la misma es el gen que codifica la CSasa en un organismo vivo que porta el gen de forma intrínseca. Por ejemplo, CSasa-ABC obtenida a partir de *Proteus vulgaris* se refiere a una CSasa-ABC que se produce por el gen portado de forma intrínseca por *Proteus vulgaris*. Por consiguiente, la condroitinasa ABC obtenida a partir de *Proteus vulgaris* incluye no solo aquellas producidas por el propio *Proteus vulgaris*, sino también aquellas producidas por otras células que usan el gen de CSasa-ABC obtenido a partir de *Proteus vulgaris* y similares. Adicionalmente, la condroitinasa ABC obtenida a partir de *Proteus vulgaris* incluye variantes recombinantes de una CSasa-ABC o similares, que se produjeron mediante el uso de un gen de CSasa-ABC  
20 variante preparado a partir del gen descrito anteriormente.

La enzima usada en la presente invención es preferentemente una que se ha purificado hasta tal punto que se puede usar como un agente farmacéutico y no contiene sustancialmente ninguna sustancia que no se permite que se incluya en un agente farmacéutico. Por ejemplo, se prefiere que la enzima sea una CSasa-ABC purificada que  
30 tiene una actividad enzimática de no menos de 100 U/mg proteína. Es especialmente preferido usar una CSasa-ABC purificada que tiene una actividad enzimática de no menos de 100 U/mg proteína, que no contiene sustancialmente una endotoxina y cuyo contenido de ácido nucleico y contenido de proteasa no es mayor que el límite de detección.

En el presente documento, 1 U (unidad) de una CSasa es la cantidad de enzima que cataliza la formación del producto a partir de CS a una velocidad de 1 micromol por minuto a un pH óptimo y a aproximadamente una temperatura óptima. Para que quede constancia, a continuación se muestra la definición de 1 U de diversas CSasas.

1 U de CSasa-ABC se define como la cantidad de enzima que catalizó la formación de disacárido no saturado a partir de CS a una velocidad de 1 micromol por minuto a pH 8,0 y 37 °C. Además, 1 U de CSasa-AC (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*) se define como la cantidad de enzima que catalizó la formación de disacárido no saturado a partir de CS a una velocidad de 1 micromol por minuto a pH 7,3 y 37 °C.

Además, 1 U de CSasa-B (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*) se define como la cantidad de enzima que genera una sustancia que absorbe UV que corresponde al resto de ácido  $\Delta$ 4-hexurónico a partir de CS-B a una  
45 velocidad de 1 micromol por minuto a pH 8,0 y 37 °C.

La actividad enzimática de la enzima usada en la presente invención y los Ejemplos se puede cuantificar midiendo la cantidad de disacárido no saturado generada en la condición óptima descrita anteriormente de cada enzima y comparándola con la cantidad generada por 1 U de la enzima.

50 Por ejemplo, mediante el uso de una condroitinasa ABC que tiene una actividad enzimática de no menos de 100 U/mg proteína, se proporciona un agente farmacéutico altamente seguro y eficaz, que no afecta los tejidos circundantes cuando se administra a un organismo vivo como un agente farmacéutico inyectable y puede degradar de forma apropiada CS de proteoglicanos en un sitio diana (por ejemplo, un queloide o cicatriz hipertrófica). Una CSasa-ABC se puede obtener mediante, por ejemplo, el método descrito en el documento JP-A-1994(H6)-153947. También se puede usar una CSasa-ABC disponible en el mercado.

El agente de promoción de acuerdo con la presente invención también se puede usar como un reactivo de un experimento.

60 Además, también se describe el concepto de un agente de regeneración de fibras elásticas que contiene una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C (en lo sucesivo en el presente documento, denominado también "el agente de regeneración de acuerdo con la presente invención").

65 Se prefiere emplear una CSasa-ABC como la enzima usada en el agente de regeneración. Entre las CSasa-ABC, se prefieren aquellas obtenidas a partir de *Proteus vulgaris* y es muy preferido usar una fracción altamente purificada

que contiene únicamente la liasa I.

5 Como se ha descrito en lo anterior, en tejidos de queloide, la elastina no se deposita y/o se reticula a proteína fibrilina-1; por lo tanto, los tejidos de queloide tienen una deficiencia en la formación de fibras elásticas. En el presente documento, mediante la administración del agente de regeneración de acuerdo con la presente invención, se puede inducir la asociación entre elastina y fibrilina para regenerar fibras elásticas. La explicación con respecto a "enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C" y similares usada en el agente de regeneración de acuerdo con la presente invención, así como también el método de administración preferido de la misma, el número de las administraciones y similares son los mismos que los descritos para el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención.

<2> El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención

15 El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención es un agente terapéutico radical para queloides y/o cicatrices hipertróficas, que contiene una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C (en lo sucesivo en el presente documento, denominado también "el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención").

20 El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención puede contener únicamente una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C como el componente eficaz. Además, el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención se puede mezclar con otro componente medicinal adicional junto con la enzima. En el presente documento, el componente medicinal no se encuentra limitado particularmente, siempre y cuando una de las sustancias no inhiba la acción intrínseca de la otra sustancia al estar mezclada con la enzima o al administrarse en combinación.

25 Además, la vía de administración del agente terapéutico de acuerdo con la presente invención no se encuentra limitada particularmente. El componente eficaz de acuerdo con la presente invención se puede disolver en, por ejemplo, agua, solución tampón o solución salina fisiológica y se puede inyectar, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intradérmica o por vía intramuscular.

30 Además, el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención se puede usar en combinación con un anestésico local o similar.

35 En la presente invención, un tratamiento abarca no solo los tratamientos ex-post en un sentido convencional, los cuales se llevan a cabo para un paciente después de que él/ella se encuentra afectado por el trastorno diana, sino también medidas preventivas las cuales se llevan a cabo antes del hecho con el fin de prevenir el desarrollo o reaparición de un queloide y/o cicatriz hipertrófica.

40 Además, en la presente invención, un tratamiento radical no se refiere a medidas paliativas que simplemente reducen el tamaño del sitio de la lesión o similares, sino más bien significa curar radical y completamente el sitio de la lesión permitiéndole que se recupere hasta un tejido normal.

45 Como se ha podido observar a partir de los Ejemplos de Referencia descritos anteriormente, cuando se cultivan células de queloide en un sistema de cultivo en el cual coexisten CS-A, CS-B y/o CS-C, el depósito de elastinas en la matriz extracelular, es decir, la asociación de las mismas con fibrilina, se inhibe. Además, como se ha podido observar a partir de los Ejemplos, mediante la administración de una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C al tejido de queloide, tiene lugar la regeneración de fibras elásticas mediante la asociación entre elastina y fibrilina, permitiendo de este modo un tratamiento radical del queloide y/o la cicatriz hipertrófica.

50 El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención contiene una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C a una cantidad eficaz para tratar un queloide y/o cicatriz hipertrófica promoviendo la asociación entre elastina y fibrilina, es decir, permitiendo que las fibras elásticas se regeneren.

55 La expresión "una cantidad eficaz" usada en el presente documento se refiere a una cantidad que es eficaz para promover la regeneración de fibras elásticas en un queloide y/o cicatriz hipertrófica con el fin de mejorar, normalizar y prevenir la reaparición del queloide y/o cicatriz hipertrófica. Esta cantidad varía dependiendo del síntoma o síntomas del paciente, el volumen de la parte lesionada, la edad del paciente y similares. La cantidad no se encuentra limitada particularmente siempre y cuando la cantidad sea eficaz para promover la formación de fibras elásticas en queloides y/o cicatrices hipertróficas y para mejorar la condición del queloide y/o cicatriz hipertrófica y para prevenir la reaparición del queloide y/o cicatriz hipertrófica y los ejemplos de tal cantidad incluyen, por ejemplo, en una dosis única del agente terapéutico de acuerdo con la presente invención por 5 mm<sup>3</sup> de parte lesionada, no menos de 0,01 U, no menos de 0,02 U, no menos de 0,05 U, no menos de 0,1 U, no menos de 0,5 U, no menos de 1 U, no menos de 2 U y no menos de 4 U. Más específicamente, se pueden ilustrar los intervalos de 0,01 a 5 U, 0,01 a 4 U, 0,01 a 2 U, 0,01 a 1 U, 0,01 a 0,5 U, 0,01 a 0,1 U, 0,01 a 0,05 U, 0,01 a 0,02 U, 0,02 a 5 U, 0,02 a 4 U, 0,02 a 2 U, 0,02 a 1 U, 0,02 a 0,5 U, 0,02 a 0,1 U, 0,02 a 0,05 U, 0,05 a 5 U, 0,05 a 2 U, 0,05 a 1 U, 0,05 a 0,5 U, 0,05 a 0,1 U, 0,1 a 5 U, 0,1 a 4 U, 0,1 a 2 U, 0,1 a 1 U, 0,1 a 0,5 U, 0,5 a 5 U, 0,5 a 4 U, 0,5 a 1 U, 1 a 5 U, 1 a 4 U, 1 a 2 U, 2 a 5 U, 2 a 4 U y 4 a 5 U.



Además, el número de administraciones del agente terapéutico de acuerdo con la presente invención puede ser una vez al día y el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención se puede administrar 2 a 4 veces al día o más veces al día. Tal administración se puede proporcionar todos los días según sea necesario o en intervalos de días apropiados a lo largo de un periodo de tiempo necesario.

El sujeto al cual se aplica el agente terapéutico de acuerdo con la presente invención no se encuentra limitado particularmente siempre y cuando sea un queloide y/o cicatriz hipertrófica. El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención se puede aplicar de forma extensa a, por ejemplo, queloides verdadero, queloides cicatricial, cicatrices hipertróficas y cicatrices maduras (los ejemplos de los mismos incluyen cicatrices por acné).

## EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación con más detalle a modo de ejemplos de la misma; sin embargo, la presente invención no se limita a los mismos.

[Ejemplo de Referencia 1] Observación de parte lesionada con queloide y parte de piel normal

Como un material de tejido, una muestra de tejido humano que contiene una lesión de queloide y parte de piel normal se extirpó a partir de un paciente de queloide. La muestra se fijó en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante 24 horas y se incrustó posteriormente en parafina para preparar un bloque de parafina a partir del cual se preparó un corte de parafina de 3 µm. Después de la desparafinación, se llevaron a cabo tinción de hematoxilina y eosina (HE) y tinción de Elástica-van Gieson (EVG) en el corte de parafina obtenido de este modo para preparar una muestra de ensayo. El tejido de queloide y el tejido de piel normal se observaron bajo un microscopio.

Los resultados se mostraron en la Fig. 1. La parte indicada con una línea es la parte lesionada con queloide y la parte adyacente es la parte de piel normal. Mediante la tinción de EVG, se puede confirmar la formación de fibras elásticas (indicada por las flechas), las cuales están teñidas de negro, en la parte de piel normal a diferencia de la parte lesionada con queloide. En contraste con esto, se observa hialinización en la mayoría de la parte lesionada con queloide y se puede confirmar que la parte lesionada con queloide tiene deficiencia en la formación de la fibra elástica.

[Ejemplo de Referencia 2] Expresión de ARNm de los constituyentes de la fibra elástica en el tejido lesionado de queloide y tejido de piel normal

Como materiales de tejido, muestras de tejido humano se extirparon a partir de tejidos de queloide lesionados (4 individuos) y tejidos de piel normal (3 individuos). A partir de estos tejidos de queloide y tejidos de piel normal, se extrajeron ARN totales usando el kit RNeasy Plus (fabricado por QIAGEN). A partir de 1 µg de los ARN totales obtenidos de este modo, se sintetizaron ADNc usando el kit Advantage RT para PCR (fabricado por Becton, Dickinson and Company de Japón). Para siete tipos de proteínas que son los constituyentes de las fibras elásticas, se examinó la expresión de ARNm de las mismas mediante RT-PCR. Los cebadores usados en esta PCR se muestran en la Tabla 1.

Las secuencias específicas se amplificaron llevando a cabo reacciones de PCR usando Blend Taq-plus (marca registrada) (fabricado por Toyobo Co. Ltd.) y los productos de PCR obtenidos de este modo se verificaron mediante electroforesis. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Este ciclo se repitió 30 veces para DANCE, MFAP-2 y GAPDH y 35 veces para tropoelastina, fibrilina-1, fibrina-1 y EMILINA.

[Tabla 1]

Diana		Secuencia de ADN	Tamaño pronosticado (pb)
Tropoelastina	F	5'AAGCAGCAGCAAAGTTCG3'(SEC ID N°: 1)	287
	R	5'ACCTGGGACAACACTGGAATCC3'(SEC ID N°: 2)	
Fibrilina-1	F	5'GTGAGATCAACATCAATGGAGC3'(SEC ID N°: 3)	180
	R	5'TTACACACTCCTGGGAACACTTC3'(SEC ID N°: 4)	
Fibrina-1	F	5'GATGTCTCCTGGAGGCCTGCTGTG3'(SEC ID N°: 5)	783
	R	5'TTGGGTTCGGCAGCGGAAGGATCCCAG3'(SEC ID N°: 6)	
DANCE	F	5'CGGCACATACTTCTGCTCCT3'(SEC ID N°: 7)	549
	R	5'TCAGAATGGTACTGCGACA3'(SEC ID N°: 8)	
EMILINA	F	5'ATTATGACCAGAGACAGGC3'(SEC ID N°: 9)	290
	R	5'CCGAGTGCGCCAGCTGCCCC3'(SEC ID N°: 10)	
MFAP-2	F	5'ATGAGAGCTGCCTACCTCTTC3'(SEC ID N°: 11)	551
	R	5'CTAGCAGCTCCCACAGCTCCT3'(SEC ID N°: 12)	
GAPDH	F	5'TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC3'(SEC ID N°: 13)	189
	R	5'ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC3'(SEC ID N°: 14)	

Los resultados se mostraron en la Fig. 2A. El Ejemplo de Referencia 1 indicó que la formación de fibras elásticas no se había confirmado en la parte lesionada con queloide. En el presente ensayo se demostró que los ARNm de los constituyentes de fibras elásticas, tales como elastina que es el componente principal de las fibras elásticas, fibrilina-1 y similares, se expresaron en el tejido de queloide a un nivel comparable al del tejido normal. Esto indica que la

5 deficiencia en la formación de fibras elásticas en el tejido de queloide no es el resultado de una reducción en la producción de elastina, fibrilina-1 y similares.

[Ejemplo de Referencia 3] Expresiones de las proteínas de elastina y fibrilina-1 en los tejidos de queloide

10 El Ejemplo de Referencia 2 indicó que los ARNm de elastina y fibrilina-1 se expresaron a un nivel normal en los tejidos de queloide. Posteriormente, las expresiones de elastina y fibrilina-1 a nivel de proteína, así como también la localización de las mismas en la matriz extracelular, se examinó mediante tinción inmunohistoquímica. Los procedimientos de la misma fueron los siguientes.

15 Tinción de elastina: Un tejido de queloide humano se extirpó y fijó en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante 24 horas. El tejido fijado de este modo se incrustó posteriormente en parafina y se preparó un corte de 6 µm a partir del mismo. Después de la desparafinación, se llevó a cabo tinción inmunohistoquímica usando el kit LSAB/HRP (fabricado por Dako Japan, Inc.). Un anticuerpo anti-elastina se usó como el anticuerpo primario (1:100; fabricado por Elastin Products Company, Inc., PR533).

20 Tinción de fibrilina-1: Un tejido de queloide humano se extirpó, el cual posteriormente se incrustó inmediatamente en compuesto OCT y se congeló. Se preparó un corte congelado de 10 µm. El corte obtenido de este modo se bloqueó con Block Ace y posteriormente se permitió que reaccionara con un anticuerpo anti-fibrilina-1 (1:200; fabricado por NeoMarkers Inc.). Se usó anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra Alexa Fluor 546 como el anticuerpo secundario (1:800; fabricado por Molecular Probes, Inc.). Adicionalmente, se llevó a cabo tinción nuclear en las células usando Hoechst (fabricado por Sigma).

30 Los resultados se mostraron en la Fig. 2B. Las partes que se tiñeron mediante tinción de Hoechst indican la localización de los núcleos de las células, es decir, la localización de las células y, presente en los espacios entre las células, la matriz extracelular. En tinción de elastina, aunque las expresiones de elastina (indicada por las flechas) se pueden confirmar dentro de las células, no se observó una imagen teñida fibrosa en la matriz extracelular (como un ejemplo, se indicó una zona de la matriz extracelular con \*). En tinción de fibrilina-1, se observaron imágenes teñidas fibrosas en la matriz extracelular de la misma manera que en la piel normal.

35 Estos resultados indican que, mientras que tanto elastina como fibrilina-1 se producen en las células de la parte lesionada del paciente de queloide, el depósito de elastina a fibrilina-1 no está confirmado en la matriz extracelular y que la formación de fibras elásticas es deficiente. Se cree que, aunque las elastinas producidas se excretan en la matriz extracelular, las mismas se metabolizan y eliminan a partir del tejido de queloide debido a que no se asocian con ni se depositan a fibrilina-1 como fibras elásticas.

40 [Ejemplo de Referencia 4] Análisis de CS acumulados en el tejido de queloide

La cantidad de los CS acumulados se comparó entre el tejido de queloide y la piel normal. Adicionalmente, también se examinaron los tipos de CS acumulados en el tejido de queloide.

45 Los análisis se llevaron a cabo mediante tinción de azul Alcían (pH 2,5) después de la desparafinación de un corte de tejido de queloide (6 µm) y un corte de tejido de piel normal (6 µm) que se obtuvieron de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 3, los cuales se dejaron posteriormente sin tratar o se sometieron a diversos tratamientos de CSasa. El azul Alcían es un colorante que tiñe los GAG en un tejido. Cada una de CSasa-ABC (obtenida a partir de *Proteus vulgaris*, fabricada por Seikagaku Corporation), CSasa-B (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*, fabricada por Seikagaku Corporation) y CSasa-AC (obtenida a partir de *Flavobacterium heparinum*, fabricada por Seikagaku Corporation) se disolvieron en 0,1 mol de tampón Tris-HCl a una concentración de 1 mU/1 µl y después de tratar los cortes de tejido con la solución de enzima preparada a 37 °C durante 2 horas, se tiñeron con solución de azul Alcían (pH 2,5).

55 Los resultados se mostraron en la Fig. 3. Las dos figuras de la izquierda son las fotografías del corte de tejido de queloide sin tratamiento de CSasa (la figura inferior) y el corte de tejido de piel normal sin tratamiento (la figura superior), los cuales se tiñeron con azul Alcían. Se puede observar, en comparación con el tejido de piel normal, que la propiedad de tinción del tejido de queloide es más fuerte y que se acumularon GAG en la matriz extracelular de la parte lesionada con queloide. Mientras tanto, las tres fotografías de la derecha son las de los cortes de tejido de queloide los cuales se tiñeron con azul Alcían después del tratamiento con CSasa-ABC, CSasa-B o CSasa-AC. En comparación con el tejido de queloide (sin tratamiento enzimático) de la fotografía en la parte inferior izquierda, las propiedades de tinción para el azul Alcían se redujeron en todos los tejidos de queloide tratados con enzima. Con respecto al tejido de queloide tratado con CSasa-ABC, se confirmó que la propiedad de tinción se redujo hasta un

65 nivel comparable con el del tejido normal.

[Ejemplo de Referencia 5] Los efectos de CS en la regeneración de fibras elásticas

Los resultados del Ejemplo de Referencia 4 sugirieron que la acumulación excesiva de CS provoca la deficiencia en la formación de fibras elásticas (inhibición de depósito de elastina a fibrilina) en el tejido de queloide. En vista de esto, en un sistema de cultivo *in vitro* (ensayo de elastogénesis), células de queloide obtenidas a partir de un paciente se trataron artificialmente con únicamente uno de CS-A, CS-B y CS-C, o con los CS en combinación y se examinó cuál combinación provocaba de forma principal la deficiencia en la formación de fibras elásticas (inhibición de depósito de elastina en la matriz extracelular).

La placa de cultivo que tiene 13 mm de diámetro se inserta en una placa de cultivo celular de 24 pocillos (fabricada por Iwaki) y células de queloide recogidas a partir de un tejido de queloide humano mediante un método de explante se inocularon en la placa de cultivo a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron en medio DMEM (fabricado por Gibco, Inc.). Los grupos con CS añadido se configuraron con la adición de solo uno de CS-A, CS-B y CS-C, o dos o tres de CS-A, CS-B y CS-C en combinación. Un ml de medio que contiene 400 µg/ml de uno de los anteriores CS-A, CS-B y CS-C, o 400 µg/ml de dos o tres de CS-A, CS-B y CS-C en combinación, se añadió a las células de queloide a un intervalo de 2 días. Además, como un control, las células de queloide se cultivaron sin adición de CS(s) (grupo sin CS). El día 9 de cultivo, la placa de cultivo que tiene las células y la matriz extracelular alrededor de las células se extrajo de la placa de cultivo celular de 24 pocillos y se fijó con metanol al 100% y posteriormente con BSA al 2%. A partir de entonces, se permitió que las células fijadas de ese modo y la matriz reaccionaran con los anticuerpos primarios, anticuerpo anti-elastina (1:100; fabricado por Elastin Products Company, Inc., PR533) y anticuerpo anti-fibrilina-1 (1:200; fabricado por Elastin Products Company, Inc., PR217). Se usó anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra Alexa Fluor 546 (1:200; fabricado por Molecular Probes, Inc.) como el anticuerpo secundario y se llevó a cabo tinción nuclear en las células usando Hoechst (fabricado por Sigma). Posteriormente, las células teñidas de este modo y la matriz se observaron bajo un sistema de microscopio de barrido láser confocal (fabricado por Nikon Corporation, Digital Eclipse C1si) y se obtuvieron imágenes de las células teñidas y la matriz. Posteriormente, las imágenes de tinción de elastina obtenidas de este modo se analizaron usando un software de análisis de imágenes (Image pro). Las imágenes se sometieron a inversión de imagen y escala de grises. El rango de imagen se seleccionó mientras se comparaba con imágenes de tinción nuclear, de forma que se pudieran extraer las zonas teñidas que no contienen las regiones de núcleos teñidos. Las zonas de partes teñidas con elastina en la matriz se midieron. Los valores obtenidos de este modo se indicaron en % relativo, tomando el valor para el grupo sin CS como el 100%.

Las fotografías de tinción de elastina y tinción de fibrilina-1 del grupo sin CS se mostraron en la Fig. 4. Las partes elípticas teñidas indican las partes de los núcleos de las células teñidas mediante tinción de Hoechst, es decir, la localización de las células, mientras que los espacios entre las células indican las partes de matriz extracelular. El depósito de elastina en la matriz extracelular (fotografía de la izquierda: indicada mediante flechas blancas) y las estructuras de fibra de fibrilina-1 (fotografía de la derecha: indicada mediante flechas blancas) se confirmaron para el grupo sin CS. Las imágenes de todos los grupos con CS añadido se analizaron usando el software de análisis de imágenes y los resultados de las mismas se mostraron en un gráfico y tabla (Fig. 5 y Tabla 2). En esos grupos en los que se añadieron a las células únicamente uno de CS-A, CS-B y CS-C o dos de CS-A, CS-B y CS-C en combinación, se observó un efecto ligeramente más inhibitorio sobre el depósito de elastinas fibrosas en la matriz extracelular en comparación con el grupo sin CS y el efecto inhibitorio más fuerte sobre el depósito de elastinas fibrosas se observó en el grupo en el que se añadieron a las células tres tipos de CS, CS-A, CS-B y CS-C, de forma simultánea. Es decir, indicó que la acción inhibitoria más importante de la formación de fibras elásticas se induce cuando se permite que estos tres tipos de CS coexistan.

[Tabla 2] La cantidad de depósito de elastina en la matriz extracelular en el momento de adición de diversos CS (%)

	Sin CS	CS-A	CS-B	CS-C	CS-A CS-B	CS-A CS-C	CS-B CS-C	CS-A CS-B CS-C
% frente a sin CS	100	87,0	95,9	86,7	66,3	67,4	91,0	37,6

[Ejemplo 1] Los efectos de CSasa-ABC sobre la formación de fibras elásticas (regeneración) en tejido lesionado de queloide implantado

Los resultados del Ejemplo de Referencia 4 sugirieron que los CS acumulados en los tejidos de queloide se degradan de forma más eficaz mediante CSasa-ABC. Además, los resultados del Ejemplo de Referencia 5 sugirieron que la inhibición más fuerte de la formación de fibras elásticas se induce cuando todos los CS-A, CS-B y CS-C coexisten. En vista de éstos, se seleccionó una CSasa-ABC capaz de degradar los tres tipos de CS y se investigaron los efectos terapéuticos de la misma *in vivo* (en un tejido lesionado de queloide implantado). Es decir, se investigaron los efectos de la enzima seleccionada sobre la formación de fibras elásticas (regeneración) y el tamaño del tejido de queloide.

La Fig. 6A muestra las fotografías de la muestra de ensayo histopatológica del corte de tejido tomado a partir de un paciente de queloide (los síntomas clínicos eran graves) que se usó en el implante. La figura de la derecha es una ampliación de la parte indicada con un círculo en la figura de la izquierda. Los fibroblastos grandes y brillantes son células de queloide, las cuales son numerosas (indicadas mediante flechas blancas) y los haces de fibras de colágeno hialinizados intrincados son prominentemente visibles (indicados mediante flechas negras). El tejido tiene deficiencia de fibras elásticas. En las figuras, no se pueden encontrar características de una piel normal en el tejido de queloide. Se tomaron tejidos de queloide de 5 mm cuadrados a partir del tejido lesionado mostrado en la Fig. 6A, y se implantaron en dos sitios en la espalda de un ratón inmunodeficiente (macho de 6 semanas de edad c57 balb nu/nu (preparado por Japan SLC, Inc.)). Tras la confirmación del injerto, 8 días después del implante y 18 días después del implante, 10  $\mu$ l de 50 mU/10  $\mu$ l de condroitinasa ABC (obtenida a partir de *Proteus vulgaris*, fabricada por Seikagaku Corporation) disueltos en tampón Tris 0,1 M se inyectaron en uno de los cortes de tejido (el sitio de implante del lado derecho). 10  $\mu$ l de tampón Tris 0,1 M se inyectaron por vía tópica en el otro corte de tejido implantado (el sitio de implante del lado izquierdo) como un control. Los tamaños de los cortes de tejido se observaron visualmente y se tomaron fotografías de los mismos 35 días después del implante.

De la misma manera en que se ha descrito en lo anterior, se tomaron tejidos de queloide de 5 mm cuadrados a partir del mismo tejido lesionado y se implantaron en la espalda de un ratón inmunodeficiente. Tras la confirmación del injerto, 7 días, 14 días y 21 días después del implante, 10  $\mu$ l de 50 mU/10  $\mu$ l de condroitinasa ABC disueltos en tampón Tris 0,1 M se inyectaron en uno de los tejidos implantados. 10  $\mu$ l de tampón Tris 0,1 M se inyectaron por vía tópica en los otros tejidos implantados como un control. Los tejidos implantados se tomaron a partir de los ratones 35 días después del implante (6 semanas después del inicio del experimento) y se sometieron a análisis histológico. Después de fijar el tejido en paraformaldehído al 4% a 4 °C durante 24 horas, se prepararon bloques de parafina. A partir de los mismos, se preparó un corte de 3  $\mu$ m a partir de cada bloque de parafina y después de la desparafinación, se llevó a cabo tinción de Elástica-van Gieson (EVG) en el corte. A partir de entonces, se observó el aspecto del tejido de la piel del sitio de implante en el corte bajo un microscopio.

La Fig. 6B muestra las fotografías los tejidos de piel de los sitios de implante inmediatamente después del implante del tejido de queloide en el ratón inmunodeficiente y 4 semanas después del implante.

La fotografía de la izquierda muestra la condición inmediatamente después del implante del corte de tejido de queloide, mientras que la fotografía de la derecha se tomó 35 días después del implante. En la fotografía de la derecha, el sitio de implante en la izquierda es el tejido de queloide al que se inyectó el tampón (control), mientras que el implante en la derecha es el tejido de queloide al que se inyectó CSasa-ABC. Como se puede observar a partir de la fotografía, el tejido de queloide en la derecha se redujo de forma considerable mediante la inyección de CSasa-ABC, en comparación con el tejido implantado al que se inyectó el tampón.

La Fig. 6C muestra las fotografías de la tinción de EVG en los cortes de tejido de queloide preparados a partir del tejido implantado 35 días después del implante, a los cuales se inyectó tampón o CSasa-ABC.

De acuerdo con los resultados, la formación de fibras elásticas no se observó en absoluto en el tejido del grupo al que se inyectó tampón con la mayoría de las partes del tejido aún hialinizado, mientras que la formación de fibras elásticas, las cuales se tiñeron de negro (indicadas mediante flechas negras), se pudo observar a lo largo de una zona grande en el tejido del grupo al que se inyectó CSasa-ABC, confirmando de este modo que las formaciones de fibra elásticas se estaban regenerando. Adicionalmente, la condición de los haces de fibras de colágeno, los cuales se tiñeron de rojo (indicados mediante flechas blancas), se volvió una condición similar a la del tejido de piel normal y la hialinización desapareció.

A partir de lo anterior, se confirmó que la inyección de CSasa-ABC inducía la regeneración de fibras elásticas, la desaparición de haces de fibras de colágeno intrincados e hialinización, así como también reducción considerable en el volumen del tejido de queloide, demostrando de ese modo la idea inicial de los inventores de que la inyección de CSasa-ABC puede ser un agente terapéutico radical para queloides, que tiene la regeneración de fibras elásticas como su mecanismo.

[Ejemplo 2] La comparación de los efectos terapéuticos de CSasa-ABC, CSasa-B y CSasa-AC

Los efectos terapéuticos de CSasa-ABC, CSasa-B y CSasa-AC se compararon de la misma manera que en el Ejemplo 1. Cada de una de CSasa-ABC, CSasa-B y CSasa-AC se disolvieron en 0,1 mol de tampón Tris-HCl a una concentración de 50 mU/10  $\mu$ l y cada una de las soluciones obtenidas de este modo se inyectó en el tejido implantado a una cantidad de 10  $\mu$ l. La Fig. 7A muestra las fotografías de la muestra de ensayo histopatológica de la parte lesionada de un paciente de queloide (los síntomas clínicos eran moderados) a partir del cual se recogieron los cortes implantados. La figura de la derecha es una ampliación de la parte indicada con un círculo en la figura de la izquierda. El número de células de queloide (indicadas mediante flechas blancas) es mayor; sin embargo, el grado de hialinización de colágenos es menor en comparación con el Ejemplo 1 (Fig. 6A). El tejido tiene deficiencia de fibras elásticas y no se observa una región normal en la figura de la derecha. La Fig. 7B muestra las fotografías de un lado de la espalda de los ratones en los que se implantaron los tejidos de queloide obtenidos a partir del paciente.

Desde la izquierda en Fig.7B, se inyectó tampón, CSasa-ABC, CSasa-B o CSasa-AC en los tejidos una vez a la semana para un total de tres veces después del injerto. Las fotografías se tomaron el día 35 después del implante. Se observó una reducción considerable en el tamaño del tejido implantado para el tejido al que se inyectó CSasa-ABC, y el tejido de queloide se aplanó hasta un grado tal que el tejido de queloide no se puede diferenciar de la piel del ratón. Se observó una reducción en el tamaño del corte de tejido implantado para el tejido al que se inyectó CSasa-B, mientras que difícilmente se observó una reducción en el tamaño del tejido implantado para el tejido al que se inyectó CSasa-AC.

Se llevó a cabo el mismo examen histológico que en el Ejemplo 1 con el fin de confirmar si la imagen del tejido implantado después de la inyección de CSasa-ABC había alcanzado una imagen histopatológica igual a la de un tejido normal, es decir, si se podía observar la regeneración de fibras elásticas y la desaparición de haces de colágeno intrincados e hialinización. Durante la comparación, se llevó a cabo el mismo examen histológico para los ratones a los que se inyectó tampón, CSasa-B o CSasa-AC (Fig. 8). Las zonas del tejido de queloide restante se encerraron en un círculo en la fila superior. Con el fin de calcular los valores relativos de las zonas de tejido de queloide humano restante de los casos en los que se inyectó CSasa-B, CSasa-AC o CSasa-ABC con respecto a los del caso en el que se inyectó el tampón, las zonas del tejido de queloide restante (las zonas dentro de los círculos) se midieron usando Image-Pro Express J5.1. En comparación con el caso de inyección de tampón, se observó una reducción ligera en la zona del tejido de queloide restante humano para el caso de inyección de CSasa-B, mientras que se observó una reducción en la zona de aproximadamente la mitad en la zona para el caso de inyección de CSasa-AC y se observó una reducción considerable en la zona para el caso de inyección de CSasa-ABC. El resultado para el caso de inyección de CSasa-ABC fue coherente con el de la inspección visual de la Fig. 7B. Con el fin de mostrar el grado de regeneración de fibras elásticas y la condición de hialinización, la fila intermedia de la Fig. 8 muestra las fotografías del tejido, las cuales son ampliaciones de cada una de las partes encerradas en un círculo en la fila superior.

Se observa un alto grado de hialinización y muchas fibras de colágeno intrincadas (indicado mediante flechas negras) para los ratones a los que se inyectó tampón, CSasa-B o CSasa-AC. Sin embargo, para el ratón con inyección de CSasa-ABC, no se observan hialinización ni fibras de colágeno intrincadas y se observa la regeneración definitiva de las fibras elásticas (indicada mediante flechas blancas). Se especula que la razón por la cual no se observó la regeneración de fibras elásticas a lo largo de todo el tejido en comparación con los resultados del ratón al que se inyectó CSasa-ABC en el Ejemplo 1 se debe a que el tejido de queloide comenzó a asimilarse en el tejido del ratón desnudo después de normalizarse. Es ya conocido que la formación de fibras elásticas tiene un contenido bajo en la piel de un ratón desnudo. No se observó formación de fibras elásticas definitiva en los ratones a los que se inyectó CSasa-B o CSasa-AC. Las estructuras que se observan de color profundo en el centro de la fotografía del tejido del ratón al que se inyectó CSasa-B en la fila intermedia no son fibras elásticas, sino haces de colágeno intrincados (teñidos de rojo). En la fila inferior, las fotografías se ampliaron adicionalmente para mostrar la condición de las células de queloide (tinción de HE). Esas células, que son más grandes que un fibroblasto humano normal y cuyo núcleo se encuentra aumentado y teñido de color brillante, son células de queloide (indicadas por flechas). En los tejidos en los que se inyectó tampón, CSasa-B o CSasa-AC, se observaron muchas células de queloide; sin embargo, las células de queloide se eliminaron del tejido en el que se inyectó CSasa-ABC (todas las células eran fibroblastos normales). El número de las células de queloide en un campo de visualización se contó tres veces para calcular el promedio. Tomando el caso de inyección de tampón como el 100%, los valores relativos de cada caso se indicaron en %. Los resultados descritos anteriormente se resumieron en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Sustancia administrada	Área relativa de tejido de queloide restante humano (% frente a Tampón)	Formación de fibras elásticas	Hialinización	Haces de fibras de colágeno intrincados	El número de células de queloide (% frente a Tampón)
Tampón	100	Ausente	Presente	Presente	100
CSasa-AC	52	Ausente	Presente	Presente	91
CSasa-B	78	Ausente	Presente	Presente	53
CSasa-ABC	26	Próximo a normal	Ausente	Ausente	0
Región normal	-	Normal	Ausente	Ausente	-

Como se ha podido observar a partir de los resultados de la inyección de CSasa-AC e inyección de CSasa-B en la Tabla 3, se observó que una reducción en el tamaño del tejido de queloide no estaba directamente relacionada con una reducción en el número de fibroblastos humanos (células de queloide). Adicionalmente, en el caso de inyección de CSasa-ABC, ya que la condición del tejido alcanzó la regeneración de fibras elásticas, la desaparición de haces de colágeno intrincados e hialinización y la desaparición de células de queloide, se confirmó que los efectos terapéuticos de CSasa-ABC son excepcionalmente superiores los de otras CSasas.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Mediante la presente invención, se proporciona un agente de promoción de formación de fibras elásticas que contiene una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C, así como también un agente terapéutico radical para  
 5 queloides y/o cicatrices hipertróficas que contiene una enzima que degrada CS-A, CS-B y CS-C. Los agentes anteriores tienen la acción de promover la regeneración de fibras elásticas en queloides y/o cicatrices hipertróficas, la normalización de haces de fibras de colágeno y la normalización de tejidos lesionados; por lo tanto, estos agentes conducen a un tratamiento radical. Mediante estos agentes, se pueden tratar de forma completa queloides y/o  
 10 cicatrices hipertróficas sin ninguna posibilidad de reaparición de los mismos lo cual es frecuente en un tratamiento convencional con un agente esteroide.

El agente terapéutico de acuerdo con la presente invención puede, a una dosis baja, tratar de forma completa queloide y cicatriz hipertrófica, sobre los cuales no se obtuvieron efectos clínicos suficientes mediante un método de  
 15 tratamiento o agente terapéutico convencional. Adicionalmente, se puede usar de forma amplia como un agente terapéutico que no produce efectos secundarios graves.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Shigehiko SUZUKI
- <120> Agente terapéutico radical para queloide y cicatriz hipertrófica
- <130> F200805C8358
- 25 <150> JP2007-317294
- <151> 07-12-2007
- <160> 14
- 30 <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> cebador directo de tropoelastina
- <400> 1
- aagcagcagc aaagttcg 18
- 40 <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> cebador inverso de tropoelastina
- <400> 2
- 50 acctgggaca actggaatcc 20
- <210> 3
- <211> 22
- <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador directo de fibrilina-1
- 60 <400> 3
- gtgagatcaa catcaatgga gc 22
- <210> 4
- <211> 23
- 65 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador inverso de fibrilina-1  
  
 <400> 4  
 5 ttacacactc ctgggaacac ttc 23  
  
 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de fibrina-1  
  
 <400> 5  
 15 gatgtcctcc tggaggcctg ctgtg 25  
  
 <210> 6  
 <211> 26  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso de fibrina-1  
 25  
 <400> 6  
 ttgggtcggc agcggaagga tcccag 26  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de DANCE  
 35  
 <400> 7  
 cggcacatac ttctgtctct 20  
  
 <210> 8  
 <211> 20  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso de DANCE  
 45  
 <400> 8  
 50 tcagaatggg tactgcgaca 20  
  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> cebador directo de EMILINA  
  
 <400> 9  
 60 attatgacca gagacaggc 19  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador inverso de EMILINA  
  
 <400> 10  
 5 ccgagtgcgc cagctgcccc20  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de MFAP-2  
  
 <400> 11  
 15 atgagagctg cctacctctt c 21  
  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso de MFAP-2  
 25  
 <400> 12  
 ctagcagctc ccacagctcc t 21  
  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de GAPDH  
  
 <400> 13  
 35 tggatcgtg gaaggactca tgac 24  
  
 <210> 14  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso de GAPDH  
  
 <400> 14  
 45 atgccagtga gctcccgtt cagc 24  
 50

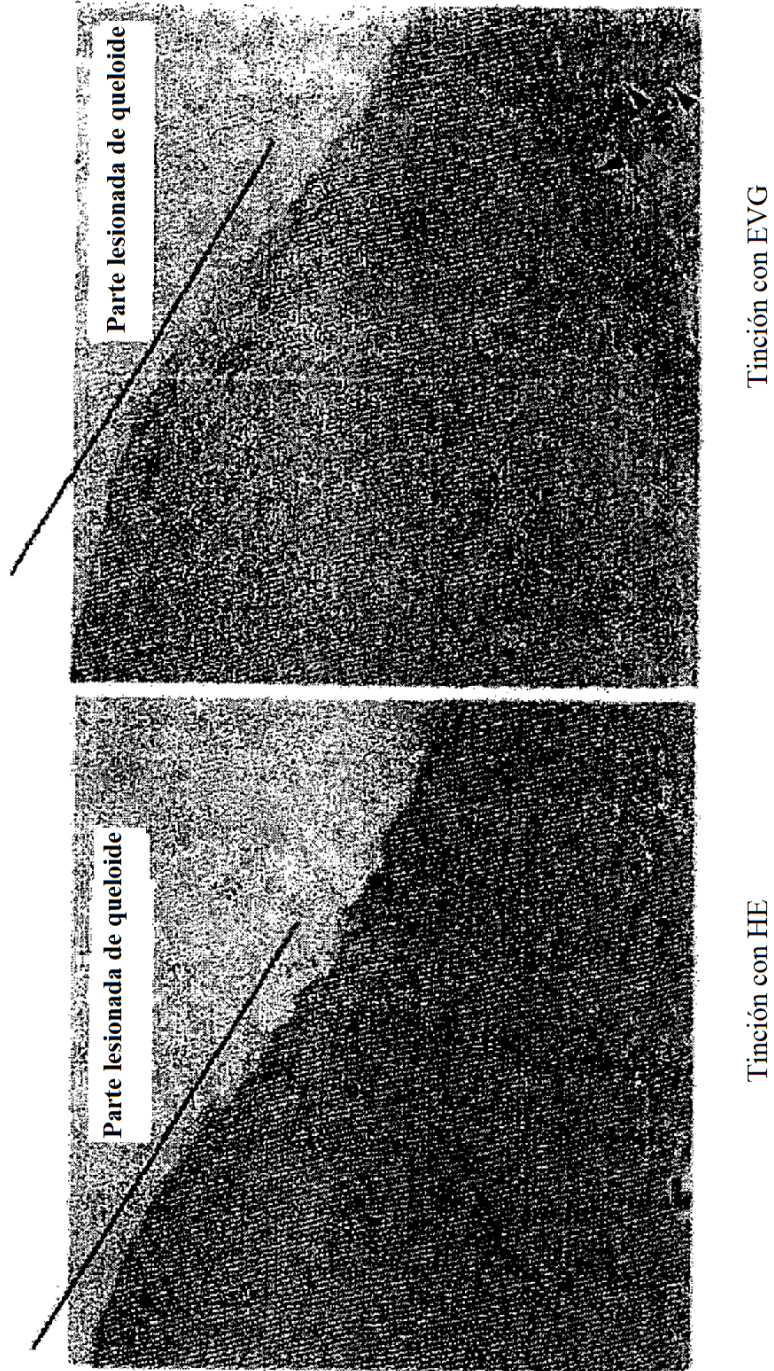


**REIVINDICACIONES**

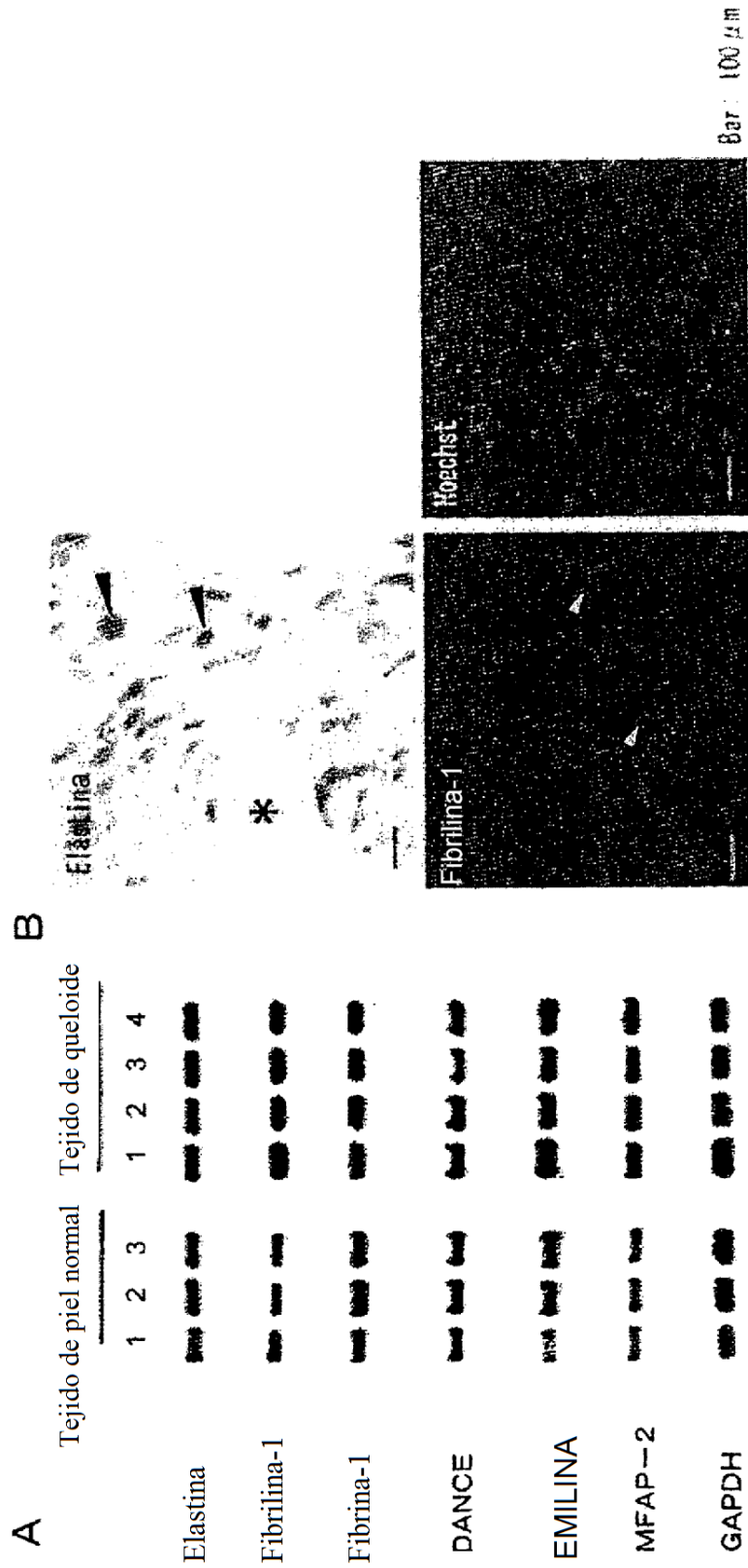
1. Uso *in vitro* de condroitinasa ABC para promover formación de fibras elásticas.
- 5 2. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha condroitinasa ABC se obtiene a partir de *Proteus vulgaris*.
3. Condroitinasa ABC para su uso en el tratamiento radical de queloides y/o cicatrices hipertróficas.
- 10 4. La condroitinasa ABC para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** dicha enzima promueve una asociación entre elastina y fibrilina.
5. La condroitinasa ABC para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada por que** la condroitinasa ABC se obtiene a partir de *Proteus vulgaris*.

15

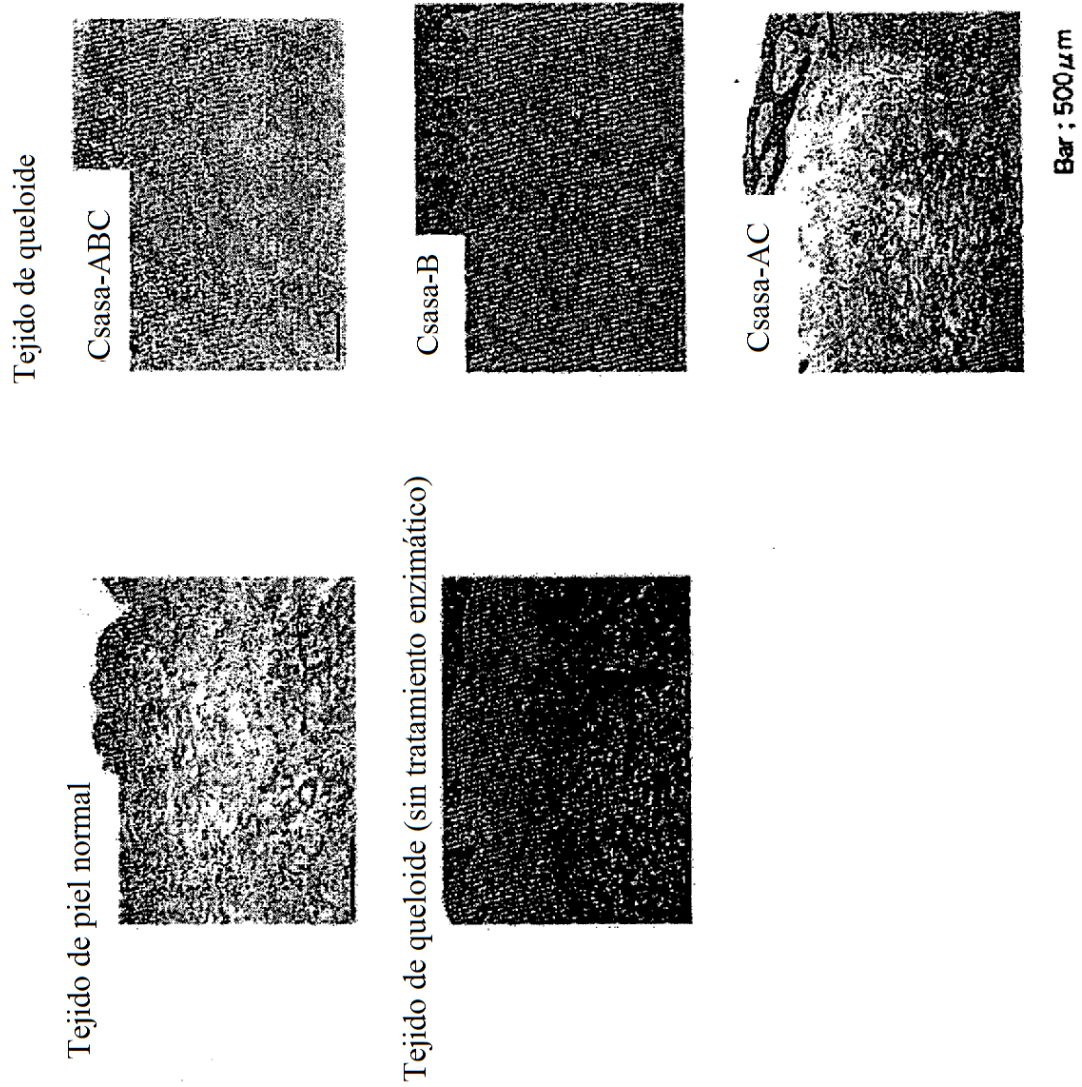
[Fig. 1]



[Fig. 2]



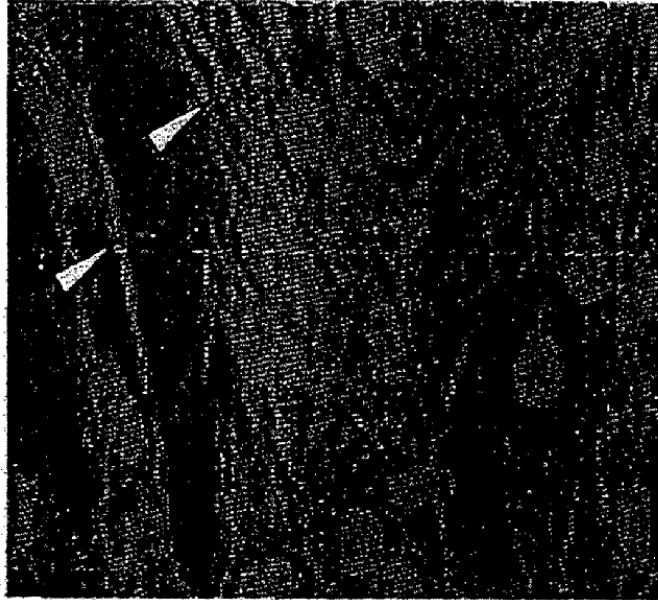
[Fig. 3]



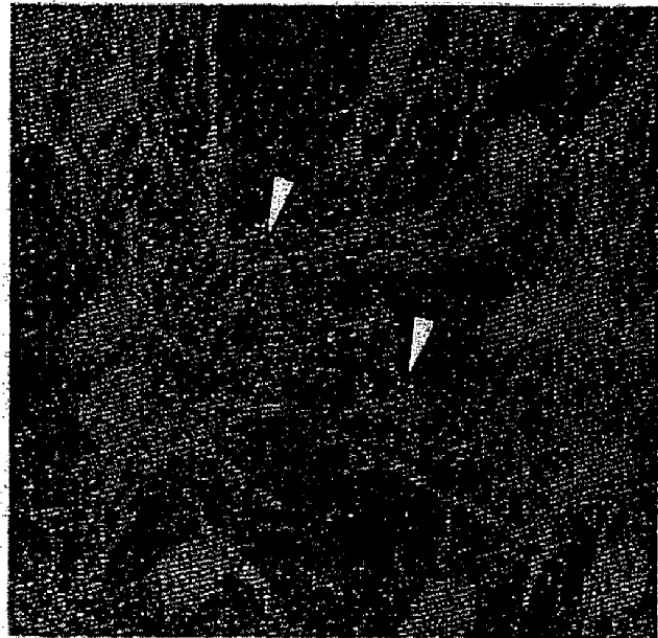
[Fig. 4]

Sin CS

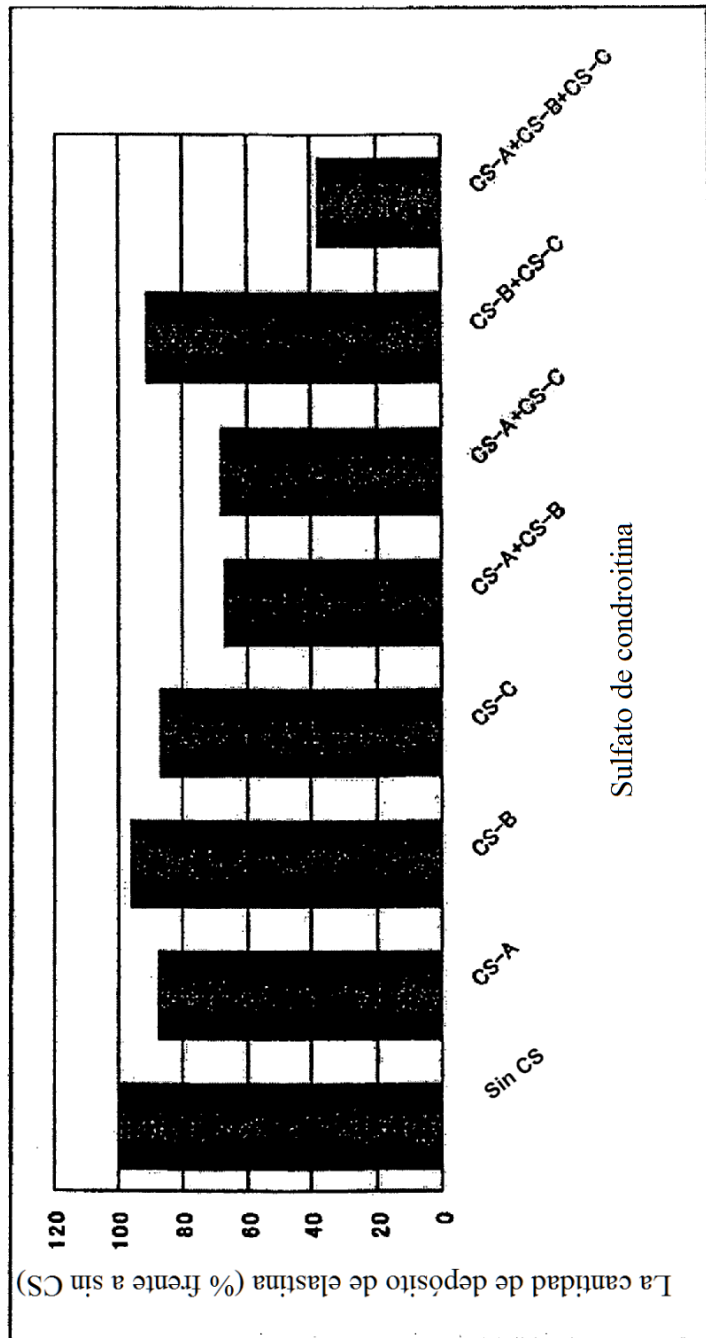
Fibrilina-1



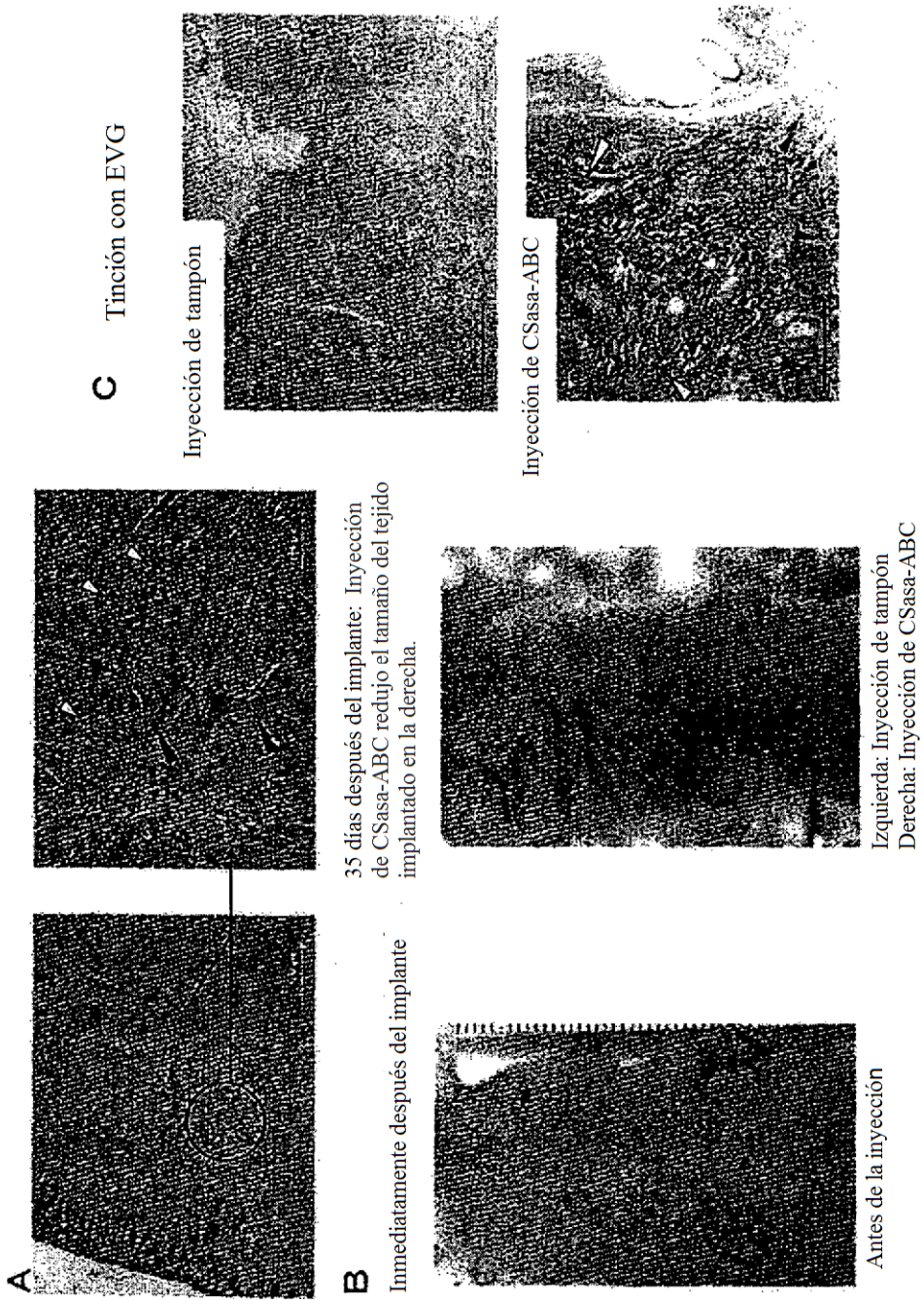
Elastina



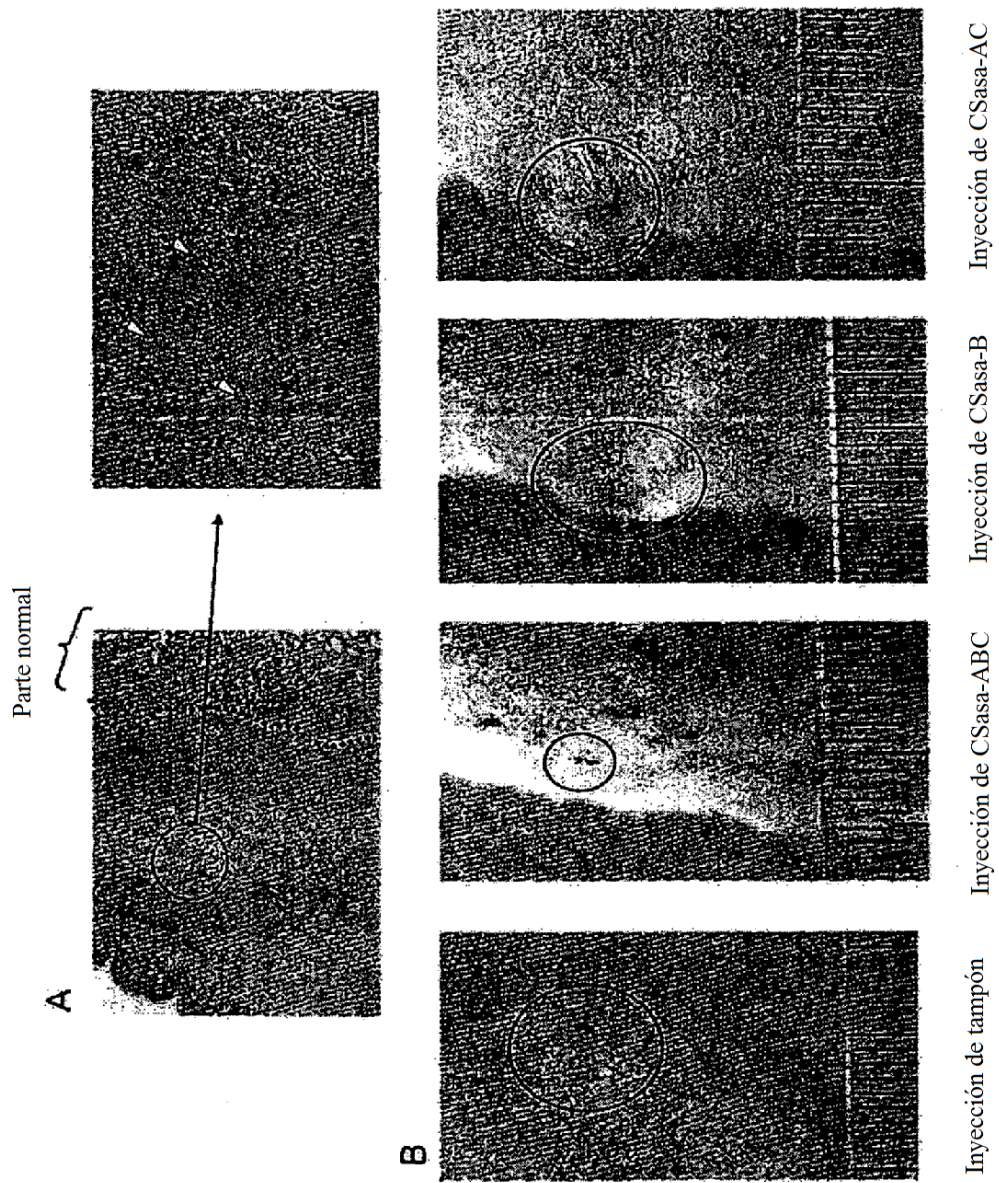
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]





[Fig. 8]

