

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 381**

51 Int. Cl.:

C07K 7/56 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2011** **E 11705798 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2523968**

54 Título: **Péptidos cíclicos para la regulación de canales iónicos vectoriales**

30 Prioridad:

14.01.2010 AT 412010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2014

73 Titular/es:

**APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG
GMBH (100.0%)
Mariahilferstrasse 136, Top 1.15
1150 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD;
LUCAS, RUDOLF y
TZOTZOS, SUSAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 525 381 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

Péptidos cíclicos para la regulación de canales iónicos vectoriales

- 5 La invención se refiere a compuestos orgánicos y composiciones farmacéuticas de los mismos, que son adecuados para la regulación de canales iónicos vectoriales, de enfermedades que se asocian con la función pulmonar y para el tratamiento de edemas.

Estado de la técnica

- 10 El transporte de líquidos a través de capas de células y tejidos se basa principalmente en un gradiente osmótico mediante un transporte iónico vectorial, por ejemplo, transporte de sodio. Esto se realiza principalmente mediante canales iónicos fuertemente regulados y vitalmente significativos, como por ejemplo, el complejo del canal de sodio epitelial (ENaC) (Ware L.B. y Matthey M.A. New England J Med 2001; 342/18: 1334-1359. Matthey et al., Am J
15 Physiol 1996; 270:L487-L503; Berthiaume Y. y Matthey MA. Respiratory Physiology & Neurobiology 159 (2007) 350-359). El agua sigue este gradiente pasivamente, entre otros a través de canales de agua especiales, como el canal de agua acuaporina V. Por tanto, una regulación médica del transporte iónico vectorial a través de células y tejidos produce la posibilidad de regular el contenido en líquido de tejidos, así como el tratamiento preventivo o terapéutico de enfermedades que están ligadas a una acumulación de líquido en el tejido.

- 20 Cuando se menciona un edema, se quiere decir una acumulación patológica de líquido en un órgano, como por ejemplo, los pulmones, pero también el cerebro o la piel. Mediante un edema de los pulmones se quiere decir un edema pulmonar. El edema pulmonar se basa principalmente en el desequilibrio entre extravasación de líquido y resorción de líquido. Con mucha frecuencia también está dañada la permeabilidad del tejido pulmonar, de modo que
25 tiene lugar un suministro de líquido aumentado, y el líquido se acumula en los alveolos pulmonares.

- El edema pulmonar como consecuencia de una falta de transporte de retorno de líquido de los alveolos pulmonares en el intersticio es particularmente significativo en la lesión pulmonar aguda (LPA), en el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), en el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), en neumonía, en gripe y otras
30 enfermedades pulmonares causadas por bacterias o virus. Sin embargo, el edema pulmonar también desempeña un papel importante en otras enfermedades pulmonares, como los daños pulmonares inducidos por respiración artificial, trasplantes de pulmones, daños pulmonares asociados con transfusión, administración terapéutica de IL-2 o asma.

- Como resultado de una acumulación de líquido aumentada en el tejido u órgano, por ejemplo, los pulmones, el necesario intercambio de gas se dificulta o limita por completo. Nada del oxígeno del aire de respiración llega a la sangre, de modo que se pueden producir daños a órganos potencialmente mortales debido a la falta de oxígeno.

- Lucas y col (Lucas R et al. Science 1994, 263: 814) describen un péptido derivado de la región Ser(99) a Glu(116) del factor de necrosis tumoral, que puede regular el contenido en líquido de los alveolos pulmonares. Este péptido
40 con la secuencia CGQRETPEGAEPWYC es también el objeto del documento WO00/09149.

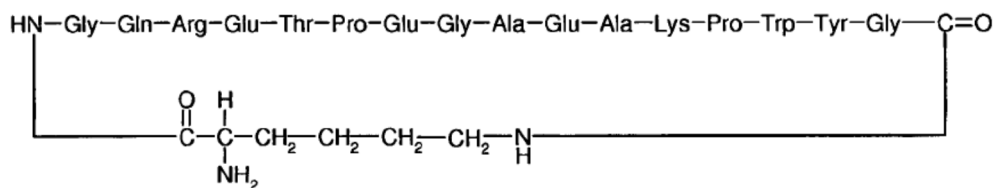
- También un péptido para la regulación del contenido en líquido de los alveolos con la secuencia CGTKPIELGPDEPKAVC se incluye en el documento EP 2 009 023, y un péptido con la secuencia LSPGQRETPEGAEPWYE se incluye en el documento WO2009/073909.

- 45 Hasta ahora no hay ninguna terapia o tratamiento selectivo y medicamento utilizable para la regulación de los canales iónicos vectoriales en células y tejidos, en particular para la regulación de canales iónicos vectoriales del tejido pulmonar. Hasta ahora tampoco hay ninguna terapia selectiva para la regulación del transporte de iones vectorial de los pulmones en particular para el tratamiento del edema pulmonar. En general se intenta dar a los
50 pacientes con un edema pulmonar respiración artificial para asegurar el suministro de oxígeno en la sangre y por tanto a los órganos.

- Por tanto, la presente invención tiene como objeto proporcionar sustancias orgánicas y bioactivas que sean adecuadas para la activación vectorial de los canales iónicos. En particular es el objeto de la presente invención
55 proporcionar tales sustancias orgánicas y bioactivas, que se pueden usar para la activación de canales iónicos de sodio epiteliales de los pulmones y para el tratamiento selectivo del edema pulmonar.

- Sorprendentemente se han encontrado ahora compuestos orgánicos, que son adecuados para resolver el problema que se ha planteado.

- 60 En un aspecto la presente invención proporciona un compuesto orgánico cíclico que comprende la secuencia de aminoácidos GQRETPEGAEPWY además de uno o dos aminoácidos más, y que se caracteriza en que no dispone de grupo carboxilo C-terminalmente y/o grupo amino N-terminalmente, en donde uno de los aminoácidos es un aminoácido no natural, seleccionado de ornitina o un omega-aminoácido, y en donde el cierre del anillo se forma entre una cadena lateral de un aminoácido con el extremo C de otro aminoácido, o el cierre del anillo se alcanza por
65 medio de un aminoácido no natural; o el compuesto cíclico orgánico es un compuesto de la SEQ ID NO: 1



Un compuesto orgánico, cíclico, o los compuestos orgánicos cíclicos, que se proporcionan según la invención, también se denominan en esta solicitud como "compuesto(s) según la presente invención".

Un compuesto según la presente invención incluye un compuesto en cualquier forma, por ejemplo, en forma libre y en forma de cocristales, por ejemplo, en forma de una sal, o en forma de un solvato, o en forma de una sal y un solvato.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención en forma de una sal.

Preferiblemente tales sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables, aunque se incluyen sales farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo, con el fin de producir, aislar, purificar un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye una sal de un compuesto de la presente invención con ácido trifluoroacético, que por ejemplo se puede producir, en la producción de un compuesto de la presente invención.

Un compuesto de la presente invención en forma de una sal incluye una sal metálica o una sal de adición ácida. Las sales metálicas incluyen, por ejemplo sales alcalinas o alcalinotérreas, las sales de adición ácida una sal de un compuesto según la presente invención con un ácido.

Un compuesto según la presente invención en forma libre, opcionalmente en forma de un solvato, se puede convertir en un compuesto adecuado en forma de una sal, en forma de no solvato o en forma de un solvato, y viceversa.

En compuestos según la presente invención sorprendentemente determinadas secuencias de aminoácidos en combinación con cierres de anillo desconocidos hasta ahora en péptidos y con la formación de enlaces amida intermoleculares desconocidos hasta ahora en péptidos producen compuestos orgánicos cíclicos, en donde tales compuestos pueden regular de forma totalmente inesperada canales iónicos vectoriales en células y tejidos, por ejemplo, los compuestos de la presente invención pueden regular el complejo del canal de sodio epitelial, y eso parcialmente en mayor medida que péptidos previamente conocidos pero diferentes estructuralmente.

Se ha puesto de manifiesto sorprendentemente que un compuesto según la presente invención contiene la secuencia de aminoácidos GQRETPEGAEAKPWY.

El aminoácido no natural en un compuesto según la presente invención preferiblemente se selecciona de ornitina o un omega-aminoácido, en particular un ácido omega-amino-alcanoico de (C_{3-8}), especialmente de ácido 3-amino-propanoico, ácido gamma-aminobutírico, ácido 5-amino-pentanoico, ácido 6-amino-hexanoico y ácido 7-amino-heptanoico, especialmente el aminoácido no natural está unido a través de enlaces amida.

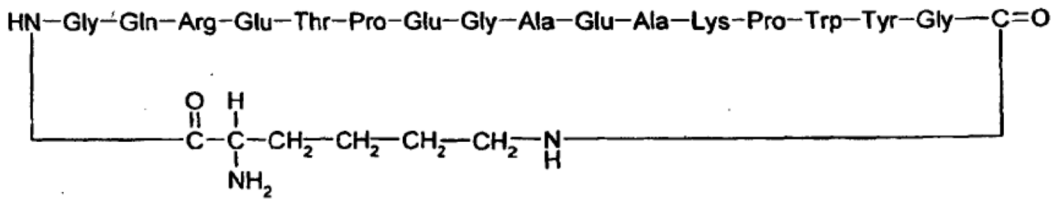
En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención, en el que el aminoácido no natural se selecciona de ornitina o un omega-aminoácido; en particular el aminoácido no natural está unido a través de enlaces amida.

En un compuesto según la presente invención preferiblemente el cierre del anillo se forma entre una cadena lateral de un aminoácido con el extremo C de otro aminoácido, especialmente entre una cadena lateral de ornitina o lisina con el extremo C de un aminoácido natural, en particular una glicina.

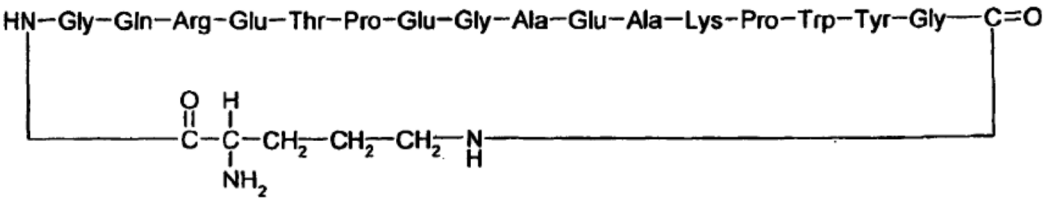
En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención, que se caracteriza en que el cierre del anillo se forma entre una cadena lateral de un aminoácido con el extremo C de otro aminoácido.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención con la secuencia de aminoácidos

SEQ ID NO: 1

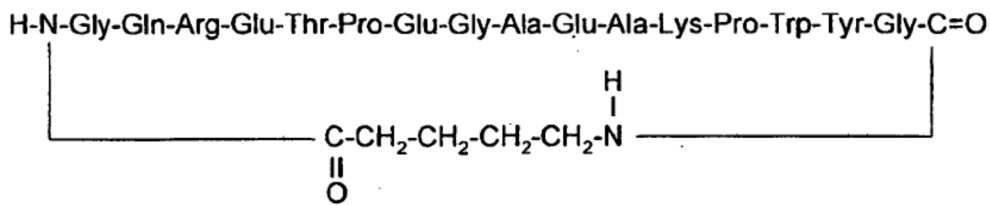


SEQ ID NO: 2

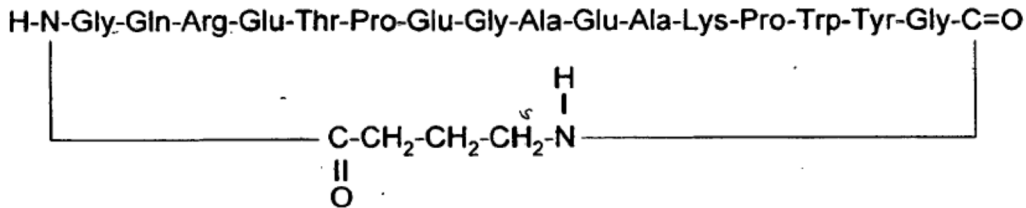


5

SEQ ID NO: 3

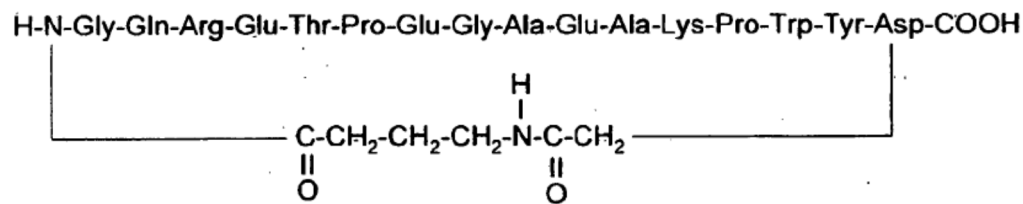


SEQ ID NO: 4



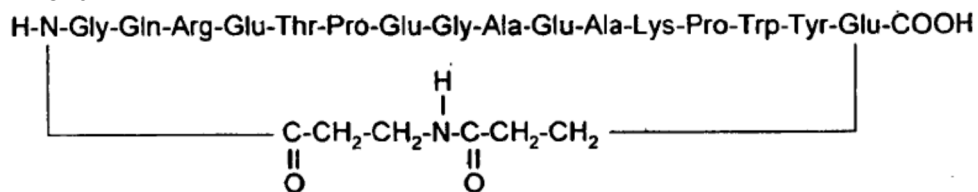
10

SEQ ID NO: 5

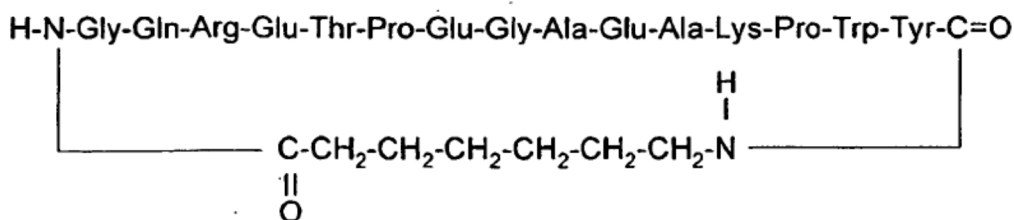


15

SEQ ID NO: 6

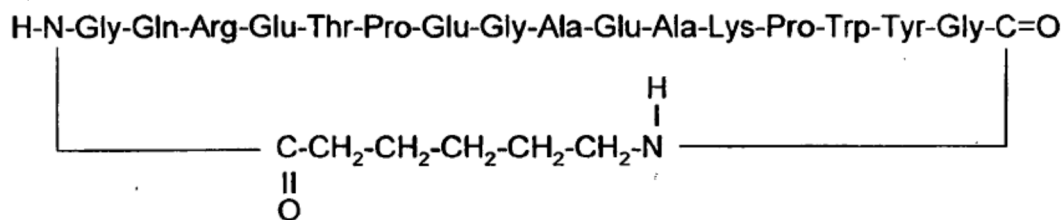


SEQ ID NO: 7



y

SEQ ID NO: 8



En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO: 1 {[KGQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo Képsilón1-G17)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal glicina (G) hasta el aminoácido N-terminal lisina (K) están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido N-terminal lisina (K) está unido con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo épsilon-amino de la cadena lateral de la lisina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:2 {[ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo Orn-delta1-G17)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal glicina (G) hasta el aminoácido N-terminal ornitina (Orn) están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido N-terminal ornitina (Orn) está unido con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo delta-amino de la cadena lateral de la ornitina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:3 {[ácido 5-amino-pentanoico-GQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo 1-17)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal glicina (G) hasta el aminoácido N-terminal glicina (G) están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido N-terminal glicina (G) está unido con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 5-aminopentanoico, por un lado, y mediante un enlace amida entre el nitrógeno del grupo 5-amino del ácido 5-aminopentanoico y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:4 {[ácido gamma-aminobutírico-GQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo 1-17)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal glicina (G) hasta el aminoácido N-terminal glicina (G) están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido C-terminal glicina (G) está unido con el aminoácido N-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal con el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido gamma-aminobutírico, por un lado, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido gamma-aminobutírico con el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:5 {[ácido gamma-aminobutírico-GQRETPEGAEAKPWYD-OH] (ciclo 1-Dγ17)} los aminoácidos desde el ácido aspártico (D) C-terminal hasta el aminoácido N-terminal glicina están peptídicamente unidos, mientras que el ácido aspártico (D) C-terminal está unido con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal con el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido gamma-aminobutírico, por un lado, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido gamma-aminobutírico con el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:6 {[ácido 3-aminopropanoico-GQRETPEGAEAKPWYE-OH] (ciclo 1-Eδ17)} los aminoácidos desde el ácido glutámico (E) C-terminal hasta el aminoácido N-terminal glicina están peptídicamente unidos, mientras que el ácido glutámico (E) C-terminal está unido con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal con el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 3-aminopropanoico, por un lado, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 3-aminopropanoico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:7 {[ácido 7-amino-heptanoico-GQRETPEGAEAKPW] (ciclo 1-16)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal tirosina hasta el aminoácido N-terminal glicina están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido C-terminal tirosina está unido con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 7-aminoheptanoico, por un lado, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 7-aminoheptanoico y el carbono del grupo carboxilo de la tirosina C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

En un compuesto con la secuencia SEQ ID NO:8 {[ácido 6-amino-hexanoico-GQRETPEGAEAKPWG] (ciclo 1-17)} los aminoácidos desde el aminoácido C-terminal glicina hasta el aminoácido N-terminal glicina están peptídicamente unidos, mientras que el aminoácido C-terminal glicina está unido con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 6-aminohexanoico, por un lado, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 6-aminohexanoico y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado, de modo que el compuesto no dispone de grupo carboxilo C-terminal.

Un compuesto según la presente invención se puede producir de una manera adecuada, por ejemplo, análogamente a un proceso conocido, o como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante síntesis química o por medio de procesos microbiológicos, en donde, en particular, la introducción de un enlace amida entre un grupo amino libre y un grupo carboxilo libre se puede producir de forma adecuada, por ejemplo, análogamente a un proceso conocido, o como se describe en la presente solicitud.

Se ha visto que un compuesto según la presente invención muestra actividad farmacológica interesante y por tanto se puede usar como medicamento.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención para su uso como un medicamento.

Las investigaciones biológicas en células humanas demuestran que los compuestos según la presente invención no muestran propiedades inflamatorias o tóxicas. Para ello se cultivan células epiteliales humanas en un cultivo de células de laboratorio habitual, y se añade un compuesto según la presente invención. A pesar de la adición de un compuesto según la presente invención no se observaron reacciones tóxicas o inflamatorias en las células humanas.

La detección de una regulación vectorial de los canales iónicos mediante un compuesto se puede efectuar según un método de laboratorio habitual, por ejemplo, según Clunes M.T., et al., J. Physiol. (2004) 557.3: 809-819), mediante experimentos de pinzamiento zonal de membrana. Para los experimentos de pinzamiento zonal de membrana en canales iónicos, una cánula de vidrio se estira fina y se llena con solución de tampón neutro. La cánula de vidrio (pipeta de pinzamiento zonal de membrana) se presiona cuidadosamente sobre una célula epitelial intacta. Debajo de la pipeta se encuentra un trozo de membrana. Entre el interior de la pipeta y la solución externa se forma una resistencia eléctrica. En la solución de la pipeta se sumerge un electrodo, que está conectado a un amplificador sensible.

Se detecta una regulación de los canales iónicos epiteliales vectoriales mediante el cambio de la intensidad de la corriente a voltaje constante.

De esta manera se ha comprobado sorprendentemente que los compuestos de la presente invención muestran una regulación de los canales iónicos epiteliales vectoriales. Ha sido particularmente sorprendente que los compuestos según la presente invención, por ejemplo los compuestos con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8, producen activaciones claramente mayores de las corrientes de iones vectoriales, que los péptidos ya conocidos de la bibliografía CGQRETPEGAEKPWYC (Lucas et al. Science 1994, también el documento WO00/09149), CGTKPIELGPDEPKAVC (SEQ ID No. 2 del documento EP 2009 023) y LSPGQRETPEGAEAKPWYE (SEQ ID No. 2. del documento PCT AT2008 448).

Un compuesto según la presente invención se puede usar, por tanto, para la producción de un medicamento, por ejemplo, para la regulación de los canales iónicos vectoriales, en particular de canales iónicos de los pulmones, y para el tratamiento de edemas, en particular para el tratamiento de edema pulmonar; y en un aspecto adicional la presente invención proporciona un compuesto según la presente invención para la producción de un medicamento para la regulación de canales iónicos vectoriales, en particular de canales iónicos de los pulmones, para el tratamiento de enfermedades que se asocian con la función pulmonar, y para el tratamiento de edemas, en particular para el tratamiento de edemas pulmonares.

El tratamiento de enfermedades que se asocian con la función pulmonar, incluye, por ejemplo, la activación de canales iónicos epiteliales, la mejora de la función pulmonar y/o el tratamiento de edemas, como edemas pulmonares, además, el tratamiento

- de lesión pulmonar aguda (LPA)
- del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA)
- del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG),
- de neumonía,
- inflamaciones pulmonares víricas, como infecciones por el virus de la gripe y RSV;
- de insuficiencia multiorgánica,
- de daños pulmonares inducidos por respiración artificial, trasplantes pulmonares, daños pulmonares asociados con transfusión, administración terapéutica de IL-2 o asma.

En otro aspecto la presente invención proporciona un proceso para la regulación de canales iónicos vectoriales, en particular de canales iónicos de los pulmones, para el tratamiento de enfermedades que se asocian con la función pulmonar, y para el tratamiento de edemas, en particular para el tratamiento de edema pulmonar, que se caracteriza en que se administra a un paciente, en necesidad de tal tratamiento, una cantidad suficiente de un compuesto según la presente invención.

Un paciente, como se usa en el presente documento, incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

Un compuesto según la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que se caracteriza en que comprende un compuesto según la presente invención, por ejemplo, un compuesto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, como soporte o diluyente, por ejemplo junto con uno o más rellenos, aglutinantes, disgregantes, mejoradores de las propiedades de flujo, lubricantes, agentes saborizantes, azúcares o edulcorantes, aromas, conservantes, sustancias con efecto estabilizante, agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes, sales para la regulación de la presión osmótica y/o (mezclas de) tampones.

La cantidad adecuada del compuesto según la presente invención para el tratamiento de enfermedades por supuesto depende mucho de diferentes parámetros, por ejemplo, la naturaleza química y la farmacocinética del compuesto usado, del paciente individual, de la enfermedad que se trata, del tipo de aplicación; pero una dosis diaria eficaz en mamíferos más grandes incluye, por ejemplo, una cantidad de 0,0001 g hasta 1,5 g, por ejemplo, de 0,001 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal.

Los compuestos según la presente invención se pueden administrar en forma libre, o en forma de una sal, opcionalmente en forma de un solvato. Un compuesto según la presente invención en forma de una sal, opcionalmente en forma de un solvato, muestra esencialmente la misma actividad, que un compuesto de la presente invención en forma libre, opcionalmente no solvatada.

La administración de un compuesto según la presente invención o una composición farmacéutica del mismo se puede llevar a cabo preferiblemente por vía pulmonar o parenteral y se realiza en particular preferiblemente por vía pulmonar.

Una composición farmacéutica según la presente invención se puede producir de una manera adecuada, por ejemplo análogamente a un método conocido, por ejemplo, mediante procedimientos de mezcla, granulación, recubrimiento, disolución, liofilización.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

La figura 2 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

La figura 3 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

La figura 4 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

La figura 5 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

La figura 6 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

La figura 7 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

La figura 8 muestra el cromatograma de HPLC de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

En los cromatogramas de la figura 1 a la figura 8 se representan en el eje y la absorción [mUA = miliunidades de absorción] y en el eje x el tiempo [minutos].

La figura 9 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

La figura 10 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

La figura 11 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.

La figura 12 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

La figura 13 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

La figura 14 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

La figura 15 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

La figura 16 muestra el cromatograma de la medida de pinzamiento zonal de membrana de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

En los cromatogramas de la figura 9 a la figura 16 se representan en el eje y la intensidad de corriente [pA = picoamperios] y en el eje x el tiempo [seg =segundos].

Ejemplo 1

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1:

Tabla 1

Paso	Proceso	Producto
1	acoplamiento secuencial de los aminoácidos	péptido en crecimiento, unido a la fase sólida
2	separación selectiva de la fase sólida	péptido parcialmente protegido en solución
3	purificación y liofilización	péptido parcialmente protegido, purificado
4	ciclación selectiva	péptido ciclado, parcialmente protegido
5	corte de los grupos protectores	péptido ciclado en solución
6	purificación y liofilización	péptido ciclado purificado como sal de ácido trifluoroacético
7	análisis analítico	péptido purificado

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo épsilon-amino de la cadena lateral de la lisina N-terminal y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1886,1.

Ejemplo 2

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo delta-amino de la cadena lateral de la ornitina N-terminal y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1872,4.

Ejemplo 3

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido aminopentanoico, por un lado y mediante la

formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido aminopentanoico y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1857,0.

Ejemplo 4

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido gamma-aminobutírico, por un lado y mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido gamma-aminobutírico y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1843,0.

Ejemplo 5

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido gamma-aminobutírico, por un lado y mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido gamma-aminobutírico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico C-terminal, por otro lado.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1901,0.

Ejemplo 6

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 3-aminopropanoico, por un lado y mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 3-aminopropanoico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico C-terminal, por otro lado.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1901,0.

Ejemplo 7

Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7

El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 7-aminoheptanoico, por un lado y mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 7-aminoheptanoico y el carbono del grupo carboxilo de la tirosina C-terminal, por otro lado.

A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1828,0.

Ejemplo 8**Síntesis de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8**

5 El compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 se sintetizó por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc completamente automatizada en los pasos que se describen en la tabla 1 en el ejemplo 1.

10 El cierre del anillo se produjo mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 6-aminohexanoico, por un lado y mediante la formación de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 6-aminohexanoico y el carbono del grupo carboxilo de la glicina C-terminal, por otro lado.

15 A continuación se analizó el péptido por medio de HPLC reversa. La pureza era más del 95%. El peso molecular fue 1873,0.

Ejemplo 9**Experimentos de pinzamiento zonal de membrana****20 9a. Cultivo de células**

25 Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en células humanas A549 (ATTC No. CCL-185). Las células A549 son células epiteliales pulmonares humanas, que participan en la difusión de agua y electrolitos en el pulmón. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, número de producto R6504) con penicilina-estreptomicina al 1% y suero fetal de ternera al 10%, se transfirieron a placas de cultivo de plástico y se cultivaron en un incubador con aire al 95% y CO₂ al 5% a 37°C. El medio se cambió de 2 a 3 veces por semana. Las células se duplicaron en aprox. 22 horas y no se superó una concentración celular de más 7×10^4 células por cm².

30 9b. Adición de compuestos

35 Las células se observaron con un microscopio. Con ello se determinó que también la respectiva adición de un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 no produjo ninguna modificación de la morfología o el crecimiento celular y que la respectiva adición no produjo la muerte de las células.

30 9c. Experimentos de pinzamiento zonal de membrana

Para los experimentos de pinzamiento zonal de membrana las células se transfirieron a placas de vidrio pequeñas.

40 9d. Medidas de pinzamiento zonal de membrana

45 Se descargaron corrientes macroscópicas de células A549 en la configuración de "célula entera" de la técnica de "pinzamiento zonal de membrana" (Hamill et al, Pflugers Arch. 1981, 391(2):85-100., 1981). Para la disipación de corriente en la configuración de "célula entera" se usaron las siguientes soluciones de baño y electrodos:

Solución de baño: metanosulfonato de sodio 135 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 2 mM, glucosa 5,5 mM, y HEPES 10 mM, pH 7,4.

50 Solución de electrodos; metanosulfonato de potasio 120 mM, KCl 15 mM, NaCl 6 mM, Mg₂ATP 1 mM, Na₃ATP 2 mM, HEPES 10 mM y EGTA 0,5 mM (pH 7,2).

55 Se transfirieron cubreobjetos de vidrio con las células cultivadas en los mismos a un baño de experimentación con una capacidad de 1 ml, se fijaron en la pletina del microscopio (Axiovert 100, 400 aumentos) y las células se superfundieron con la solución de baño anteriormente descrita. Después de ello la corriente se descargó de una célula adecuada (que estaba adherida al cubreobjetos de vidrio). Para ello se colocó un microelectrodo lleno con solución de electrolito (capilar de vidrio con una apertura de punta definida pulida por calor de aprox. 1-3 µm, correspondiente a una resistencia de la punta del electrodo de 3-5 Ω) sobre la célula y la membrana se aspiró, de modo que se formó un "sello de gigaohmio" entre la membrana y el electrodo, para minimizar la corriente perdida. En la configuración de "célula entera" la membrana se penetró por debajo de la punta del electrodo, de modo que se pudiera medir la corriente que fluye través de todos los canales iónicos de la célula. Tras obtener un sello de gigaohmio se aplicó un potencial de retención de membrana definido a través de preamplificador (CV-4 Headstage, Axon Instruments) y un amplificador (Axopatch 1D, Axon Instr.) y se midió la corriente de fluye de la misma a través de los canales iónicos.

65 El protocolo del pulso consistía en una hiperpolarización de la membrana celular a -100 mV durante 5 segundos y una posterior despolarización gradual en pasos de 20 mV hasta +100 mV.

Este protocolo se realizó antes (control) y después de la adición de las moléculas orgánicas en anillo. Las disipaciones de corriente así obtenidas se almacenaron y se analizaron por medio del programa PCLAMP 6.0. Para ello se restaron las disipaciones de corriente obtenidas presencia de amilorida de las corrientes registradas anteriormente, de modo que se pudiera determinar la corriente de sodio sensible a amilorida a través de los canales epiteliales de sodio.

9d. Resultados

Regulación de canales iónicos de sodio a través de compuestos según la presente invención

Se determinó la capacidad de los compuestos según la presente invención a través de medidas de pinzamiento zonal de membrana de regular canales iónicos vectoriales. Con ello se mostró que los compuestos según la presente invención tienen la capacidad de regular canales iónicos vectoriales.

Además los compuestos según la invención se compararon con péptidos conocidos de la bibliografía y se determinó su actividad en comparación con los péptidos conocidos.

Los resultados se resumen en la tabla 2:

Tabla 2

Identificación	Estructura	Actividad en comparación con el péptido CGQRETPEGAEKPYC ("péptido TIP", Lucas R et al. Science 1994 también documento WO00/09149)
SEQ ID NO: 2 del documento EP 2009 023	CGTKPIELGPDEPKAVC	80%
SEQ ID NO: 2 del documento PCT AT2008 448	LSPGQRETPEGAEAKPWYE	60%
SEQ ID NO: 1 según la presente invención	[KGQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo Képsilón1-G17)	150%
SEQ ID NO: 2 según la presente invención	[ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG] (ciclo Orn-delta1-G17)	115%
SEQ ID NO: 5 según la presente invención	[ácido gamma-aminobutírico-GQRETPEGAEAKPWYD-OH] (ciclo 1-Dy17)	160%
SEQ ID NO: 6 según la presente invención	[ácido 3-aminopropanoico-GQRETPEGAEAKPWYE-OH] (ciclo 1-Eδ17)	150%
SEQ ID NO: 8 según la presente invención	[ácido 6-amino-hexanoico-GQRETPEGAEAKPWG] (ciclo 1-17)	150%

Como se puede ver de la tabla 2, la actividad de los compuestos según la presente invención es sorprendentemente mayor que la actividad de los compuestos peptídicos conocidos estructuralmente diferentes.

Lista de secuencias

<110> APEPTICO Forschung und Entwicklung GmbH

<120> Compuestos orgánicos para la regulación de canales iónicos vectoriales

<130> A 14832

<140> A 41/2010

<141> 10-01-2010

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ciclo Képsilon1-G17

5

<220>

<221> GIRO

<222> (1)..(17)

<223> Cierre del anillo entre el aminoácido N-terminal lisina (K) y el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo épsilon-amino de la cadena lateral de la lisina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina

10

<400> 1

Lys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr

1 5 10 15

Gly

15

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> ciclo Orn-delta1-G17

<220>

25

<221> GIRO

<222> (1)..(17)

<223> X = ornitina

Cierre del anillo entre el aminoácido N-terminal Orn y el aminoácido C-terminal Gly por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo delta-amino de la cadena lateral de la ornitina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina

30

<400> 2

xaa Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr

1 5 10 15

Gly

35

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> ciclo 1-17

<220>

<221> GIRO

45

<222> (1)..(16)

<223> Cierre del anillo entre la glicina N-terminal y la glicina C-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido 5-aminopentanoico y entre el grupo 5-amino del ácido 5-aminopentanoico y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal

50

<400> 3

Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Gly

1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

55

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

- <223> ciclo 1-17
- <220>
<221> GIRO
5 <222> (1)..(16)
<223> Cierre del anillo entre la glicina C-terminal y la glicina N-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido gamma-aminobutírico y entre el grupo amino del ácido gamma-aminobutírico y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal
- 10 <400> 4
Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Gly
1 5 10 15
- <210> 5
<211> 16
15 <212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> ciclo 1-Dgamma17
20
- <220>
<221> GIRO
<222> (1)..(16)
<223> Cierre del anillo entre el ácido aspártico C-terminal y la glicina N-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido gamma-aminobutírico y entre el grupo amino del ácido gamma-aminobutírico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico C-terminal
25
- <400> 5
Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Asp
1 5 10 15
30
- <210> 6
<211> 16
<212> PRT
35 <213> Artificial
- <220>
<223> ciclo 1-Edelta17
- 40 <220>
<221> GIRO
<222> (1)..(16)
<223> Cierre del anillo entre el ácido glutámico C-terminal y la glicina N-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido 3-aminopropanoico y entre el grupo amino del ácido 3-aminopropanoico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico C-terminal
45
- <400> 6
Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
1 5 10 15
- 50 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
- 55 <220>
<223> ciclo 1-16
- <220>
<221> GIRO
60 <222> (1)..(15)

<223> Cierre del anillo entre la tirosina C-terminal y la glicina N-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido 7-aminoheptanoico y entre el grupo amino del ácido 7-aminoheptanoico y el grupo carboxilo de la tirosina

5 <400> 7

Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr
1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> ciclo 1-17

15

<220>

<221> GIRO

<222> (1)..(16)

20 <223> Cierre del anillo entre la glicina C-terminal y la glicina N-terminal por medio de un enlace amida entre el grupo amino de la glicina N-terminal y el grupo carboxilo C1 del ácido 6-aminohexanoico y entre el grupo amino del ácido 6-aminohexanoico y el grupo carboxilo de la glicina C-terminal

<400>8

Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Gly
1 5 10 15

25

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Elemento estructural básico de los compuesto orgánicos cíclicos según la invención

<400> 9

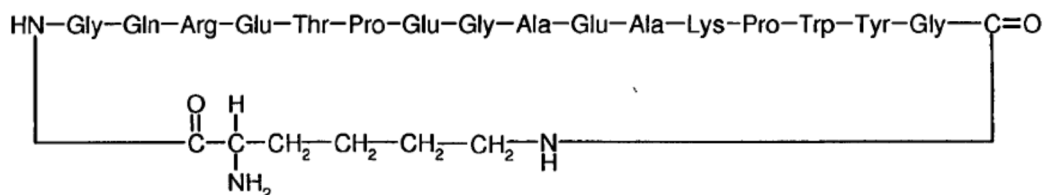
Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr
1 5 10 15

35

REIVINDICACIONES

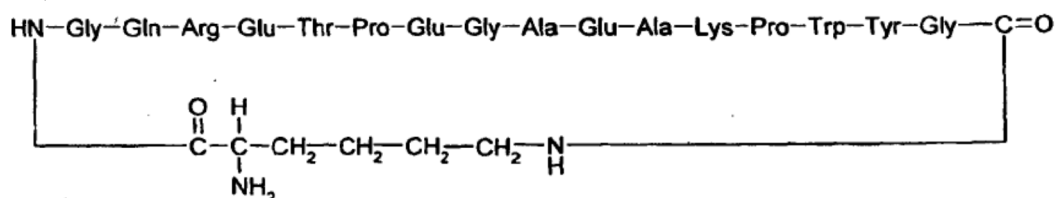
1. Compuesto orgánico cíclico, que comprende la secuencia de aminoácidos GQRETPEGAEAKPWY además de uno o dos aminoácidos adicionales, **caracterizado en que** no dispone de grupo carboxilo C-terminalmente y/o grupo amino N-terminalmente, en donde uno de los aminoácidos es un aminoácido no natural, seleccionado de ornitina o un omega-aminoácido, y en donde el cierre del anillo se forma entre una cadena lateral de un aminoácido con el extremo C-terminal de otro aminoácido, o el cierre del anillo se produce por medio de un aminoácido no natural; o

el compuesto orgánico cíclico es un compuesto de la SEQ ID NO: 1

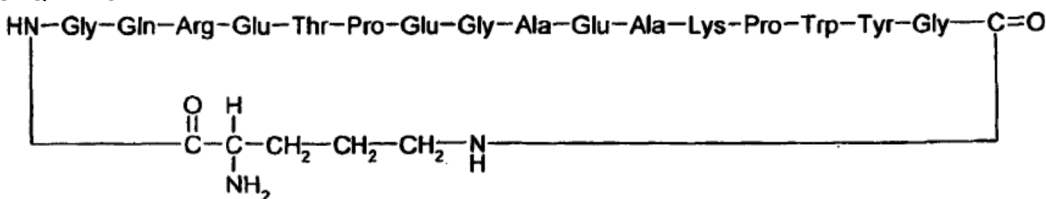


2. Compuesto orgánico cíclico según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el omega-aminoácido es un ácido omega-aminoalcanoico(C₃₋₁₂).
3. Compuesto orgánico cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado en que** el omega-aminoácido se selecciona de ácido 3-aminopropanoico, ácido gamma-aminobutírico, ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminohexanoico y ácido 7-aminoheptanoico.
4. Compuesto orgánico cíclico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado en que** el aminoácido no natural se une mediante enlaces amida.
5. Compuesto orgánico cíclico según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el cierre del anillo se efectúa entre una cadena lateral de la ornitina con el extremo C-terminal de otro aminoácido natural, en particular glicina.
6. Compuesto orgánico cíclico según la reivindicación 1, en el cual el compuesto es un compuesto de la fórmula

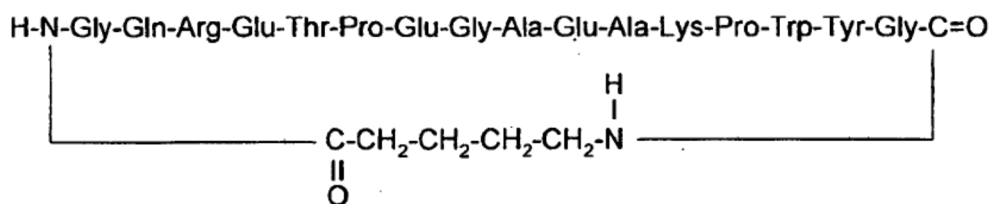
SEQ ID NO: 1



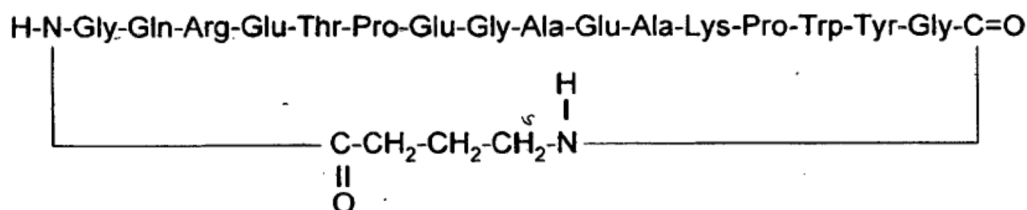
SEQ ID NO: 2



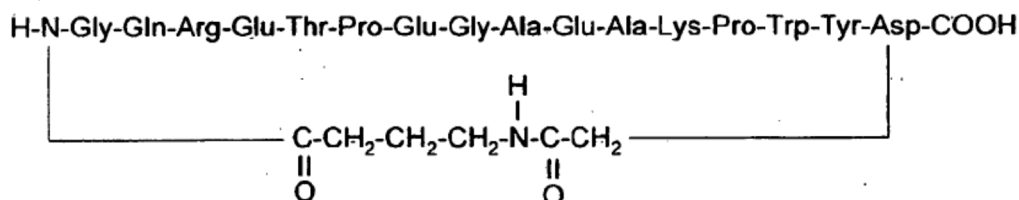
SEQ ID NO: 3



SEQ ID NO: 4

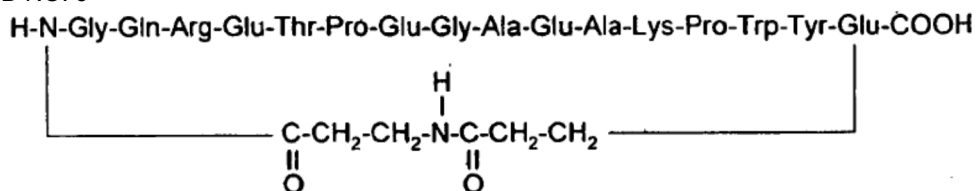


SEQ ID NO: 5

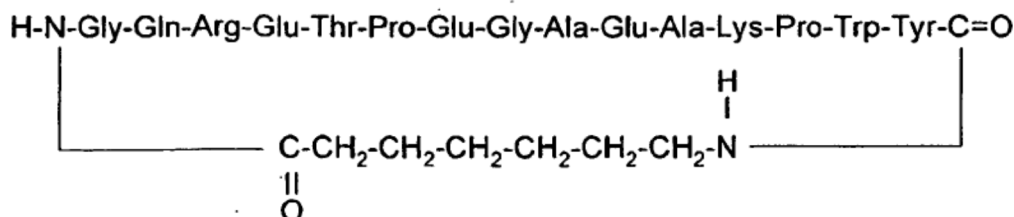


5

SEQ ID NO: 6



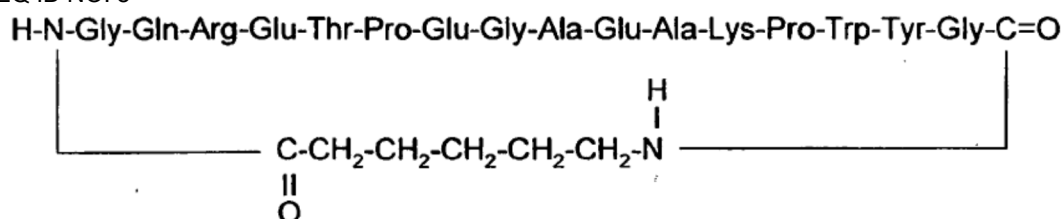
SEQ ID NO: 7



10

o

SEQ ID NO: 8



15

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en forma de una sal.
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado en que** el compuesto se usa para la regulación de canales iónicos vectoriales, en particular de canales iónicos de los pulmones, para el tratamiento de enfermedades que se asocian con la función pulmonar, en particular para el tratamiento de lesión pulmonar aguda (LPA), el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG), neumonía, inflamaciones pulmonares víricas, como infecciones por el virus de la gripe o RSV, en insuficiencia multiorgánica, en daños pulmonares inducidos por respiración artificial, en trasplante de pulmones, en daños pulmonares asociados con transfusión, en la administración terapéutica de IL-2 o en asma; y para el tratamiento de edemas, en particular para el tratamiento de edema pulmonar.
10. Composición farmacéutica **caracterizada en que** comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

30

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, **caracterizada en que** comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11 **caracterizada en que** el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un soporte o diluyente.
- 10 13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12 **caracterizada en que** comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en asociación con uno o más rellenos, aglutinantes, disgregantes, mejoradores de las propiedades de flujo, lubricantes, saborizantes, azúcares o edulcorantes, aromas, conservantes, sustancias con efecto estabilizante, agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o (mezclas) de tampones.

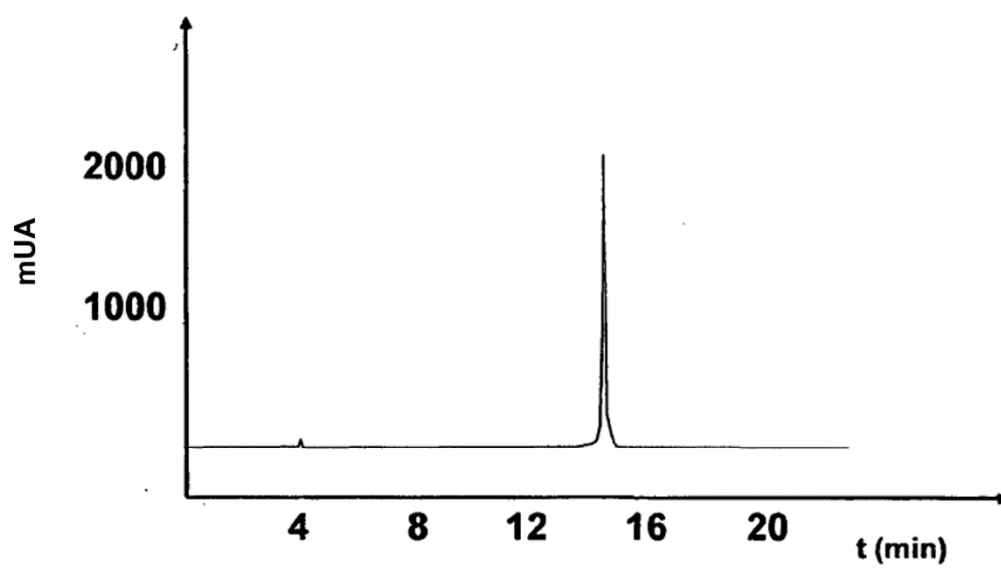


Fig. 1

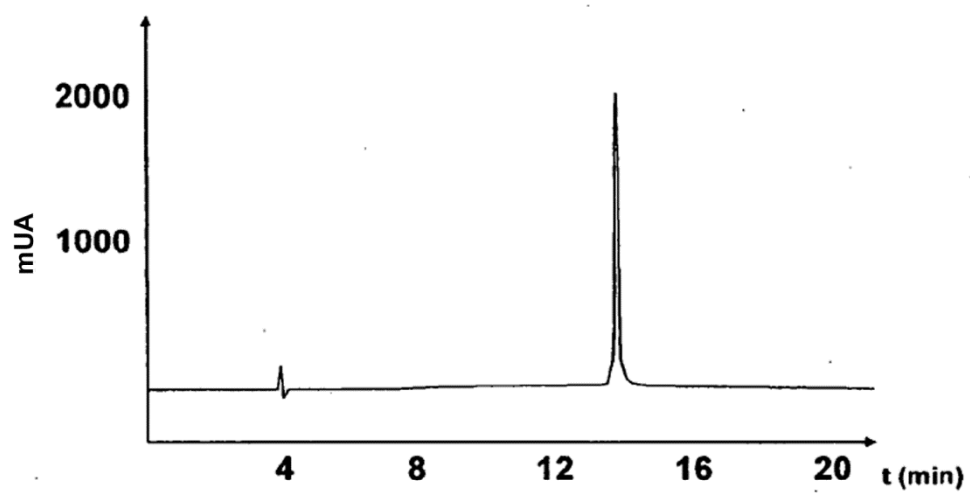


Fig. 2

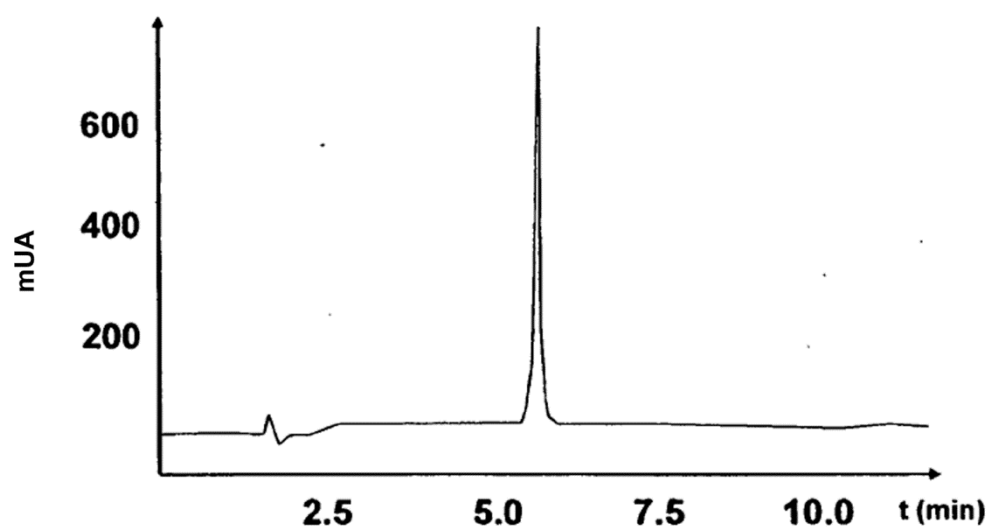


Fig. 3

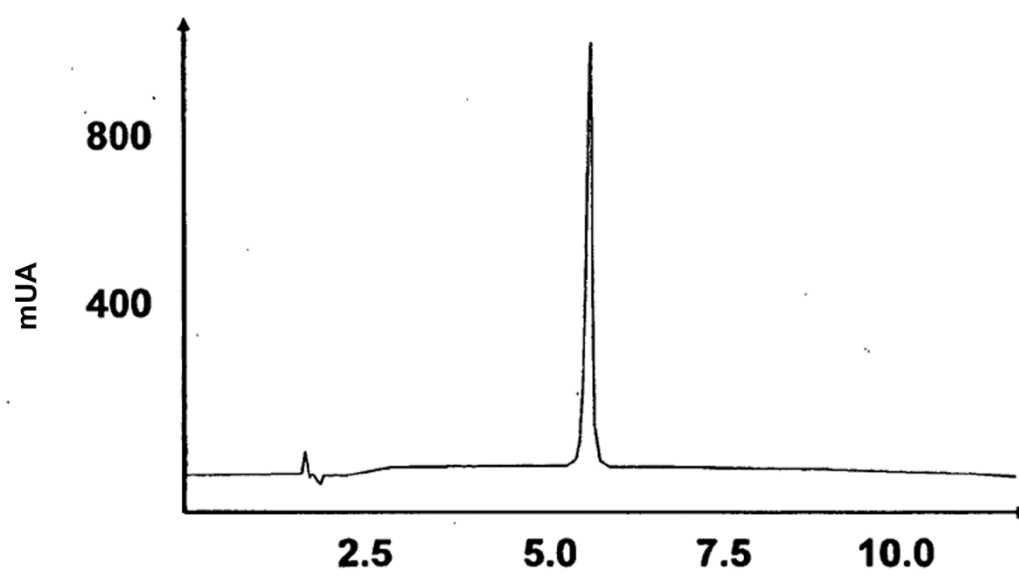


Fig. 4

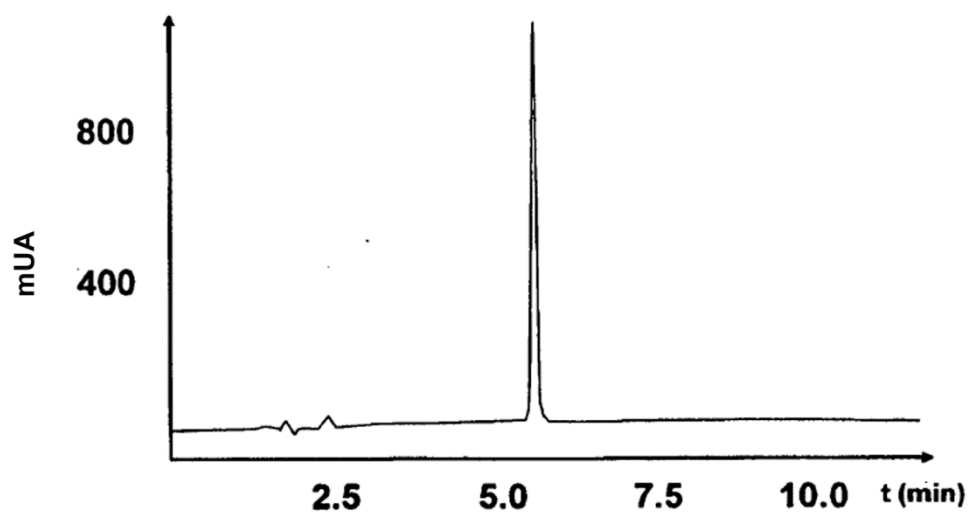


Fig. 5

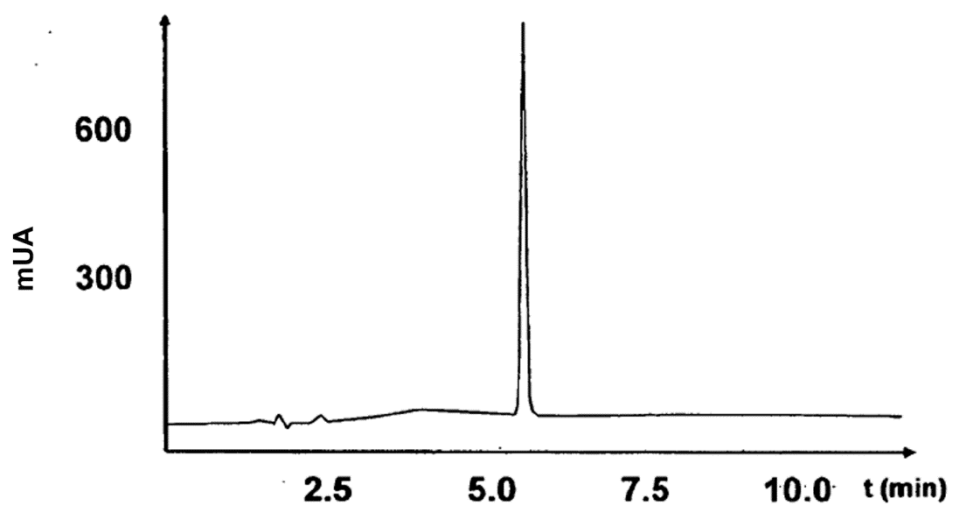


Fig. 6

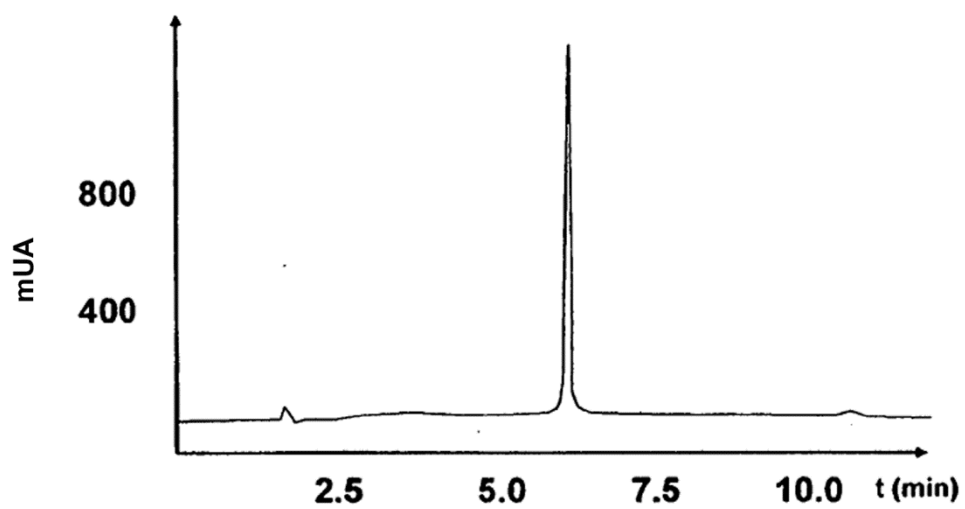


Fig. 7

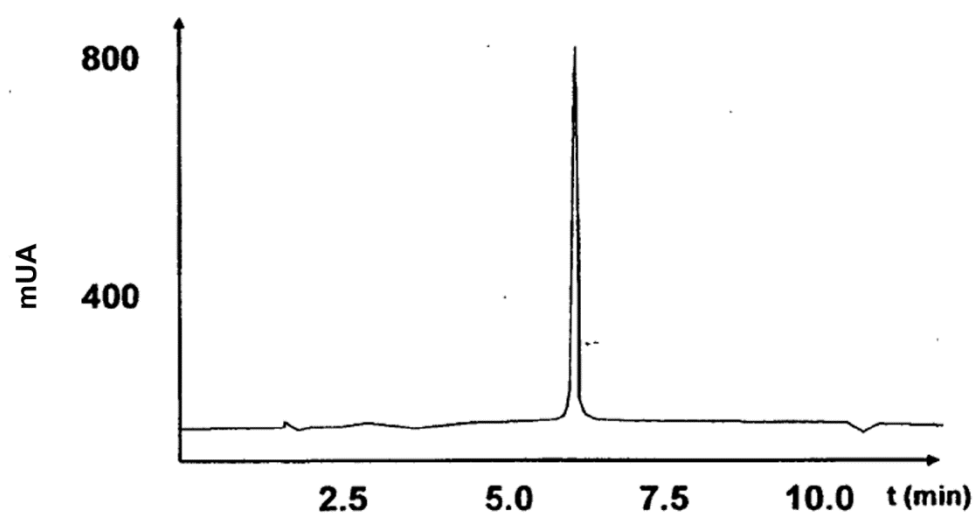


Fig. 8

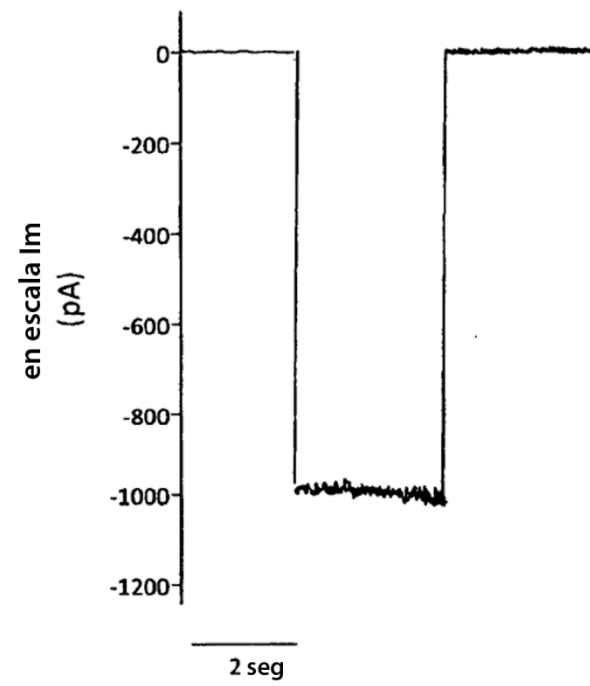


Fig. 9

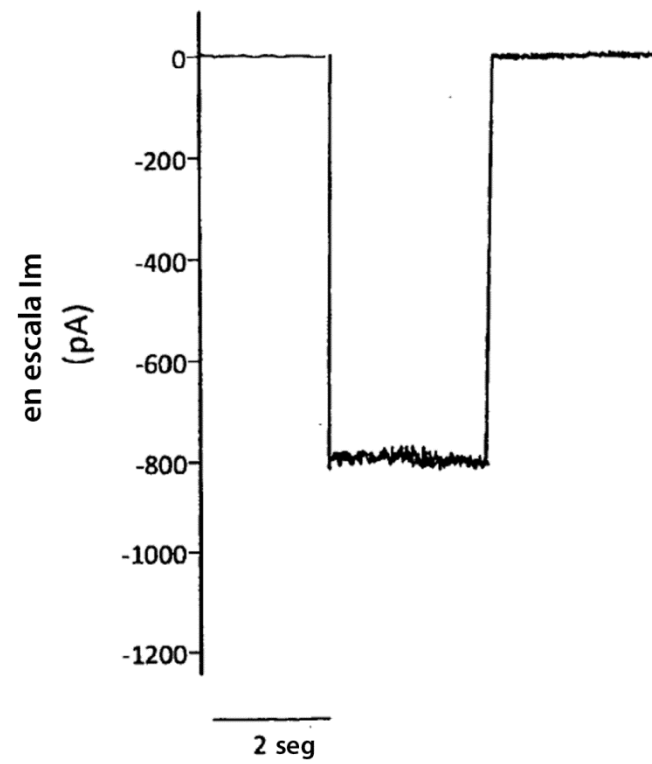


Fig. 10

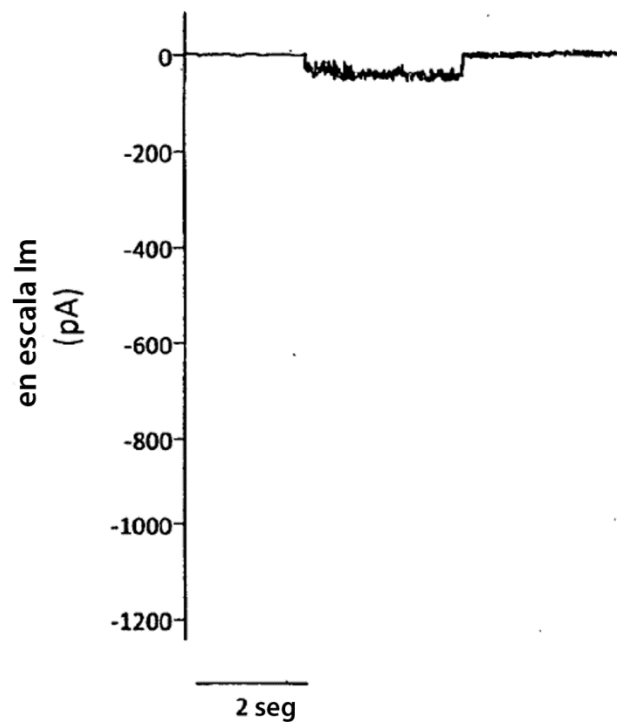


Fig. 11

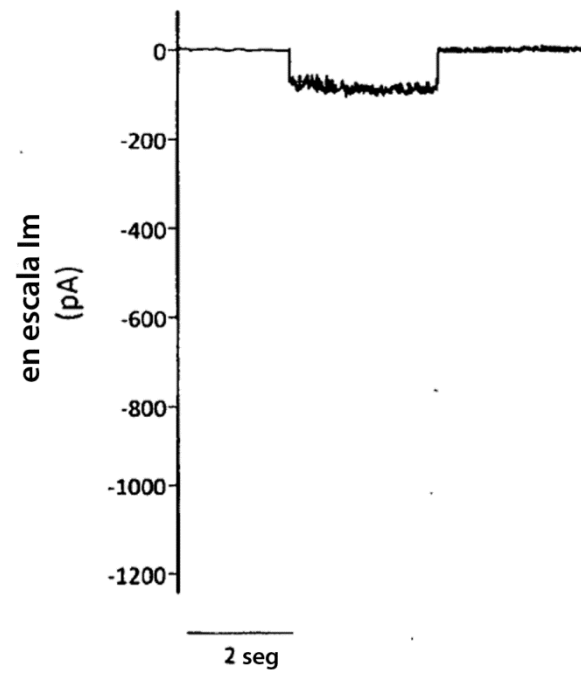


Fig. 12

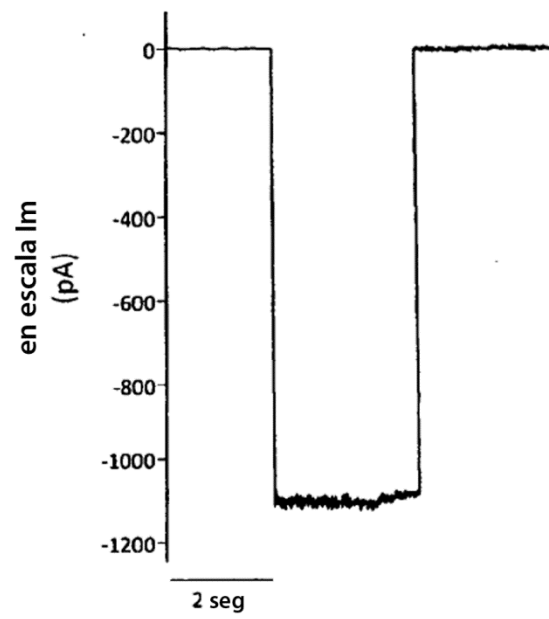


Fig. 13

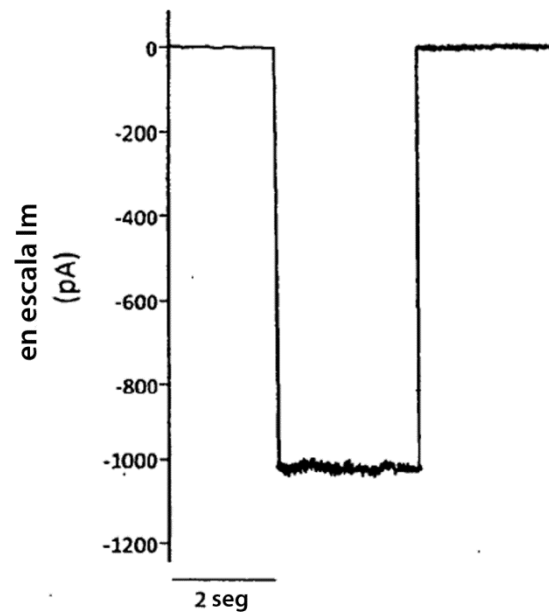


Fig. 14

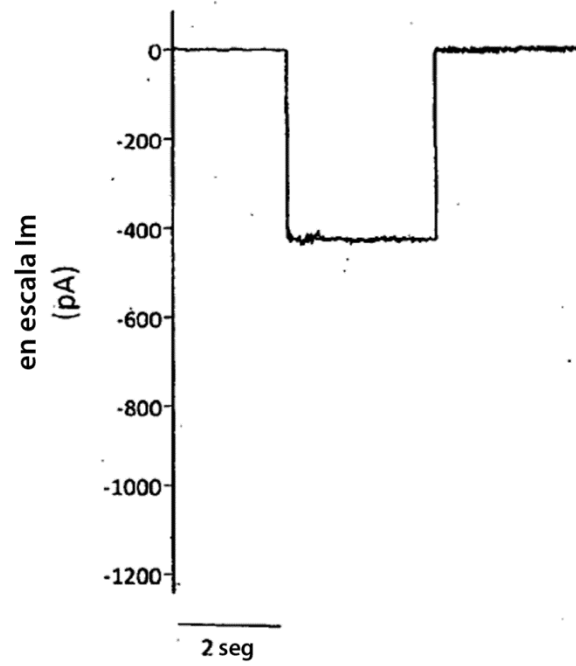


Fig. 15

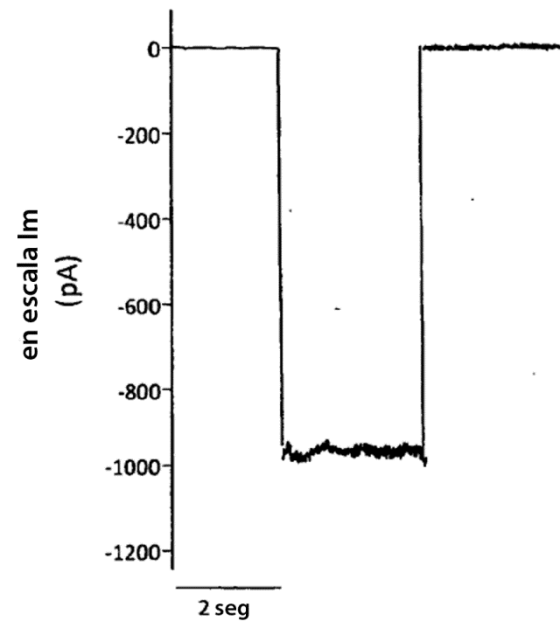


Fig. 16