

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 465**

51 Int. Cl.:

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2008** **E 13169636 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2633859**

54 Título: **Un agente que comprende taurodesoxicolato de sodio para su uso en el tratamiento o la prevención de sepsis**

30 Prioridad:

14.05.2007 KR 20070046579

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

07.03.2017

73 Titular/es:

**SHAPERON INC. (100.0%)
312, 3rd floor, Main Building of SNU Research
Park, 1- Gwanak-ro
Gwenak gu, Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**SEONG, SEUNG-YONG;
KANG, CHANG GU y
KIM, YOUN HEE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 604 465 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

Un agente que comprende taurodesoxicolato de sodio para su uso en el tratamiento o la prevención de sepsis

5 [Campo Técnico]

En el presente documento se describe el uso de un tensioactivo biológico como un agente antiinflamatorio y una solución conservante de tejidos. Más en particular, la presente descripción se refiere a un agente antiinflamatorio y una solución conservante de tejidos que comprenden un tensioactivo biológico que bloquea la reacción de un factor proinflamatorio con un receptor mediante emulsificación del factor proinflamatorio.

[Técnica anterior]

15 El mecanismo inmunológico innato desempeña un papel en una primera defensa contra una infección patógena y en el reconocimiento y la recuperación de tejido dañado y está mediado por determinadas células tales como un macrófago y una célula dendrítica, y factores humorales tales como un sistema del complemento y un sistema de coagulación.

20 En particular, la respuesta inflamatoria del sistema inmunológico innato es un mecanismo de defensa in vivo provocado por endotoxinas bacterianas y daños en tejidos, y está acompañado por el aumento de células inflamatorias (macrófagos, células dendríticas, etc.) y citocinas proinflamatorias (interleucina-12, TNF- α , etc.), hipermemia, derrame local de líquido intersticial, fibroplasia para la recuperación, etc.

25 La activación de dichas células proinflamatorias puede confirmarse mediante la producción de citocina proinflamatoria así como la expresión de factores de transcripción nuclear que están implicados en la regulación de la transcripción de genes de células inflamatorias y la expresión de moléculas coestimulantes (CD40, CD80, CD86) o complejos de histocompatibilidad principales (MHC) que están implicados en la activación de las células inflamatorias.

30 Asimismo, las células inflamatorias que incluyen células presentadoras de antígeno (APC) en el mecanismo inmunológico innato inducen directamente o indirectamente la activación del mecanismo inmunológico adquirido inducido por linfocitos T y linfocitos B. La respuesta inmunitaria adquirida activada por respuesta inflamatoria sistémica intensificó también la respuesta inflamatoria.

35 Una toxina (endotoxina o exotoxina) es un ejemplo de un material que puede inducir una activación anormal del sistema inmunológico innato y una respuesta inflamatoria. Una endotoxina tal como un glicolípidio de *E. coli* es una molécula anfifila que tiene tanto regiones hidrófilas como regiones hidrófobas tales como una región lipídica, y es uno de los materiales principales que constituyen la pared celular de bacterias Gram-negativas.

40 En particular, se sabe que la región lipídica de la endotoxina tiene una hidrofobicidad fuerte y desempeña un papel importante en la inducción de la citotoxicidad. Por lo tanto, mediante la endotoxina son inducidas diversas enfermedades y afecciones. La sepsis, en particular, puede causar graves problemas en una sala de urgencias o durante una operación.

45 La sepsis induce una inflamación grave en la sangre y en diversos órganos debido a que las toxinas bacterianas circulan a través de vasos sanguíneos. La sepsis también puede provocar una diversidad de síntomas tales como fiebre, vómitos, diarrea, descenso de la tensión arterial, taquipnea, taquicardia, micción frecuente, estupor, etc.

50 La sepsis es la tercera causa principal de muerte en los países desarrollados. Más de 750.000 personas se ven afectadas por la sepsis anualmente en Estados Unidos, y el 9 % de las muertes totales en Estados Unidos son debidas a sepsis.

55 La exotoxina excretada por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas también puede inducir una inflamación. La endotoxina está constituida por proteínas, y se produce y se excreta durante el proceso metabólico de *Corynebacterium diphtheria*, *Clostridium tetany*, *Clostridium botulinum*, etc. Exotoxinas similares son producidas por el bacilo de la disentería, estreptococos, etc.

60 Las respuestas inflamatorias producidas por una actividad inmunológica innata anormal se consideran problemas importantes en un transplante de órganos, y uno de los problemas es el rechazo inmunológico que tiene lugar durante el transplante de células porcinas a un ser humano. Dichos rechazos inmunológicos están activados por tejidos dañados durante una operación, así como por anticuerpos naturales presentes en la sangre, y provocan necrosis tisular con una respuesta inflamatoria grave.

65 En particular, los daños a órganos debidos a anoxia isquémica durante la extirpación de un órgano de un donante, el daño durante la conservación de un órgano antes de su transplante y la formación de oxígeno activo y el aumento en respuestas inmunitarias después de la reperfusión, se consideran un problema importante.

Por lo tanto, se requiere una solución conservante de órganos que pueda minimizar daños al órgano que se va a transplantar y rechazos inmunológicos. Actualmente están disponibles diversas soluciones conservantes de órganos comerciales, por ejemplo la solución de la Universidad de Wisconsin desarrollada por la Universidad de Wisconsin en Estados Unidos y solución HTK (histidina-triptófano-cetoglutarato) desarrollada en Alemania. La solución conservante de órganos se inyecta como un perfusado antes de extirpar un órgano de un donante, o se usa para la conservación de un órgano antes del trasplante del órgano a un paciente. No obstante, las soluciones conservantes de órganos convencionales tienen limitaciones en la supresión de las respuestas inflamatorias inducidas por el órgano dañado durante el trasplante.

Así, es importante para diversas enfermedades inflamatorias, así como para un trasplante de órganos, controlar las respuestas inflamatorias.

Los agentes antiinflamatorios y los agentes inmunodepresivos convencionales que tienen un efecto inhibitorio de la inflamación tienen las desventajas de que los agentes tienen un efecto tóxico y se requieren para una administración continua. Los agentes también tienen efectos adversos cuando se administran los agentes.

El Vioxx, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), se usa para el tratamiento de artritis y, no obstante, se ha informado que el Vioxx aumenta dos veces la morbilidad de cardiopatías, según ensayos clínicos. En consecuencia, la seguridad de otros fármacos que tienen un mecanismo de inhibición de la inflamación similar al Vioxx se encuentra en investigación.

Los fármacos antiinflamatorios esteroideos también tienen efectos adversos. Cuando se abusa de estos fármacos antiinflamatorios esteroideos, la resistencia a la enfermedad in vivo disminuye y, por lo tanto, el cuerpo humano se vuelve sensible a sufrir enfermedades tales como diabetes, osteoporosis, etc.

El Xigris, el primer agente terapéutico comercializado para sepsis, interviene en el proceso de coagulación de la sangre y, por lo tanto, puede provocar una hemorragia grave o apoplejía.

Los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.283.236 y 5.658.878 divulgan glicocolato de sodio y derivados del mismo. No obstante, las patentes anteriores divulgan el uso de glicocolato de sodio solo como un agente que mejora el suministro de fármacos, no como un agente antiinflamatorio.

Además, M. Katsrma y col. informaron, en su estudio de la mejora de la capacidad de suministro de fármacos en el colon, que la absorción colónica de insulina se mejora cuando se administra glicocolato de sodio u óxido de polietileno conjuntamente con insulina (International Journal of Pharmaceutics, 2006, páginas 156-162). No obstante, Katsrma y col. no divulgan tampoco el efecto antiinflamatorio del glicocolato de sodio y derivados del mismo.

El documento WO96/04916 divulga el uso parenteral de colato de sodio o desoxicolato de sodio en la prevención de muerte provocada por endotoxemia. No se hace ninguna referencia al taurodesoxicolato de sodio.

Por lo tanto, se ha requerido con interés para el desarrollo de un fármaco novedoso que pueda paliar defectos de los agentes antiinflamatorios convencionales y mejorar el efecto terapéutico de un agente antiinflamatorio sobre una inflamación.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Por lo tanto, el objeto principal de la presente descripción es proporcionar un agente antiinflamatorio que comprende un tensioactivo biológico que bloquea una reacción de un factor proinflamatorio con un receptor mediante emulsificación del factor proinflamatorio.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un aditivo para una solución conservante de tejidos o células que comprende al menos un tensioactivo biológico seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido deshidrocólico, un conjugado de los mismos con glicina o taurina y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otro objeto más de la presente descripción es proporcionar un agente terapéutico para sepsis que comprende al menos un tensioactivo biológico seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido deshidrocólico, un conjugado de los mismos con glicina o taurina y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[Solución técnica]

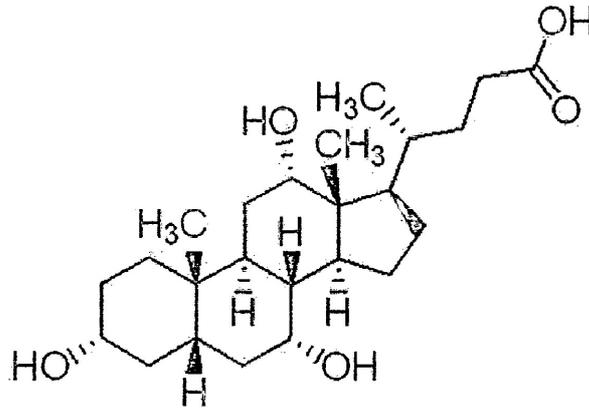
El objeto principal de la presente descripción puede lograrse proporcionando un agente antiinflamatorio que

comprende un tensioactivo biológico que bloquea una reacción de un factor proinflamatorio con un receptor mediante emulsificación del factor proinflamatorio.

El tensioactivo biológico es ácido desoxicólico conjugado con taurina.

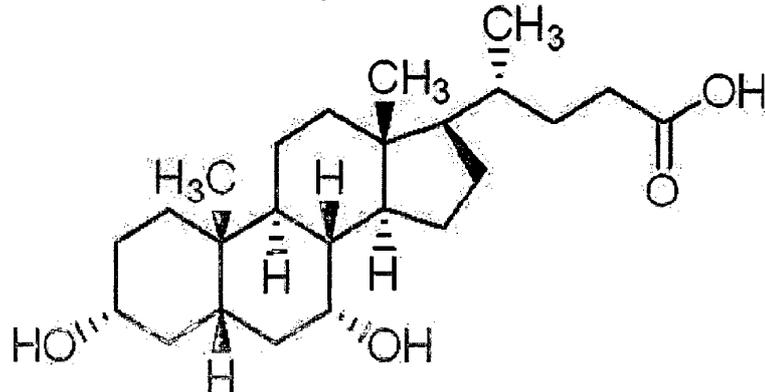
- 5 Las fórmulas estructurales, con fines de descripción, de ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico y ácido deshidrocólico son las siguientes:

Ácido cólico



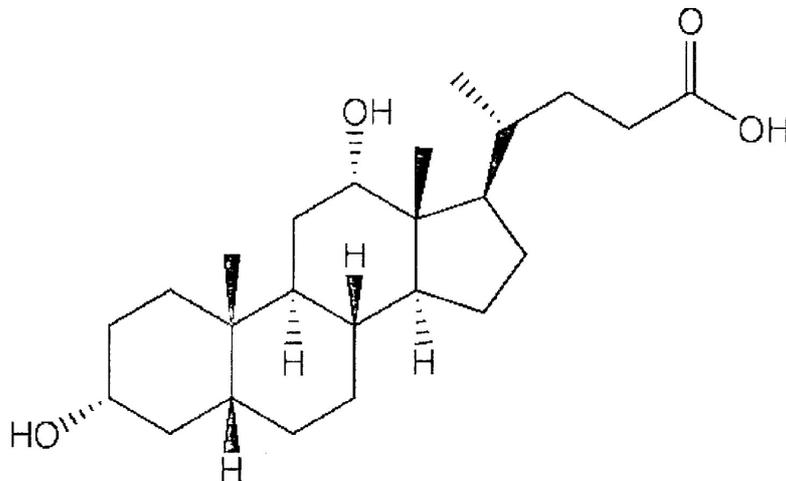
10

Ácido quenodesoxicólico

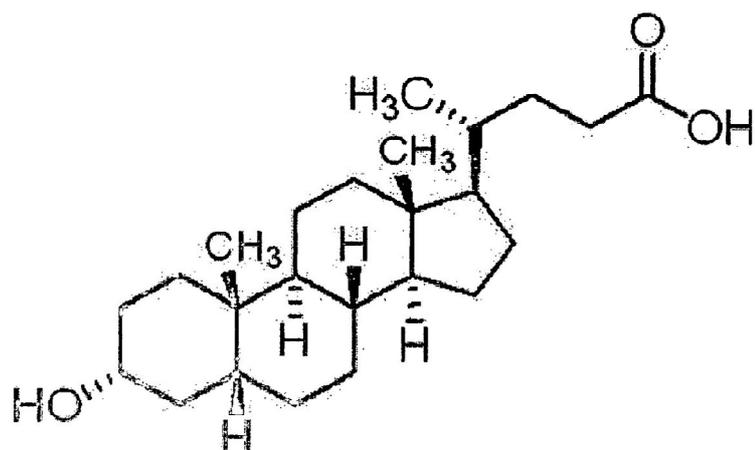


15

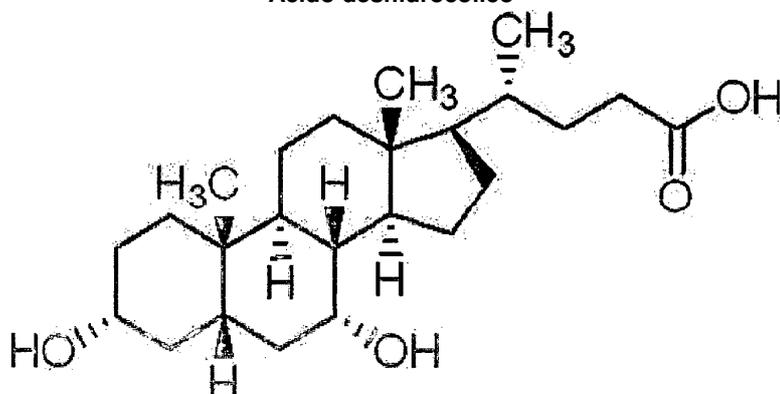
Ácido desoxicólico



Ácido litocólico



Ácido deshidrocolico



5 El término "conjugado", en el contexto de la presente descripción y según la reivindicación 1, se refiere a un compuesto que conjuga ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico o ácido deshidrocolico con glicina o taurina, por ejemplo ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicokenodesoxicólico, ácido tauroquenodesoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurodesoxicólico, etc.

10 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", en el contexto de la presente descripción, se refiere a un compuesto que es una sal de sodio o de potasio de ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido deshidrocolico o una conjugación de los mismos con glicina o taurina.

15 El agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 bloquea la interacción entre una toxina o tejido dañado y una célula inflamatoria, e inhibe la activación del sistema inmunológico innato tratando y previniendo de este modo una respuesta inflamatoria provocada por la toxina y tejido dañado. Asimismo, el agente antiinflamatorio de la presente invención puede usarse para el tratamiento y la prevención de inflamación sistémica.

20 El agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 puede usarse para bloquear la reacción de una célula huésped con una toxina bacteriana o un factor proinflamatorio endógeno.

25 El agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 puede usarse para tratar o prevenir una inflamación asociada con una enfermedad, tal como enfermedad de Alzheimer, arteriosclerosis, artritis reumática, artritis degenerativa o enfermedad de plegado defectuoso de proteínas, en la que la incidencia o la progresión está provocada por una sustancia proinflamatoria cuya región hidrófoba está expuesta excesivamente.

30 Preferentemente, una dosis de agente antiinflamatorio según la reivindicación 1, que muestra in vivo un efecto antiinflamatorio sin toxicidad es de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg.

35 La producción de citocina proinflamatoria y la actividad de células inflamatorias que están estimuladas por toxina puede inhibirse cuando la activación de la células por la toxina se bloquea mediante el tratamiento con el agente antiinflamatorio según la reivindicación 1. El agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 no muestra citotoxicidad con una dosis que no supere 1 mg/ml. En el ensayo con ratones, no apareció ningún efecto adverso con la administración de glicocolato de sodio a una dosis de 250 ml/kg de ratón, y la mortalidad de ratones se redujo significativamente con la administración de glicocolato de sodio a una dosis de 12,5 ml/kg de ratón.

La vía de administración del agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 puede seleccionarse entre vía oral, parenteral, de inyección, tópica o rectal. Asimismo, la formulación del agente antiinflamatorio de la presente invención puede seleccionarse entre una solución líquida, una pomada, una crema, un gel, una loción, una suspensión, un comprimido, una cápsula o un supositorio.

5 Otro objeto de la presente descripción es describir un aditivo para una solución conservante de tejidos o células que comprende al menos un tensioactivo biológico seleccionado de entre ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido deshídrocólico, un conjugado de los mismos con glicina o taurina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10 Cuando el aditivo para la solución conservante de tejidos o células de la presente descripción se añade a la solución conservante de órganos convencional se inhibe una respuesta inmunitaria inducida por lesión de isquemia-reperfusión en el riñón y se ayuda también a la recuperación de la función renal. Por lo tanto, puede mejorarse la eficacia de una solución conservante de órganos o células. Además, la solución conservante de órganos o células a la que se añade el aditivo para solución conservante de tejidos o células de la presente descripción puede usarse con fines de tratamiento.

15 En la prueba renal para ratas dañadas por lesión de isquemia-reperfusión, la mejora de la función renal y el efecto de inhibición de una respuesta inflamatoria se aumentaron mediante la adición del aditivo para solución conservante de tejidos o células de la presente invención en el intervalo de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml.

20 Otro objeto más de la presente descripción puede lograrse proporcionando un agente terapéutico según la reivindicación 1 para sepsis que comprende al menos un tensioactivo biológico seleccionado de entre ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido deshídrocólico, un conjugado de los mismos con glicina o taurina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[Efectos ventajosos]

30 El agente antiinflamatorio según la reivindicación 1 inhibe eficazmente una respuesta inflamatoria provocada por toxina o daño en tejidos. Por lo tanto, cuando el aditivo para solución conservante de tejidos o células de la presente invención se añade a una solución conservante de tejidos o células, la función del órgano o la célula se mejora. Además, el aditivo de la presente invención puede usarse para un agente inhibidor de diversas respuestas inmunitarias.

35 **[Descripción de los dibujos]**

La figura 1 muestra la eficacia de inhibición de glicocolato de sodio de la interacción entre LPS de *E. coli* marcado con fluoresceína y una célula CHO, en el ejemplo 1 de la presente invención, con fines comparativos.

40 La figura 2A muestra un sistema de células CHO que expresa CD25 bajo la regulación de un promotor de un factor nuclear (NF- κ B) y la figura 2B muestra la eficacia de inhibición de glicocolato de sodio de la actividad de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 1 de la presente invención. % de células CD25+ significa una fracción de células activadas por NF- κ B, con fines comparativos.

45 La figura 3 muestra la eficacia de inhibición de glicocolato de sodio y desoxicolato de sodio de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención, con fines comparativos.

50 La figura 4 muestra la eficacia de inhibición de glicoquenodesoxicolato de sodio y tauroquenodesoxicolato de sodio de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención, con fines comparativos.

55 La figura 5 muestra la eficacia de inhibición de taurocolato de sodio, con fines comparativos, y taurodesoxicolato de sodio de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención.

La figura 6 muestra la eficacia de inhibición de ácido desoxicólico y ácido litocólico de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención, con fines comparativos.

60 La figura 7 muestra la eficacia de inhibición de ácido quenodesoxicólico de hidrato de ácido glicocólico de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención, con fines comparativos.

65 La figura 8 muestra la eficacia de inhibición de ácido cólico de la actividad NF- κ B de una célula CHO estimulada por LPS de *E. coli*, en el ejemplo 2 de la presente invención, con fines comparativos.

- La figura 9 muestra la eficacia de inhibición de glicocolato de sodio de la actividad de una célula dendrítica estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 3 de la presente invención, con fines comparativos.
- 5 La figura 10 muestra la eficacia de inhibición de tauroquenodesoxicolato de sodio de la actividad de una célula dendrítica estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 3 de la presente invención, con fines comparativos.
- La figura 11 muestra la eficacia de inhibición de taurodesoxicolato de sodio de la actividad de una célula dendrítica estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 3 de la presente invención.
- 10 La figura 12 muestra la eficacia de glicocolato de sodio para la producción de citocina proinflamatoria de una célula abdominal (A, B) y dendrítica (C, D) de ratón estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 4 de la presente invención, con fines comparativos.
- 15 La figura 13 muestra la eficacia de glicocolato de sodio, con fines comparativos, tauroquenodesoxicolato de sodio, con fines comparativos, y taurodesoxicolato de sodio para la producción de óxido nítrico (NO) de una célula abdominal estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 5 de la presente invención.
- La figura 14 muestra la eficacia de glicocolato de sodio, con fines comparativos, tauroquenodesoxicolato de sodio, con fines comparativos, y taurodesoxicolato de sodio para la producción de NO de un macrófago estimulado por LPS de E. coli, en el ejemplo 5 de la presente invención.
- 20 La figura 15 muestra la eficacia de glicocolato de sodio para la actividad de linfocito T de una célula dendrítica estimulada por LPS de E. coli, en el ejemplo 6 de la presente invención, con fines comparativos.
- 25 La figura 16 es un gráfico que se refiere a la determinación de la concentración de LPS que se va a administrar a un ratón C57BL/6, en el ejemplo 7 de la presente invención.
- La figura 17 muestra la eficacia de glicocolato de sodio para la tasa de supervivencia de ratones C57BL/6 a los que se ha administrado LPS, en el ejemplo 7 de la presente invención, con fines comparativos.
- 30 La figura 18 muestra la reducción de IL-12p70, una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- 35 La figura 19 muestra la reducción de IFN-g, una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- La figura 20 muestra la reducción de IL-10, una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- 40 La figura 21 muestra la reducción de TNF- α , una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- 45 La figura 22 muestra la reducción de MCP-1, una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- La figura 23 muestra la reducción de IL-6, una citocina proinflamatoria, cuando se administra glicocolato de sodio a un ratón C57BL/6 al que se ha administrado LPS, en el ejemplo 8 de la presente invención, con fines comparativos.
- 50 La figura 24 muestra la influencia de glicocolato de sodio en la respuesta inflamatoria y la función renal en el caso de lesión de isquemia-reperfusión en riñón, con fines comparativos.
- 55 La figura 25A muestra que el glicocolato de sodio no tiene citotoxicidad para una célula CHO tratada con el mismo en el ejemplo 10 de la presente invención; la figura 25B muestra que el glicocolato de sodio no tiene citotoxicidad para una célula dendrítica tratada con el mismo en el ejemplo 10 de la presente invención; la figura 25C muestra que el glicocolato de sodio no tiene citotoxicidad para un linfocito T mediado por célula dendrítica tratado con el mismo en el ejemplo 10 de la presente invención; y la figura 25D muestra que el glicocolato de sodio no tiene citotoxicidad para una célula abdominal separada del ratón tratado con el mismo en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.
- 60 La figura 26 muestra citotoxicidad de hidrato de glicocolato de sodio y desoxicolato de sodio para una célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.
- 65 La figura 27 muestra citotoxicidad de glicocolato de sodio y tauroquenodesoxicolato de sodio para una

célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

La figura 28 muestra citotoxicidad de taurocolato de sodio, con fines comparativos, y de taurodesoxicolato de sodio para una célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención.

5 La figura 29 muestra citotoxicidad de ácido deshídrocólico y ácido litocólico para una célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

10 La figura 30 muestra citotoxicidad de ácido quenodesoxicólico y ácido glicocólico para una célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

La figura 31 muestra citotoxicidad de ácido cólico para una célula CHO en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

15 La figura 32 muestra citotoxicidad de glicocolato de sodio para un ratón Balb/c al que se ha administrado por vía intraabdominal glicocolato de sodio en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

20 La figura 33 muestra citotoxicidad de glicocolato de sodio para un ratón Balb/c cuando se ha administrado glicocolato de sodio a través de la vena de la cola del ratón en el ejemplo 10 de la presente invención, con fines comparativos.

[Mejor modo]

25 A continuación la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos siguientes. Los ejemplos se proporcionan solo para ilustrar la presente invención y no son limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1. Ensayo de inhibición de la interacción entre lipopolisacárido (LPS) de E. coli marcado con fluoresceína y una célula de ovario de hámster chino (CHO)

30 Se usaron LPS de E. coli marcado con difluoruro de boro-dipirrometeno (BODIPY), una fluoresceína, y células CHO. El LPS marcado con BODIPY se hizo reaccionar con glicocolato de sodio en un tubo de vidrio a 37 °C durante 14 horas. Se plaquearon por pocillo 2×10^5 células CHO mezcladas con la solución de reacción en una placa de 96 pocillos y después se incubaron a 37 °C durante 14 horas. La solución incubada se tiñó con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) y después se analizó mediante un citómetro de flujo. El análisis se realizó al menos dos veces para cada grupo de tratamiento y los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante ensayo en t. El resultado fue $P < 0,05$ en comparación con el grupo experimental en el que las células CHO se trataron con solo BODIPY-LPS.

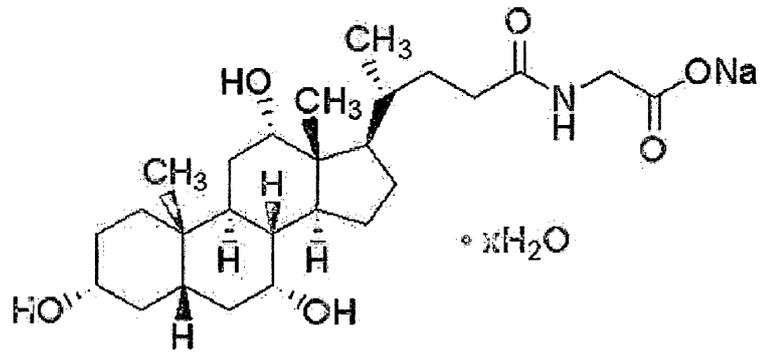
40 Se seleccionaron células 7-AAD(-) con el fin de analizar células vivas. Como se muestra en la figura 1, se confirmó que la cantidad de fluorescencia de BODIPY aumentó al aumentar la concentración de BODIPY-LPS. Por lo tanto, la interacción entre BODIPY-LPS y la célula se inhibió de acuerdo con el aumento de la concentración de glicocolato de sodio, y dicha eficacia de inhibición se redujo al aumentar la concentración de BODIPY-LPS (figura 1). Por consiguiente, se pudo concretar que la eficacia de la inhibición inflamatoria de glicocolato de sodio mostrada en la respuesta inflamatoria estimulada por LPS fue debida al bloqueo de la interacción entre LPS y células mediante la acción de glicocolato de sodio.

45 Ejemplo 2. Ejemplo de inhibición de la activación de estimulado por LPS de E. coli

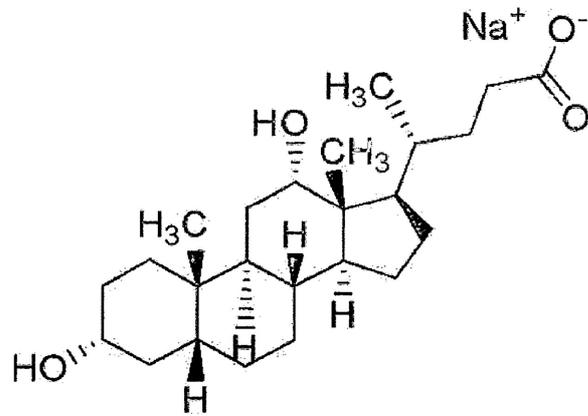
50 Con el fin de evaluar la eficacia de inhibición de la activación de estimulado por LPS de E. coli en una célula CHO, se evaluó el % de expresión de CD 25 en la célula CHO mediante el procedimiento siguiente, y se llevó a cabo un análisis de FACS después de tinción con 7-AAD para evaluar la citotoxicidad. Se clasificaron sales biliares en 3 grupos en base a su solubilidad en diferentes disolventes del modo siguiente:

55 Grupo I. Productos químicos solubles en agua: hidrato de glicocolato de sodio, desoxicolato de sodio, glicoquenodesoxicolato de sodio, tauroquenodesoxicolato de sodio, hidrato de taurocolato de sodio, hidrato de taurodesoxicolato de sodio

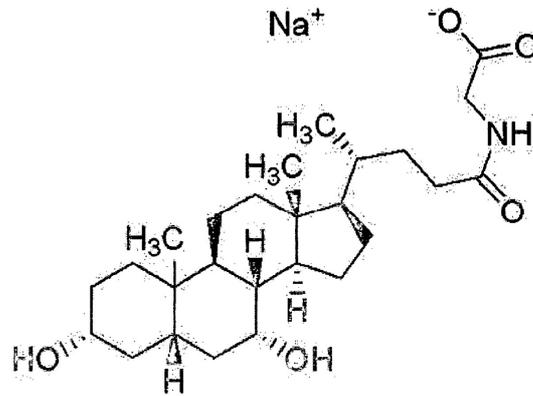
Hidrato de glicocolato de sodio



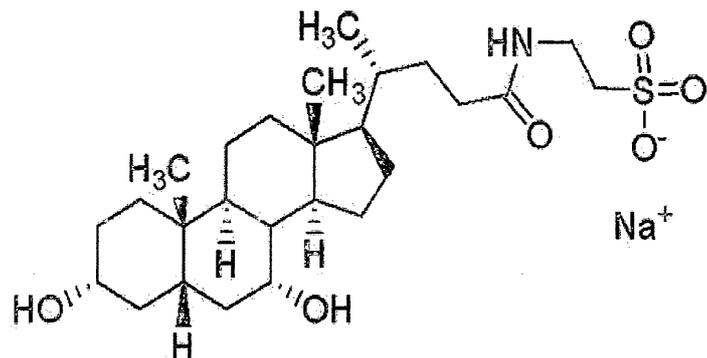
Desoxicolato de sodio



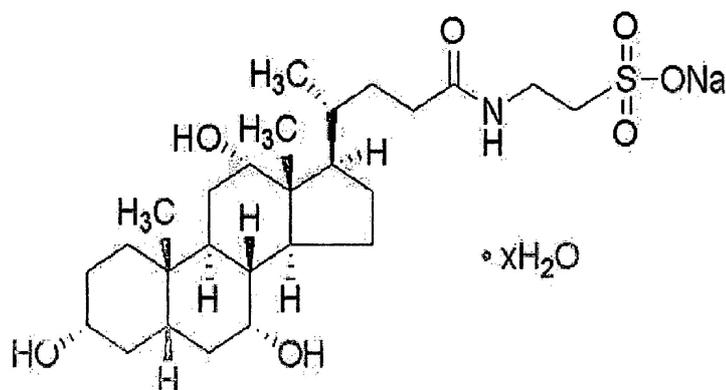
Glicoquenosodesoxicolato de sodio



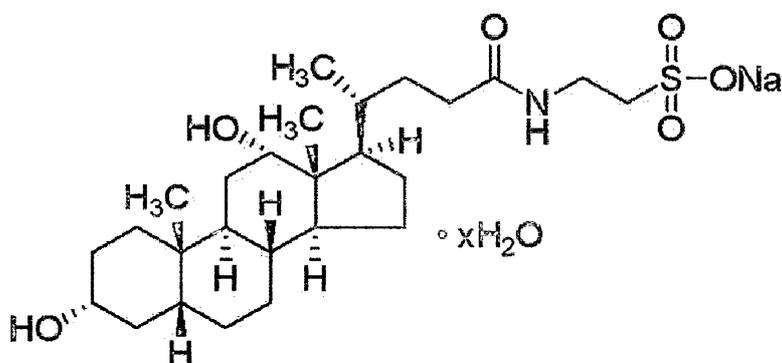
Tauroquenosodesoxicolato de sodio



Hidrato de taurocolato de sodio



Hidrato de taurodesoxicolato de sodio



Grupo II. Productos químicos solubles en etanol: ácido deshidrocólico, ácido litocólico, ácido quenodesoxicólico, hidrato de ácido glicocólico

10 Grupo III. Producto químico soluble en metanol: ácido cólico

- Cultivo y estimulación de células

15 Se usaron para este experimento las células CHO que expresan CD25 bajo la regulación de un promotor del factor nuclear (NF- κ B), mostradas en la figura 2A. También se usaron un receptor tipo toll 2 (TLR2) y células CHO transformadas con gen CD 14 (en adelante denominadas "células 3FP").

20 Las células 3FP que se cultivaron selectivamente con medio basal F-12 de Ham (que contenía el 5 % de FBS, 0,584 g/l de L-glutamina, penicilina-estreptomina, 400 μ g/ml de higromicina, 50 μ g/ml de G418 y 50 μ g/ml de gentamicina) se separaron de la solución de cultivo con tripsina-DETA, y se sembraron a 3×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y después se cultivaron durante 18 h. Al día siguiente, las células cultivadas se trataron con derivados de ácido biliar y LPS, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 15 h a 37 °C.

- Experimento de citometría de flujo

25 Después de estimular las células incubadas anteriormente durante 15 h, la solución de cultivo se centrifugó (1200 rpm, 5 min, 4 °C) para eliminar el sobrenadante del cultivo.

30 El precipitado se lavó dos veces con 200 μ l de tampón FACS (1x PBS que contenía el 1 % de BSA y EDTA 1 mM). Se añadieron 20 μ l de solución de bloqueo (PBS que contenía 1:10 de suero de ratón normal y 1:3 de CD14/CD32 antihumano (BD, 2.4G2) a cada pocillo y se hizo reaccionar sobre hielo durante 30 min. Una solución mixta de CD25 antihumano-PE (1:16) y CD14 antihumano-FITC (1:32) se añadió a cada pocillo y se hizo reaccionar sobre el hielo durante 30 min. La mezcla de reacción se lavó dos veces con 200 μ l de tampón FACS y después se añadieron 200 μ l de 7-AAD (1:20) a la mezcla de reacción. Después de hacer reaccionar la mezcla de reacción sobre el hielo durante 10 min se analizaron la eficacia de la expresión de CD25 y la citotoxicidad usando un citómetro de flujo.

- Evaluación de la influencia de sales biliares en la eficacia de expresión de CD25 estimulada por LPS

1) Grupo I. Productos químicos solubles en agua:

Según los resultados de investigación de la expresión de CD25 de células 3FP estimuladas por LPS de 7AAD(-) vivas, el glicoquenodesoxicolato de sodio, el tauroquenodesoxicolato de sodio, el hidrato de taurocolato de sodio, el hidrato de taurodesoxicolato de sodio, el desoxicolato de sodio, además del hidrato de glicocolato de sodio, entre los derivados de ácido biliar, mostraron un efecto de inhibición para la expresión de CD25 estimulada por LPS (activación de NF- κ B) (figura 2B y figura 3 a figura 8).

Con el fin de analizar células vivas, se seleccionaron células 7-AAD(-) y se confirmó la activación del factor de transcripción nuclear mediante el aumento de la expresión de CD25. Como muestra la figura 2B, la activación del factor de transcripción nuclear de células 3FP por LPS se inhibió dependiendo de la concentración de glicocolato de sodio. El factor de transcripción nuclear se inhibió para ser el 21,7 \pm 0,9 % ($p < 0,05$) con la presencia de 0,5 mg/ml de glicocolato de sodio, y para ser el 88,2 \pm 1,2 % ($p < 0,05$) con la presencia de 1 mg/ml de glicocolato de sodio.

2) Grupo II. Productos químicos solubles en etanol

Según los resultados de la investigación de la expresión de CD25 de células 3FP estimuladas con LPS de &AAD(-) vivas, el ácido deshidrocólico, el hidrato de ácido glicocólico, el ácido litocólico y el ácido quenodesoxicólico entre los derivados de ácido biliar, mostraron efectos de inhibición sobre la expresión de CD25 (activación de NF- κ B) (figura 6 y figura 7).

3) Grupo III. Producto químico soluble en metanol:

Según los resultados de la investigación de la expresión de CD25 de células 3FP estimuladas con LPS de 7AAD(-) vivas, el ácido cólico, entre los derivados de ácido biliar, disuelto en metanol, mostró efectos de inhibición (figura 8).

Ejemplo 3. Ensayo de inhibición de glicocolato de sodio sobre LPS que activa células dendríticas

Con el fin de analizar el efecto de glicocolato de sodio sobre el procedimiento de activación de células presentadoras de antígeno, que está inducido por LPS de E. coli, se separaron células de la médula ósea de ratón deficiente en gen 2 (Rag2) activador de la recombinación. Las células separadas se plaquearon a 2×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y después se trataron con 1,5 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y 0,75 ng/ml de interleucina-4, acción seguida por la diferenciación de las células en células dendríticas mediante una incubación de 6 días.

Las células dendríticas se mezclaron bien con glicocolato de sodio y LPS. Las mezclas se estimularon durante 18 horas a 37 °C, y se tiñeron con anti-CD40-FITC, anti-CD80-FITC, anti-I-Ab-PE, anti-CD86-PE, 7AAD y anti-CD11c-APC, después las células se analizaron mediante un citómetro de flujo. Cada grupo se trató y se analizó al menos dos veces, y los resultados se analizaron estadísticamente mediante ensayo en t. Los resultados fueron $p < 0,05$ en comparación con los grupos experimentales tratados con solo LPS.

Como se muestra en las figuras 9 a 11, con el fin de analizar solo células dendríticas vivas, se seleccionaron células CD11c(+)/7AAD(-) y después se analizaron las expresiones de moléculas coestimulantes de células dendríticas y I-Ab. La expresión aumentada de CD40, CD80, CD86 y I-Ab mediante 100 ng/ml de LPS de E. coli se inhibió en función de la concentración de glicocolato de sodio y también se inhibió en función de la concentración de tauroquenodesoxicolato de sodio y de hidrato de taurodesoxicolato de sodio. En consecuencia, se mostró que las células dendríticas se inhibieron significativamente mediante LPS.

Ejemplo 4. Ensayo de generación de citocina proinflamatoria in vitro mediante LPS de E. coli

Con el fin de analizar el efecto de glicocolato de sodio sobre la generación de citocinas proinflamatorias inducida por LPS de E. coli se prepararon células dendríticas del mismo modo que en el ejemplo 3 y se separaron macrófagos del abdomen de ratón C57BL/6. A continuación, se hicieron reaccionar glicocolato de sodio y LPS in vitro durante 1 hora a 37 °C, y después se mezclaron con las células.

Cada célula se estimuló durante 14 horas a 37 °C, y después el líquido sobrenadante se separó.

Las concentraciones de TNF- α e interleucina-12p40 en el líquido sobrenadante separado se midieron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

La generación de TNF- α a partir de los macrófagos y las células dendríticas mediante la estimulación con LPS se inhibió para ser el 42,2 \pm 0,9 % ($p < 0,05$) y el 70,2 \pm 2,3 % ($p < 0,05$) y el 101,0 \pm 0,2 % ($p < 0,05$) respectivamente a 1 mg/ml de glicocolato de sodio. También se demostró que, en la generación de interleucina-12p40 por LPS, los macrófagos y las células dendríticas se inhibieron para ser el 9,8 \pm 11,0 % ($p < 0,05$) y el 4,7 \pm 3,1 % ($p < 0,05$) respectivamente a 0,5 mg/ml de glicocolato de sodio, y el 54,3 \pm 4,1 % ($p < 0,05$) y el 106,6 \pm 1,3 % ($p < 0,05$) respectivamente a 1 mg/ml de glicocolato de sodio (figura 12).

Cada grupo se trató y se analizó al menos dos veces, y los resultados se analizaron estadísticamente mediante ensayo en t. Los resultados fueron $p < 0,05$ en comparación con los grupos experimentales tratados solo con LPS.

5 Ejemplo 5. Ensayo de inhibición de la generación de óxido nítrico (NO) en células dendríticas y macrófagos por LPS de E. coli

10 Con el fin de analizar el efecto de glicocolato de sodio sobre la generación de NO, un factor citotóxico, inducido por LPS, se prepararon células dendríticas del mismo modo que en el ejemplo 4. Las células dendríticas se trataron con glicocolato de sodio, tauroquenodesoxicolato de sodio e hidrato de taurodesoxicolato de sodio, respectivamente, y después se estimularon por LPS durante 18 horas a 37 °C. Después, las mezclas de células dendríticas resultantes se plaquearon, a 100 ml cada una, en una placa de 96 pocillos. Se añadieron a cada pocillo reactivos de Griss y la placa de 96 pocillos se cubrió con láminas y se mantuvo reaccionando durante 15 minutos a temperatura ambiente.

15 Se midió la absorbancia a 540 nm usando un lector de ELISA. También se trataron macrófagos separados del abdomen con glicocolato de sodio, tauroquenodesoxicolato de sodio y taurodesoxicolato de sodio, respectivamente, y después se estimularon con LPS durante 18 horas. A continuación, se realizaron a los macrófagos los mismos experimentos que a las células dendríticas.

20 Como se muestra en la figura 13A y la figura 14A, la generación de NO por los macrófagos y las células dendríticas estimuladas por LPS se inhibió mediante glicocolato de sodio. La generación de NO mediante los macrófagos y células dendríticas estimulada por LPS se inhibió también mediante tauroquenodesoxicolato de sodio e hidrato de taurodesoxicolato de sodio, tal como se muestra en la figura 13B, la figura 13C, la figura 14B y la figura 14C. Considerando estos resultados, pudo entenderse que los 3 derivados de ácido biliar anteriores inhiben la generación de NO que desempeña un papel importante en la progresión de inflamación.

25

Ejemplo 6. Ensayo de inhibición de la activación de linfocito T mediado por célula dendrítica por LPS de E. coli

30 Las células presentadoras de antígeno activadas por LPS activan linfocitos T. Se analizó si las células dendríticas bloqueadas por glicocolato de sodio pueden activar linfocitos T cuando el LPS activa células dendríticas. Las células se recolectaron de la médula ósea de ratón macho deficiente en Rag2. Las células recolectadas se plaquearon a 4×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se trataron con 1,5 ng/ml de factores estimulantes de colonias de granulocitos y 0,75 ng/ml de interleucina-4, y después se incubaron durante 6 días para que se diferenciaron en células dendríticas. Se hizo reaccionar glicocolato de sodio con LPS durante 1 hora a 37 °C, y después se mezcló con las células dendríticas. Las células dendríticas se estimularon durante 14 horas a 37 °C, y linfocitos T CD3+ y CD4+ separados de ratón Marilyn hembra que tenían receptor de linfocito T (TCR) específico de antígeno H-Y se incubaron con las células dendríticas durante 72 horas. Se añadió [3H]-metilimidina, a 1 μ Ci/pocillo, a la placa de 96 pocillos y después se incubó durante 18 horas. Las células se recolectaron de la placa de 96 pocillos y después se midió el CPM (recuento por minuto) por medio de un contador beta.

40

45 La proliferación de linfocitos T mediados por células dendríticas se inhibió para ser el $104,9 \pm 3,2$ % ($p < 0,05$) a 1 mg/ml de glicocolato de sodio (figura 15). La proliferación de linfocitos T por LPS o glicocolato de sodio no se observó en grupos experimentales en los que se incubaron solo células dendríticas o linfocitos T. En consecuencia, se entendió que la actividad de células dendríticas inducida por LPS y, por lo tanto, la actividad de linfocitos T mediados por células dendríticas se inhibió ($p < 0,05$).

Ejemplo 7. Ensayo de protección de glicocolato de sodio en modelo de ratón LPS de sepsis, con fines comparativos

50 Con el fin de analizar la capacidad de neutralización de glicocolato de sodio al LPS, se usaron por cada grupo tres ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad. Se administraron 20 mg/kg y 10 mg/kg de LPS al abdomen del ratón con el fin de medir la DL50 de LPS. Se observó que 20 mg/kg de LPS es la concentración más óptima para el ensayo de protección (figura 16). Se analizó la capacidad de neutralización in vitro de glicocolato de sodio al LPS. La tasa de supervivencia se midió después de administrar 20 mg/kg de LPS al abdomen de ratones y después se administraron 12,5 mg/kg de glicocolato de sodio, y 20 mg/kg de LPS y 50 mg/kg de glicocolato de sodio respectivamente dos veces al abdomen de ratones, respectivamente. Mientras que todos los ratones del grupo de control negativo murieron antes de 60 horas después de la administración de LPS en el abdomen, el grupo experimental al que se administraron 12,5 mg/kg y 50 mg/kg de glicocolato de sodio después de 1 hora y 6 horas a partir de la administración de LPS respectivamente, mostraron que la tasa de supervivencia de ratones fue del 40 % y del 60 % respectivamente (figura 17).

60

Ejemplo 8. Ensayo de inhibición de la generación in vivo de citocina antiinflamatoria por LPS

65 Tal como se ha descrito en el ejemplo 7, se administraron 20 mg/kg de LPS al abdomen de ratones y después se administraron 12,5 mg/kg de glicocolato de sodio, y 20 mg/kg de LPS y 50 mg/kg de glicocolato de sodio respectivamente dos veces al abdomen de ratones, respectivamente. En el momento predeterminado se recogió sangre de la cola del ratón y después se obtuvo suero por centrifugación (2400xg, 10 min). El cambio de expresión

de citocinas en el suero se midió usando el kit de matriz citométrica de microesferas (CBA).

Se redujeron IL-12p70 y IFN-g después de 4 horas, 8 horas y 12 horas desde la administración de glicocolato de sodio (figura 18 y figura 19), y se redujeron significativamente TNF- α , MCP-1 y IL-6 después de 12 horas, 24 horas y 48 horas desde la administración de glicocolato de sodio (figura 21, figura 22 y figura 23). La IL-10, que es una citocina antiinflamatoria, se redujo significativamente en el grupo experimental al que se administró glicocolato de sodio (figura 20).

Ejemplo 9. Ensayo del efecto antiinflamatorio de glicocolato de sodio como aditivo de solución conservante para trasplante de órganos, con fines comparativos

Se evaluó el efecto de glicocolato de sodio en la respuesta inflamatoria y la función renal en un modelo de lesión renal de isquemia-reperfusión. Se usaron cinco ratas macho Sprague-Dawley (SD) de 6 semanas de edad por cada grupo y no se suministró a las ratas alimentos y agua desde el día 1 antes del experimento. Las ratas se anestesiaron mediante la administración de 1 mg de avertina (tribromoetanol/hidrato de amilo)/100 g de rata al abdomen de las ratas, y después se laparotomizaron. Todo el flujo de sangre al riñón izquierdo se bloqueó mediante pinzamiento de la aorta y la vena cava usando pinzas vasculares. Antes de inyectar la solución conservante de órganos, se penetró una vena del riñón izquierdo para minimizar el daño físico del riñón debido a la presión de la solución conservante. A continuación, después de haber inyectado histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK) o una solución mixta de HTK y 0,5 mg/ml de glicocolato de sodio, a 4 ml/rata, en la vena, la parte dañada de la vena se suturó usando 10-0 puntos de sutura. Después de 30 min de mantenimiento del estado anterior, las pinzas vasculares se retiraron y la parte laparotomizada se suturó. Después de 24 horas de reperfusión, la rata operada se anestesió de nuevo, y se recogió una muestra de sangre del corazón para preparar plasma o suero. El grupo de operación de simulación se operó del mismo modo que anteriormente excepto el procedimiento de tratamiento de HTK o solución de HTK que contenía glicocolato de sodio (HTKN), y toda la operación se repitió al menos tres veces. La concentración de IL-6 en el suero se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima y las concentraciones de nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (Cre) y aspartato aminotransferasa (AST) en el plasma se midieron mediante un analizador automático.

Para la lesión de isquemia-reperfusión, la concentración de IL-6 en el grupo experimental tratado con solución de HTK fue de 466 ± 218 pg/ml, y la concentración de IL-6 en el grupo experimental tratado con solución de HTKN fue de 260 ± 144 pg/ml ($p=0,08$ en comparación con el grupo experimental tratado con solución de HTK). En consecuencia, se confirmó que se inhibió la respuesta inflamatoria (figura 24). Además, las concentraciones de BUN, Cre y AST, que son la indicación de función renal, en el grupo tratado con HTK fueron significativamente inferiores a las del grupo tratado con HTKN, lo que indica que el glicocolato de sodio inhibió la lesión renal de isquemia-reperfusión (figura 24).

Ejemplo 10. Ensayo de toxicidad

Se analizó la citotoxicidad de glicocolato de sodio hacia las células CHO, células dendríticas, linfocitos T que se usaron en los ejemplos anteriores. El análisis FACS se realizó después de tinción con 7AAD. En primer lugar, se mantuvo glicocolato de sodio in vitro durante 1 hora a 37 °C, y después se mezcló con células. Se incubaron células CHO o células dendríticas durante 14 horas a 37 °C, y linfocitos T que se mezclaron con células dendríticas incubadas 14 horas, se incubaron durante 4 días. Después, cada una de las células se tiñó con 7AAD y se llevó a cabo un análisis celular usando un citómetro de flujo.

Con el fin de analizar la toxicidad de glicocolato de sodio hacia un ratón, se realizaron experimentos a cinco ratones macho C57BL/6 de 7 - 9 semanas de edad por grupo. Se mantuvo glicocolato de sodio disuelto en PBS in vitro durante 1 hora a 37 °C, y después la solución de glicocolato de sodio se administró en el abdomen de los ratones, acción seguida del análisis celular. Después de 1 hora desde la administración, las células abdominales se separaron y se tiñeron con 7AAD, y después se analizaron las células abdominales. Se usaron para un grupo de control positivo en tinción con 7ADD células que se congelaron y se descongelaron al menos cinco veces. Se analizaron los resultados experimentales mediante ensayo en t, y $P<0,05$ en comparación con el grupo experimental que no se trató con glicocolato de sodio.

Se aumento 7AAD(+) de células CHO (figura 25A), células dendríticas (figura 25B) y linfocitos T mediados por células dendríticas (figura 25C) en el 2-4 % con la presencia de glicocolato de sodio, en comparación con el grupo de control negativo, y 1 mg/ml de glicocolato de sodio no mostró citotoxicidad significativa (figura 25). Se confirmó también que la tasa de supervivencia de las células abdominales que se separaron del ratón al que se administraron 5 mg de glicocolato de sodio/rata (250 mg/kg de rata), no mostró una diferencia significativa con la del grupo de control al que se administró solo PBS (figura 25D).

Los mismos procedimientos que para la figura 25A se llevaron a cabo en la figura 26 - figura 31, y se realizaron experimentos de citotoxicidad sobre tres grupos de derivados de ácido biliar que se clasificaron en base a su solubilidad en diferentes disolventes. En comparación con grupos de control negativo de cada disolvente, no se mostró citotoxicidad significativa por parte de derivados de ácido biliar solubles en agua, derivados de ácido biliar

solubles en etanol y el derivado de ácido biliar soluble en metanol.

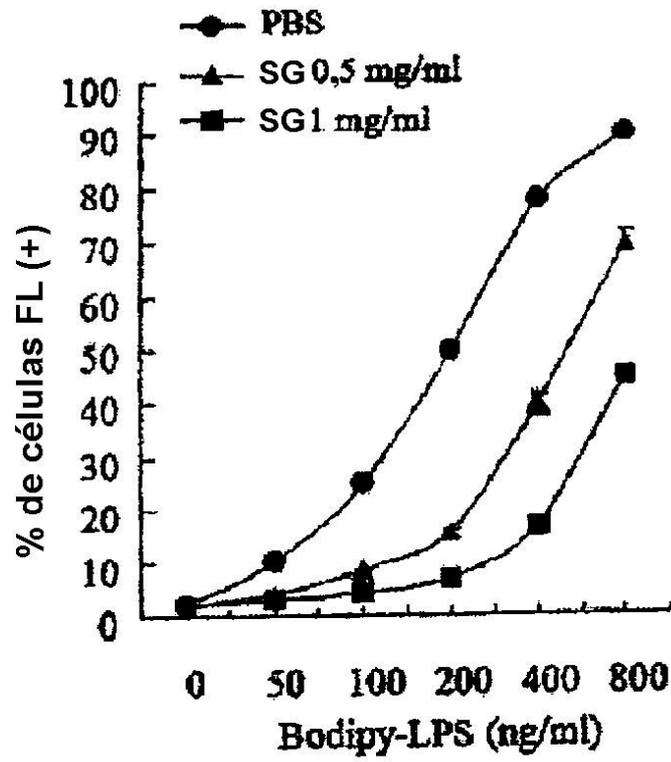
5 Se midió la toxicidad aguda usando cinco ratones Balb/c de 6 semanas de edad por grupo, a los que se administró una vez glicocolato de sodio, a diferentes concentraciones de glicocolato de sodio, en el abdomen y la vena de la cola. En el experimento de administración abdominal, el glicocolato de sodio mostró toxicidad a una concentración de glicocolato de sodio superior a 500 mg/kg. Sin embargo, a 250 mg/kg de glicocolato de sodio, concentración a la que se producen los efectos mencionados anteriormente de glicocolato de sodio, y a la concentración de glicocolato de sodio inferior a 250 mg/kg, el 100 % de los ratones sobrevivió (figura 32). También, el 100 % de los ratones sobrevivió a la concentración de glicocolato de sodio no superior a 150 mg/kg en el experimento en el que se administraron diferentes concentraciones de glicocolato de sodio en la vena de la cola de los ratones (figura 33).

10

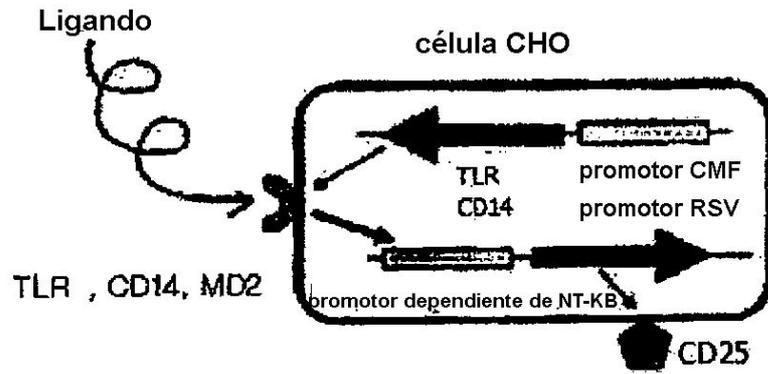
REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende taurodesoxicolato de sodio para su uso en el tratamiento o la prevención de sepsis.
- 5 2. El agente para su uso según la reivindicación 1, en el que la vía de administración de dicho agente es la vía parenteral o la vía de inyección.
3. El agente para su uso según la reivindicación 1, en el que la formulación de dicho agente es una solución o una suspensión líquida.

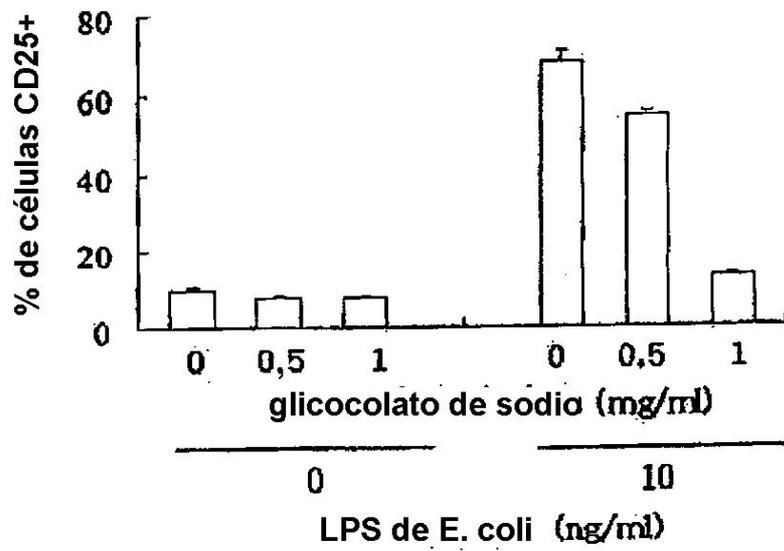
[Fig. 1]



[Fig. 2]



A



B

[Fig. 3]

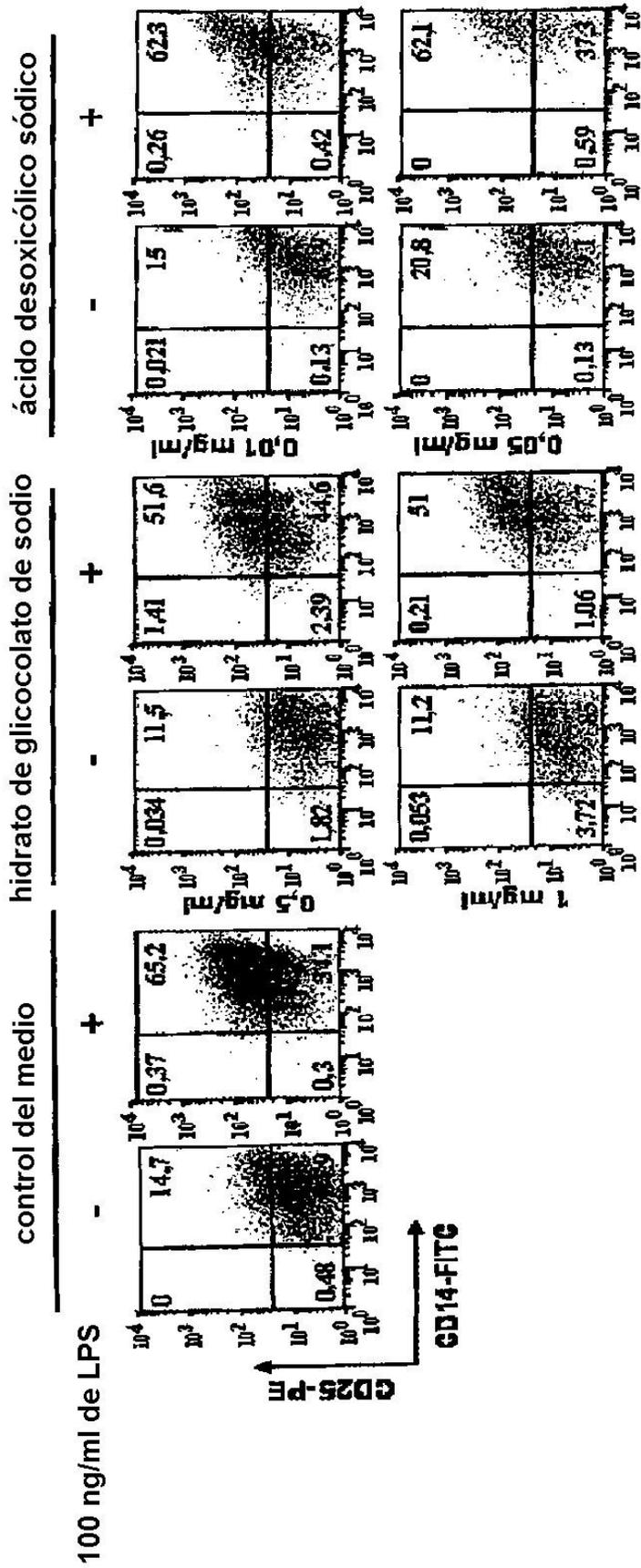
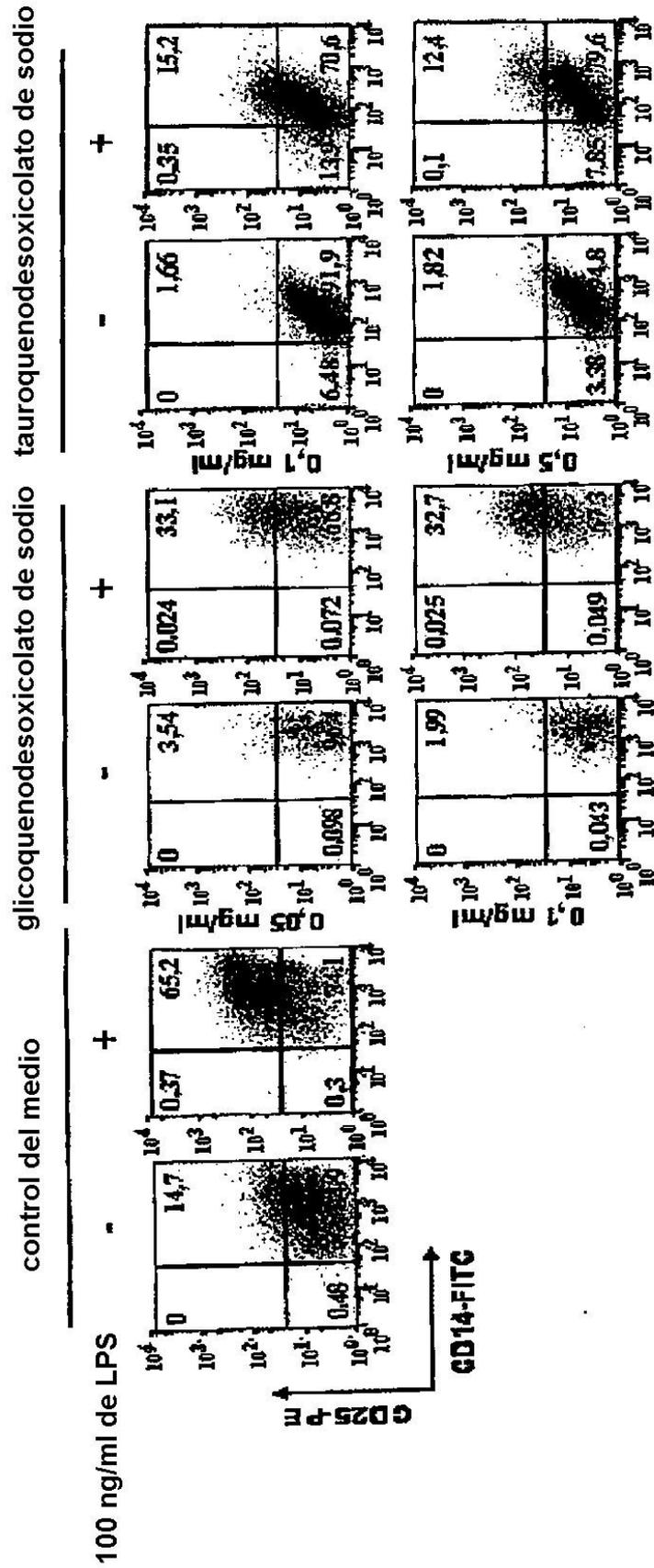
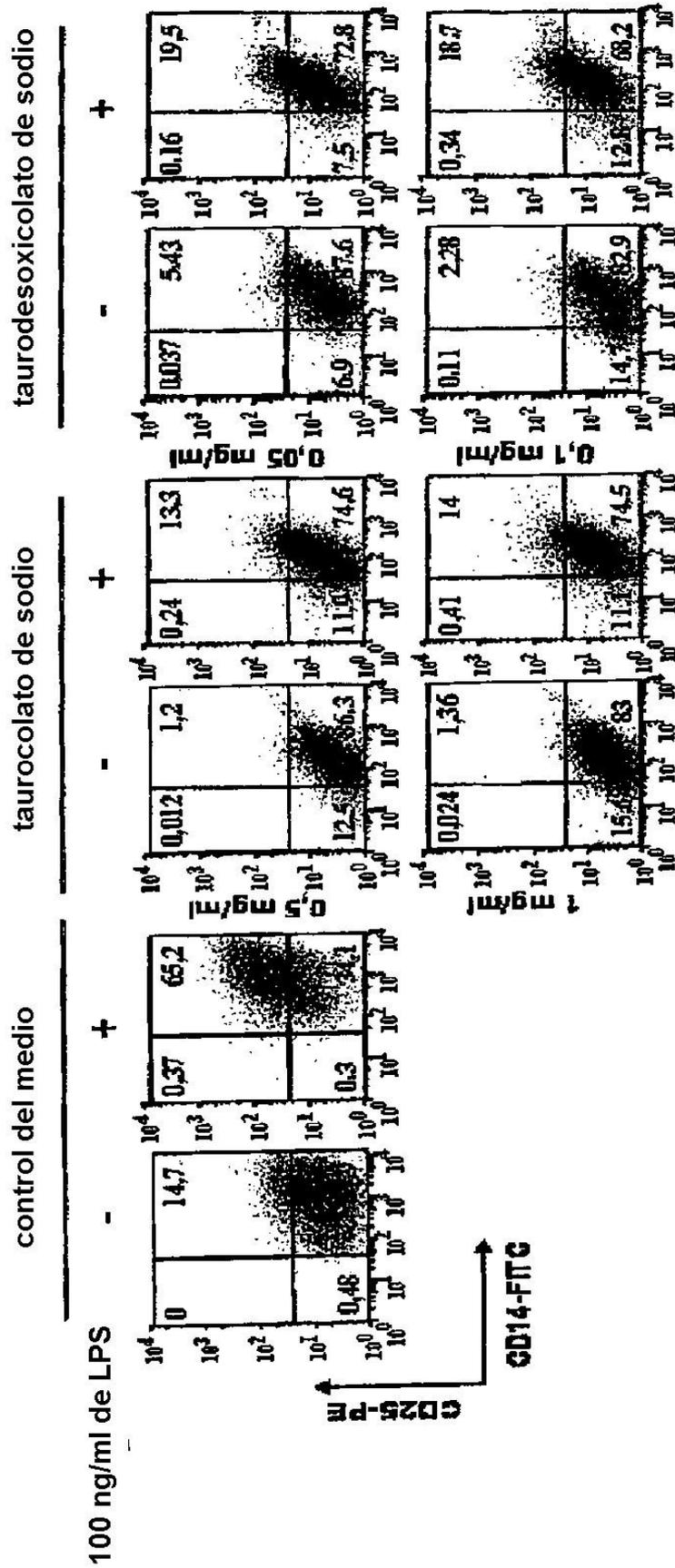


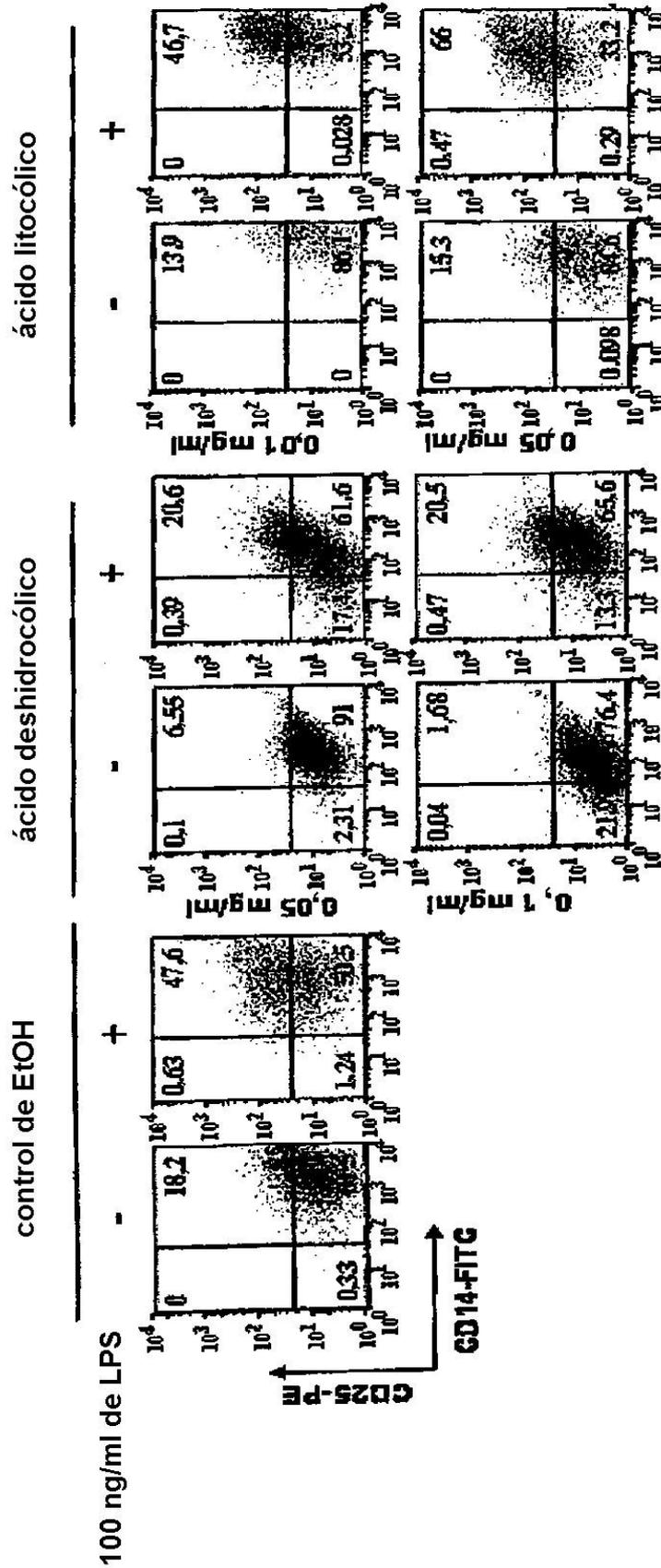
Fig. 4)



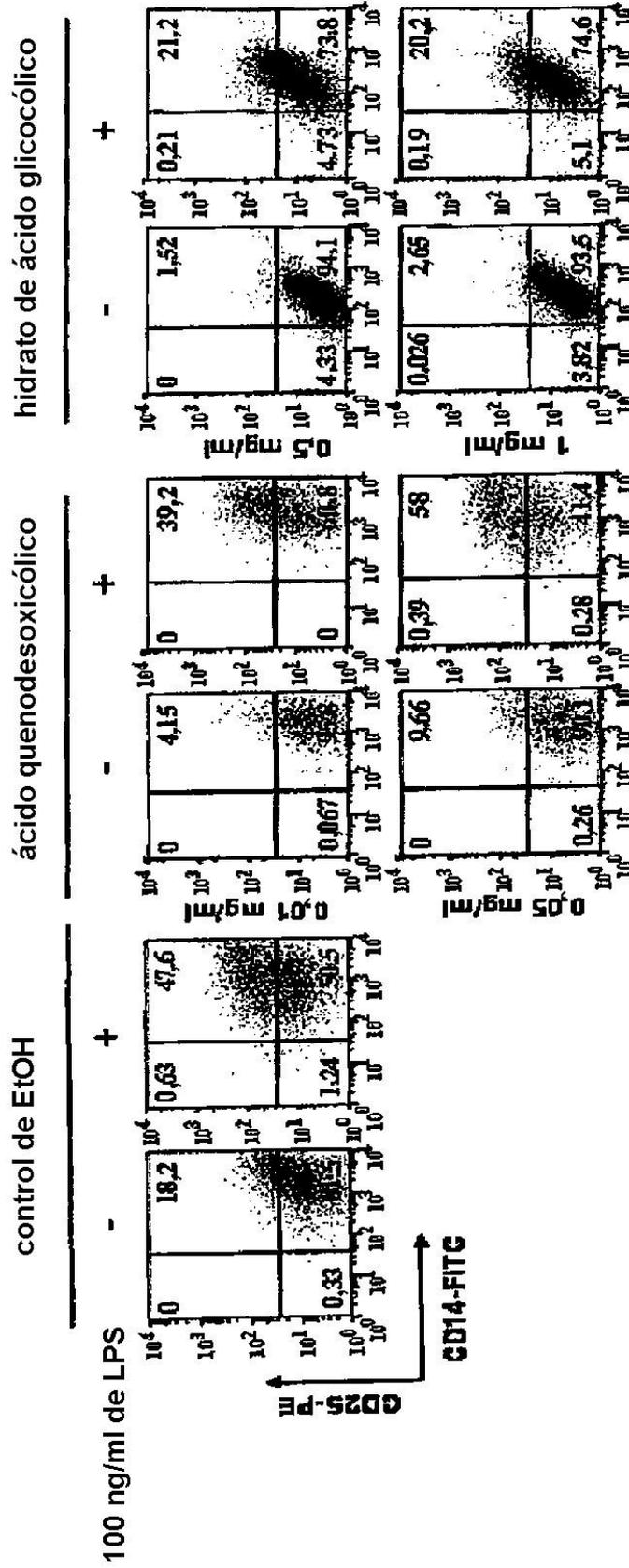
[Fig. 5]



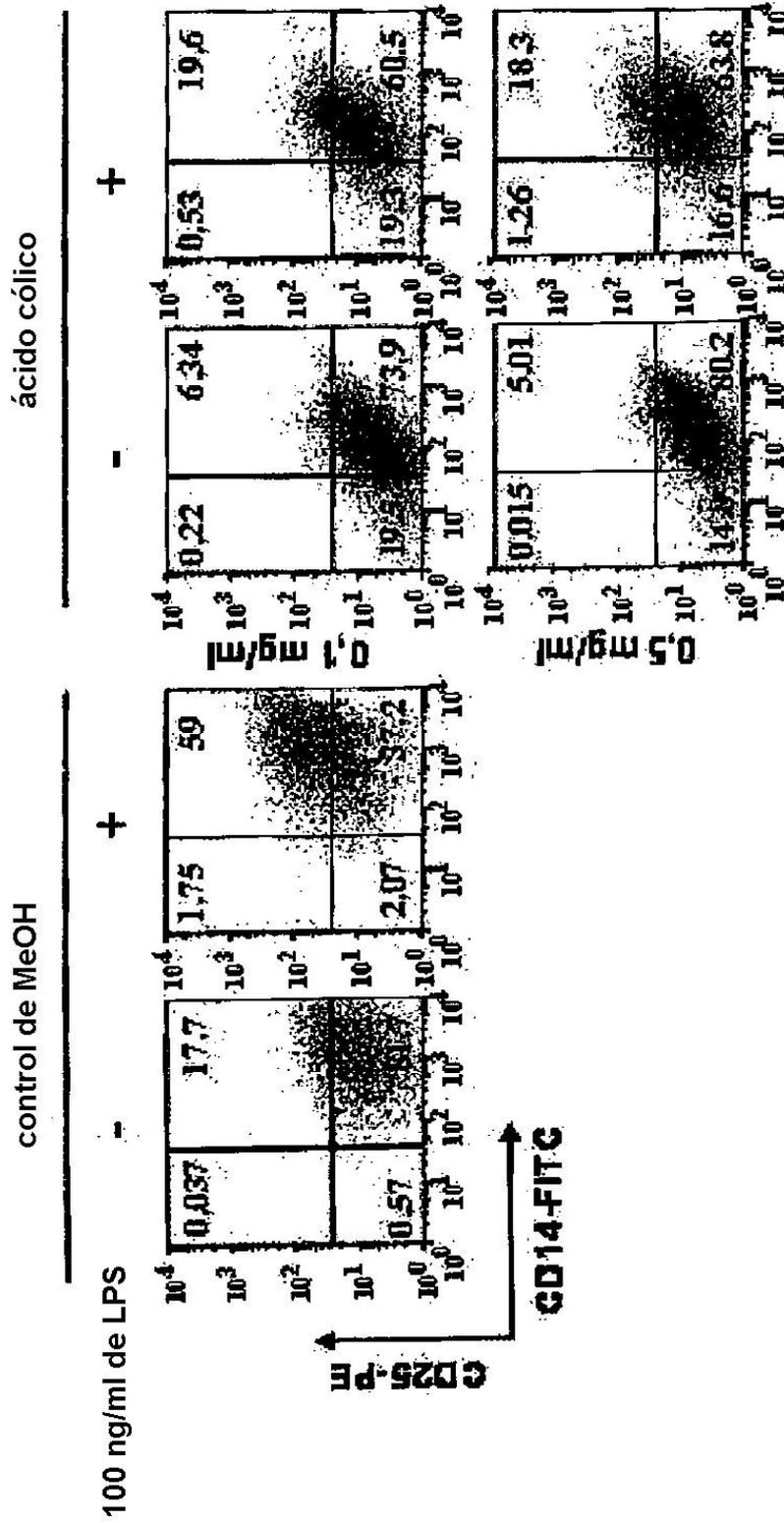
[Fig. 6]



[Fig. 7]

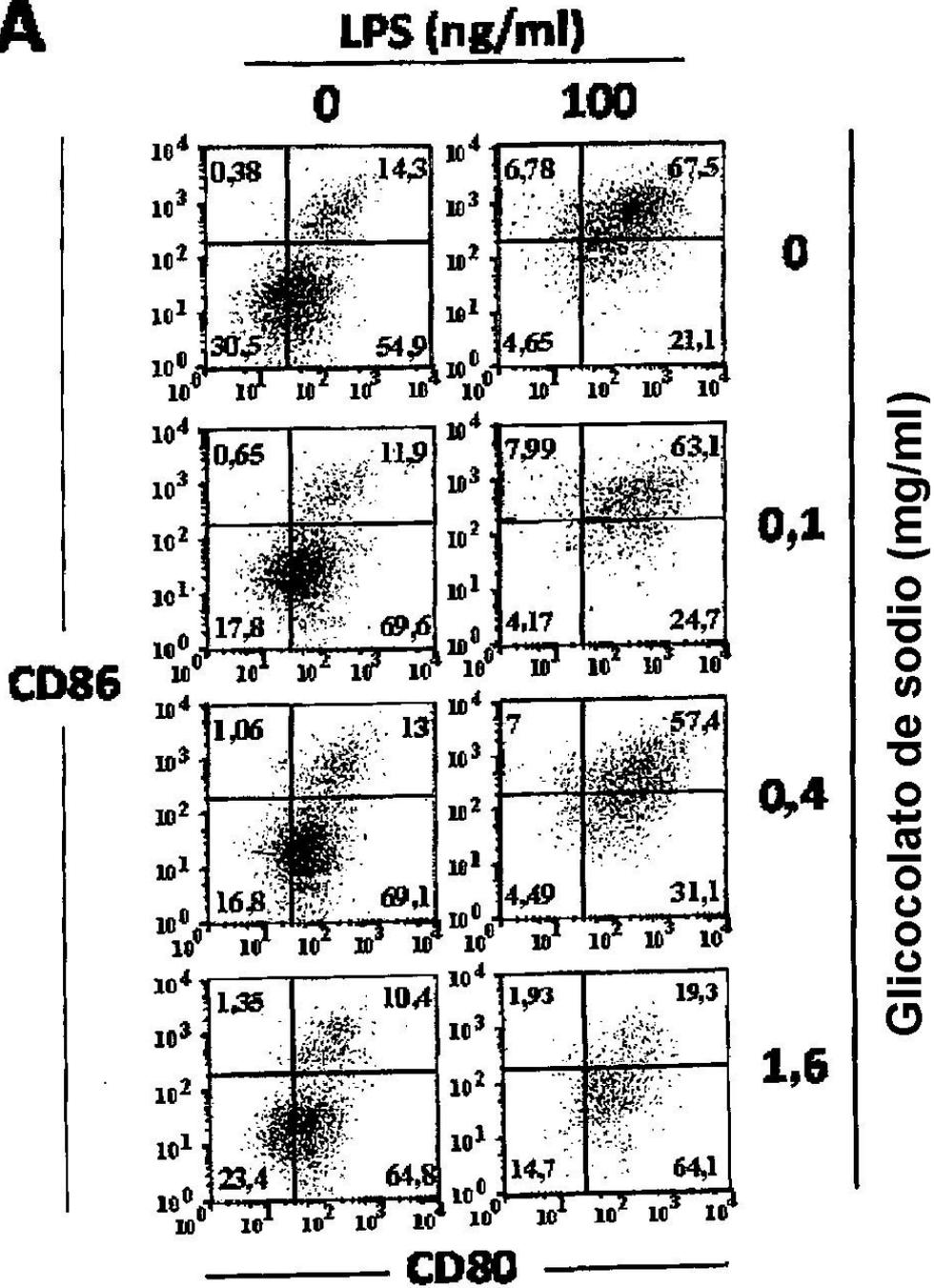


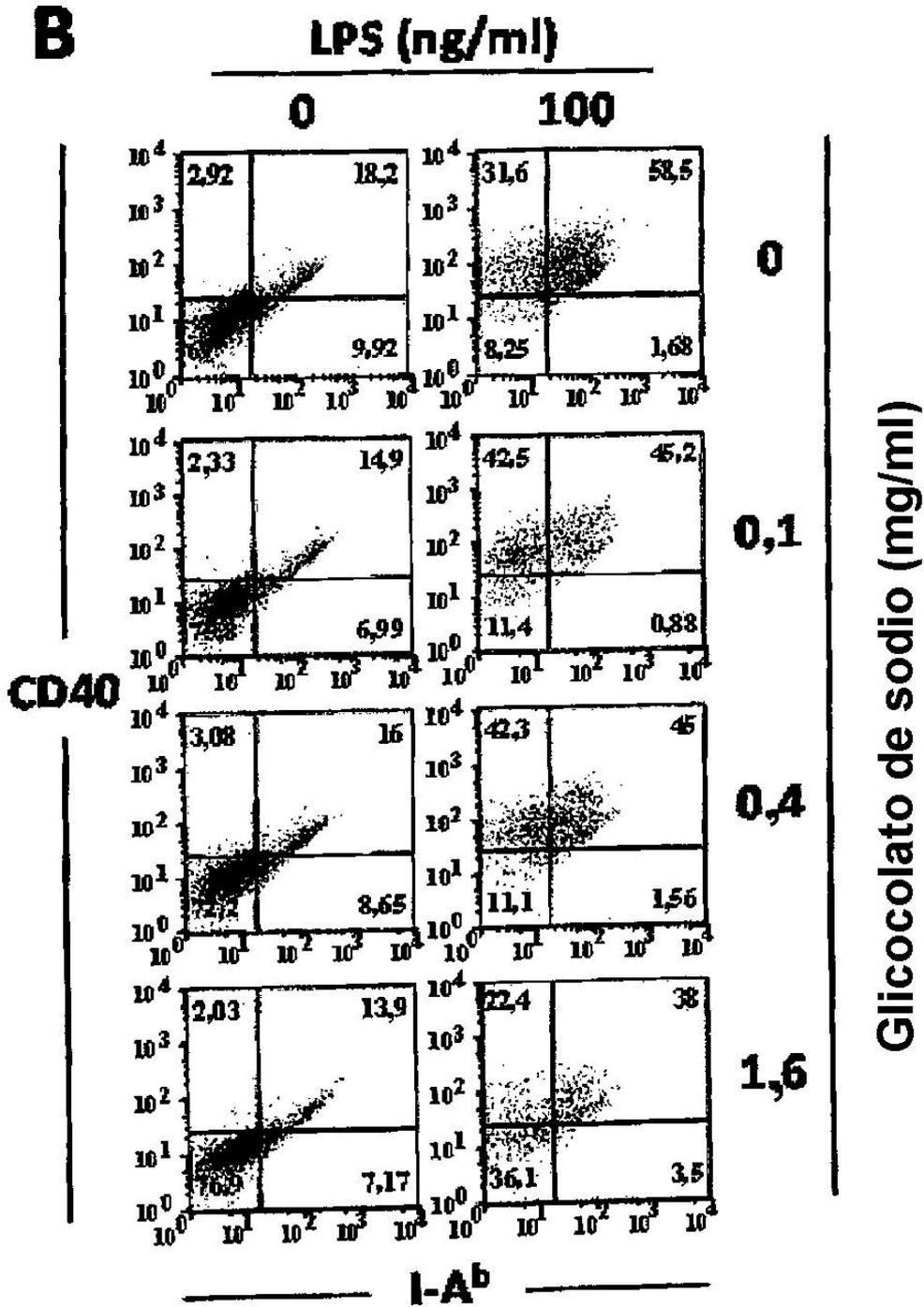
[Fig. 8]



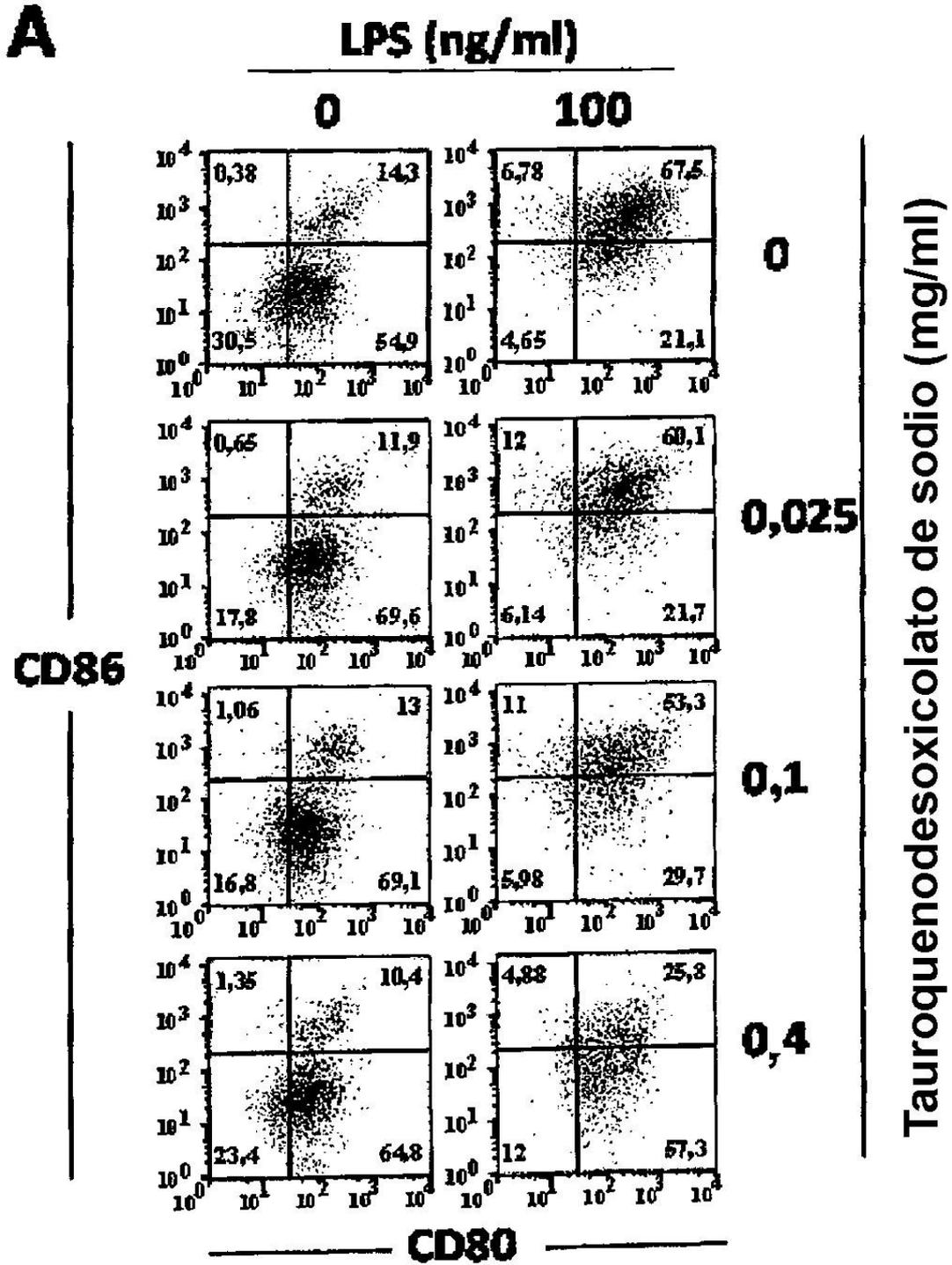
[Fig. 9]

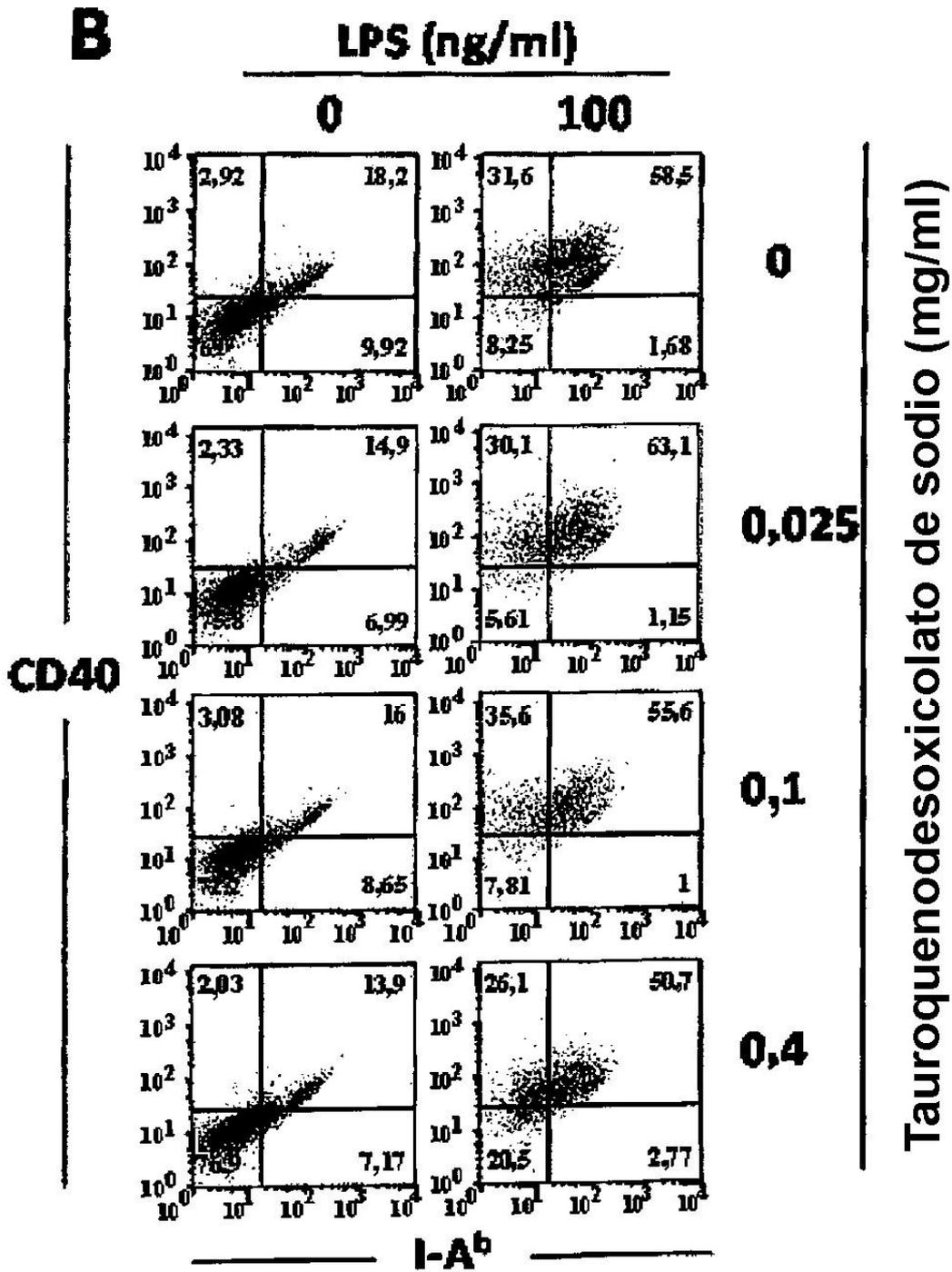
A



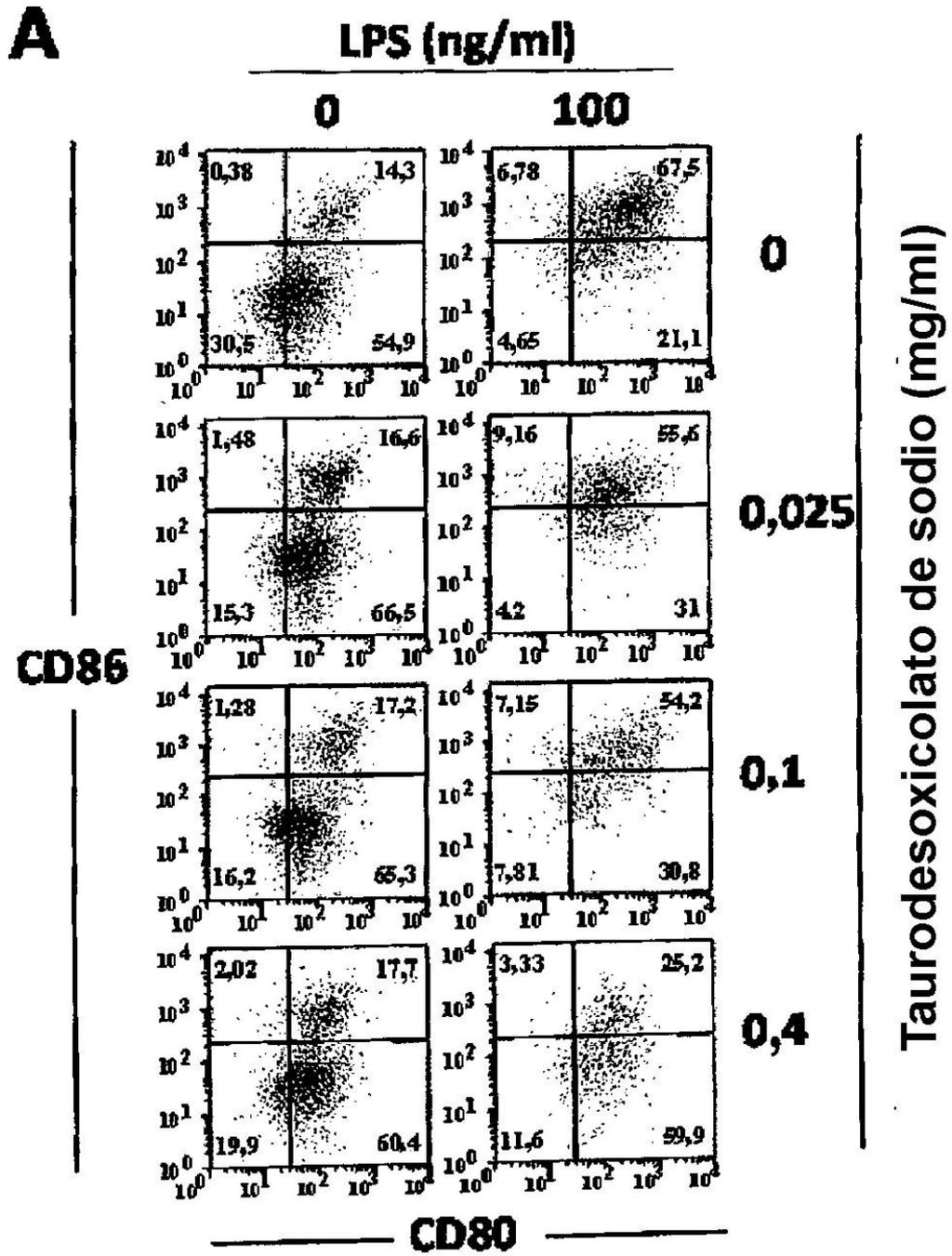


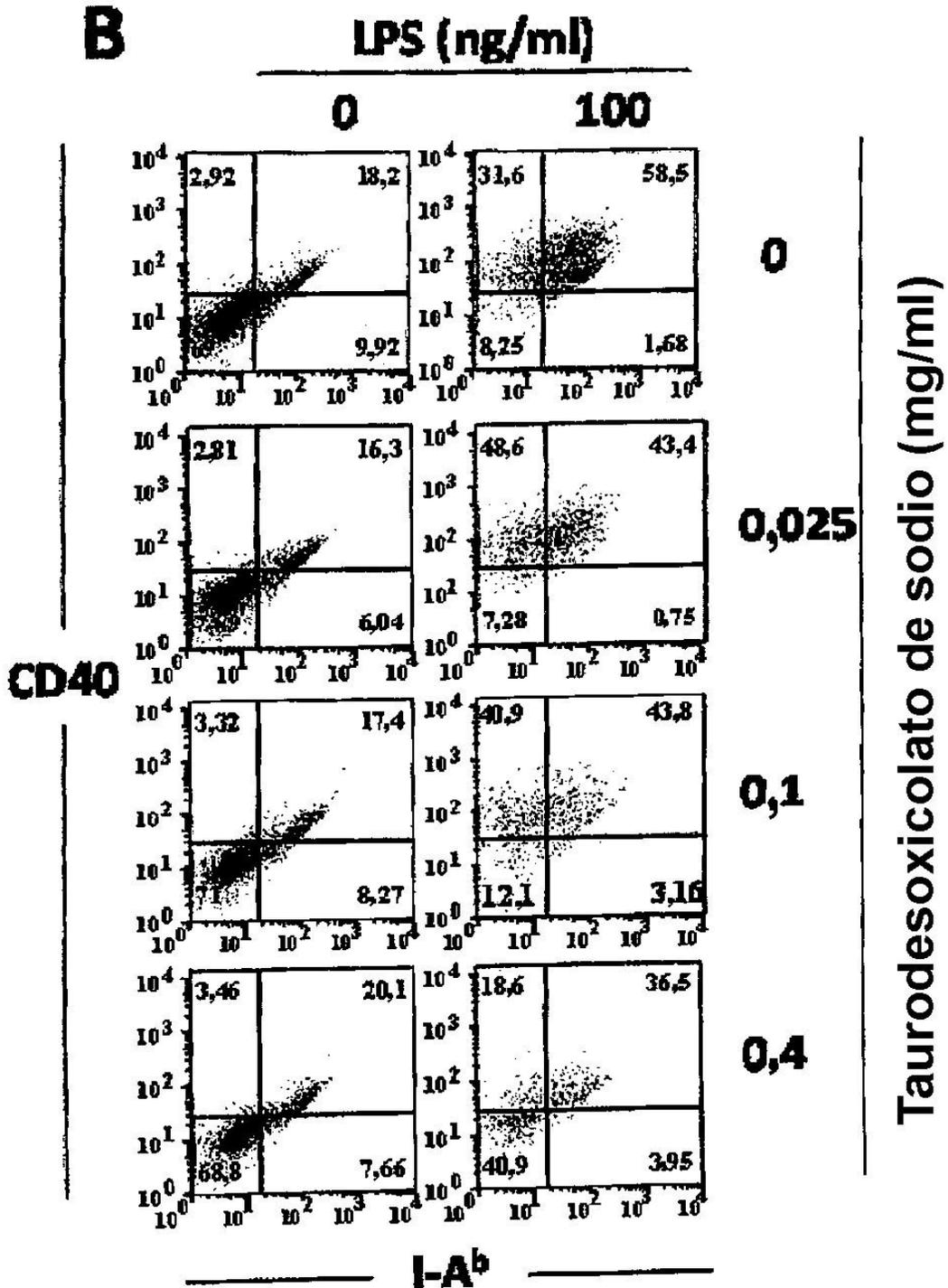
[Fig. 10]



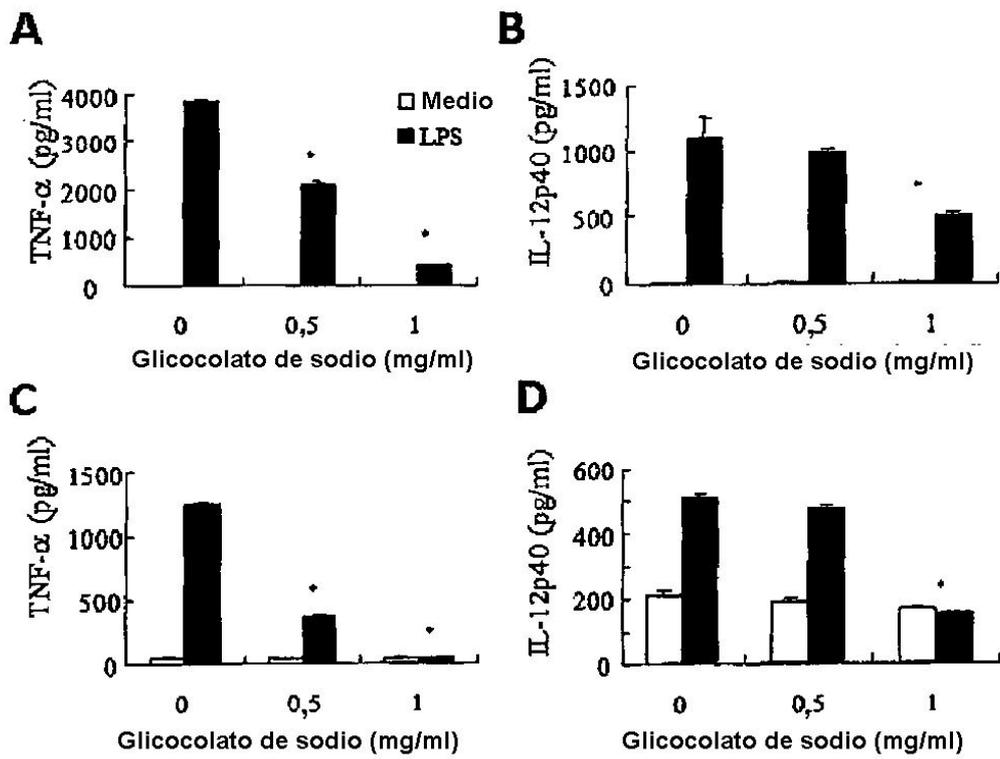


[Fig. 11]

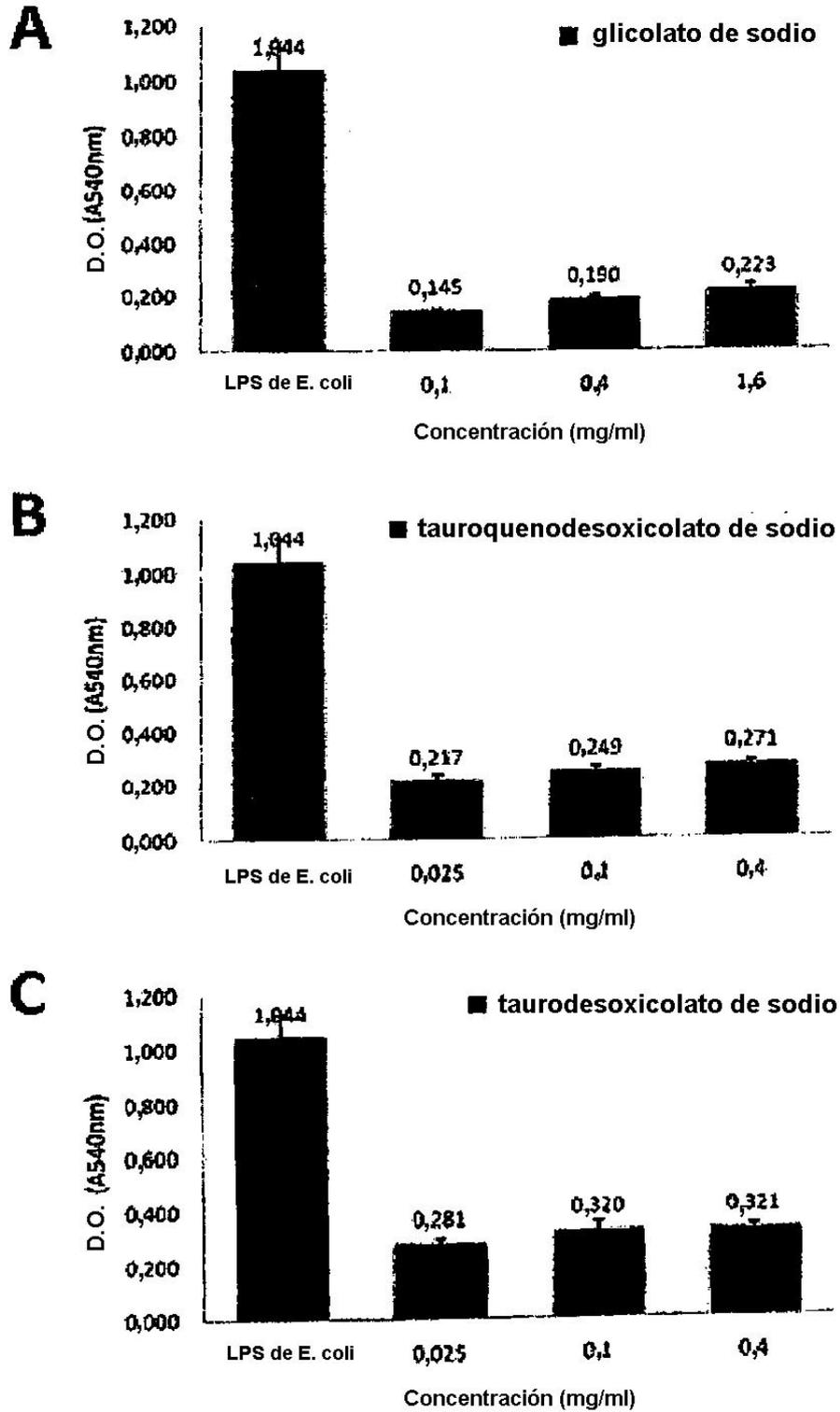




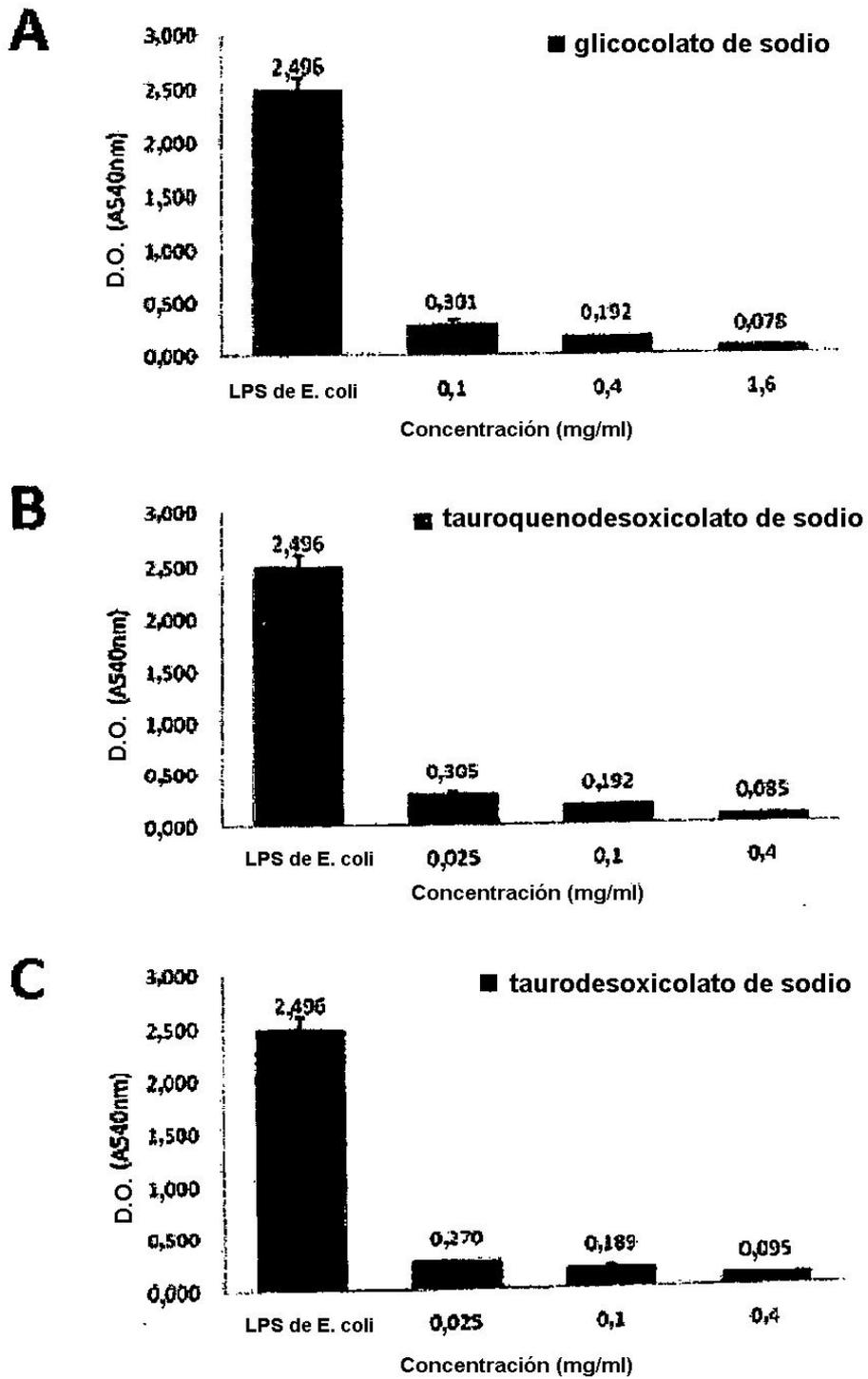
[Fig. 12]



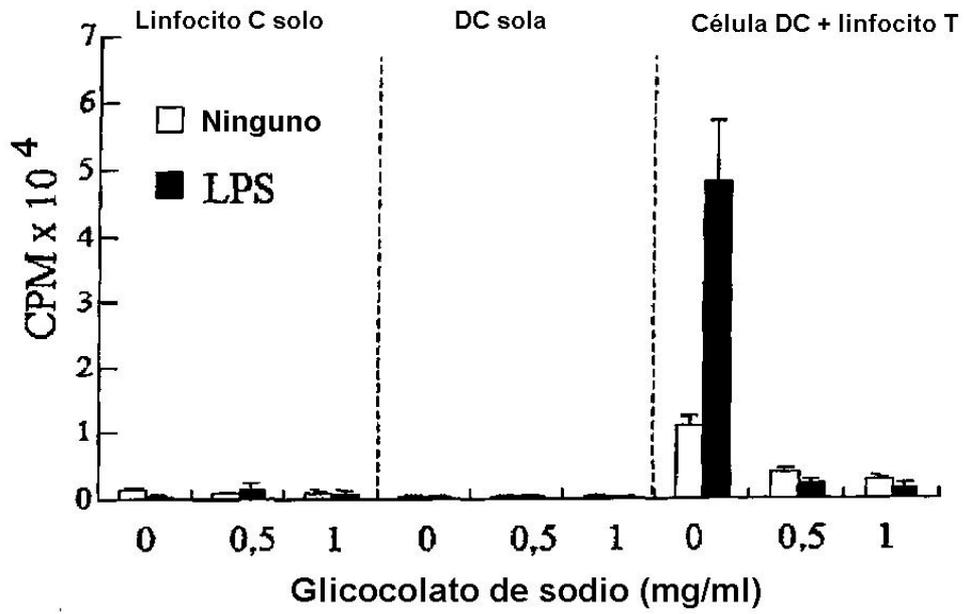
[Fig. 13]



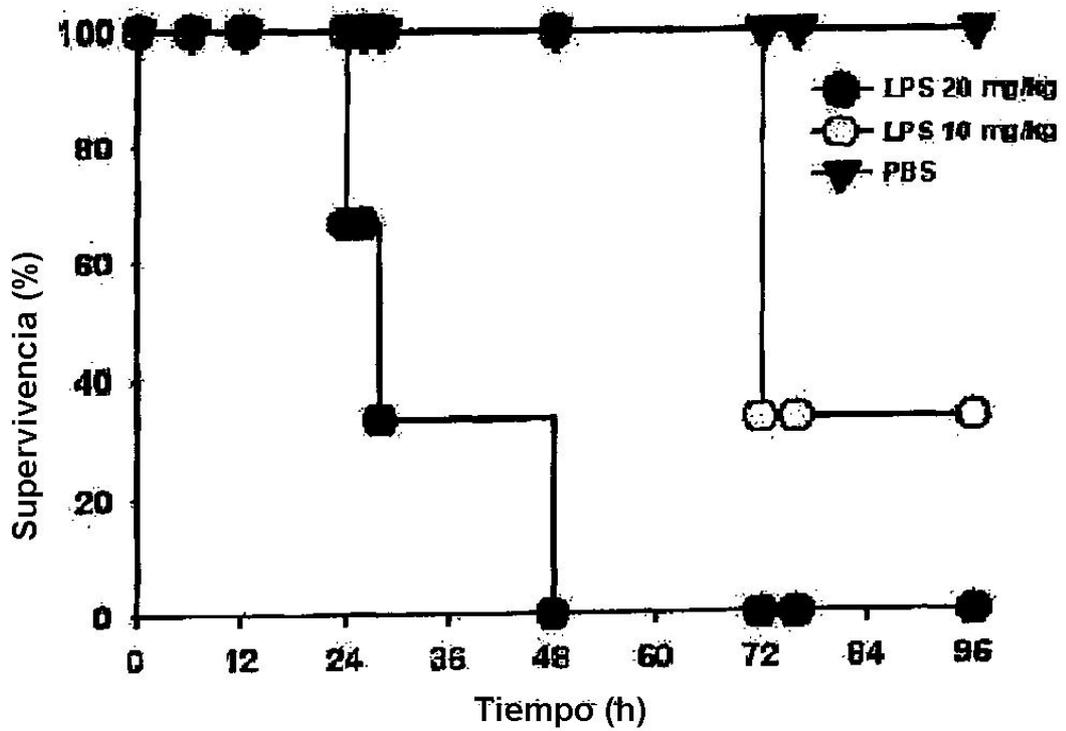
[Fig. 14]



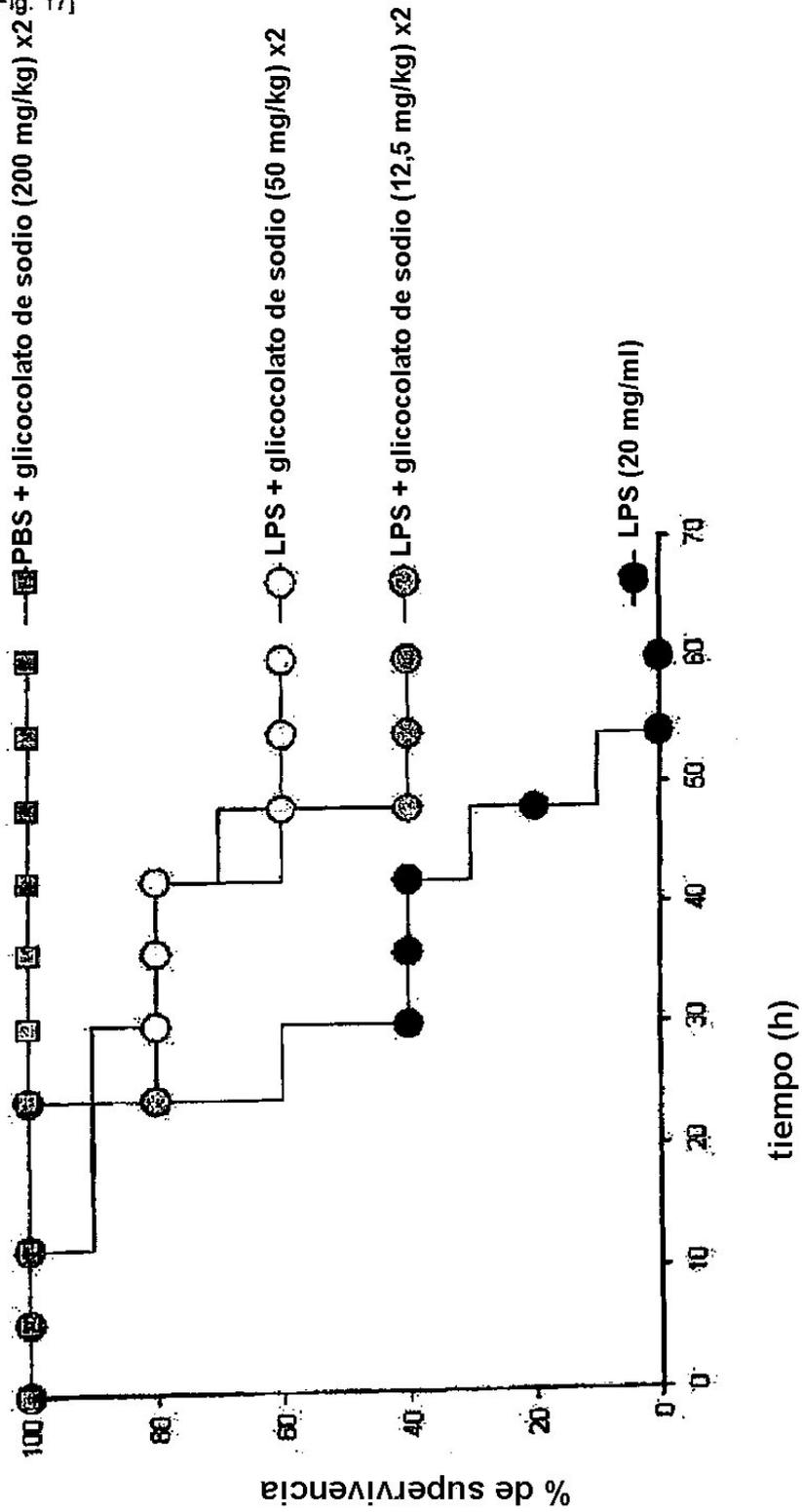
[Fig. 15]



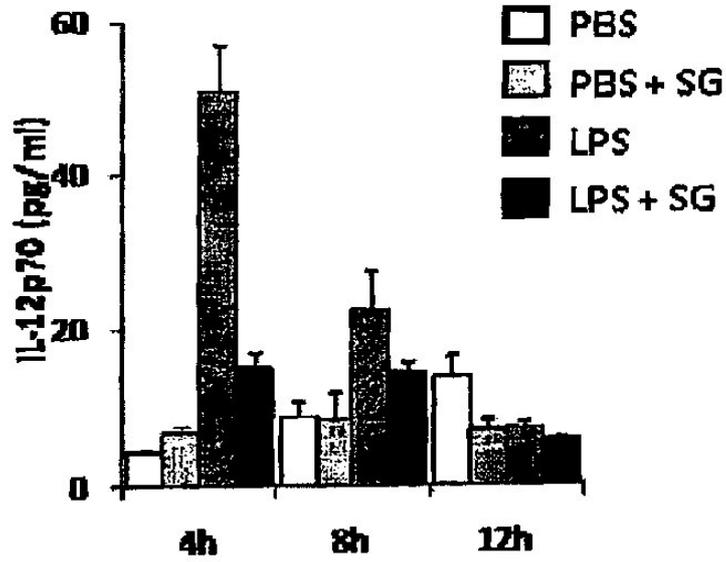
[Fig. 16]



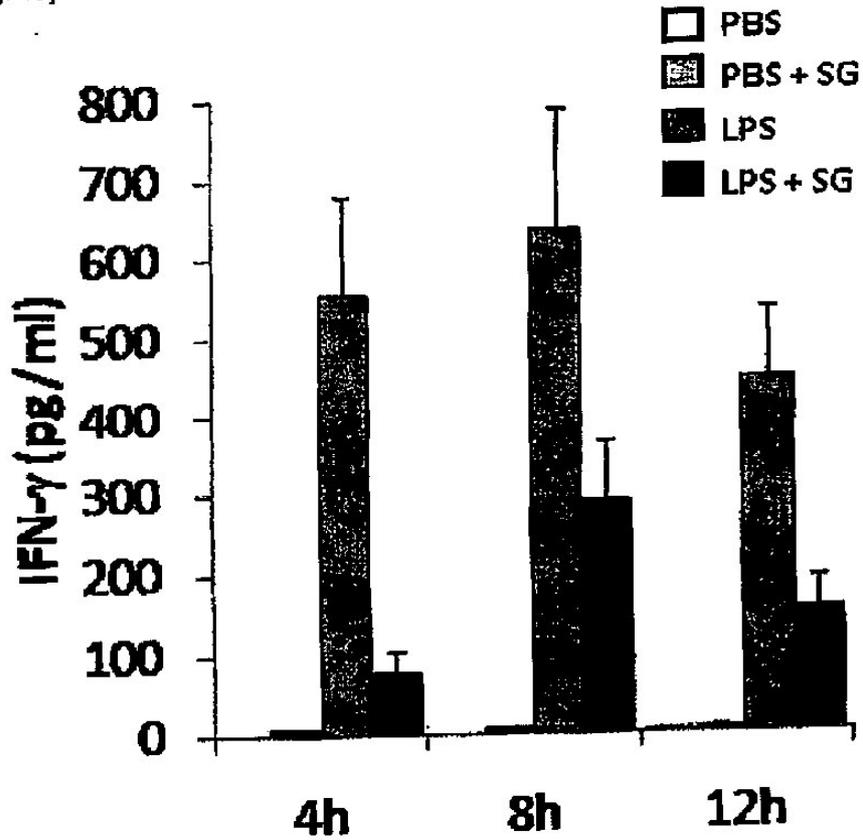
[Fig. 17]



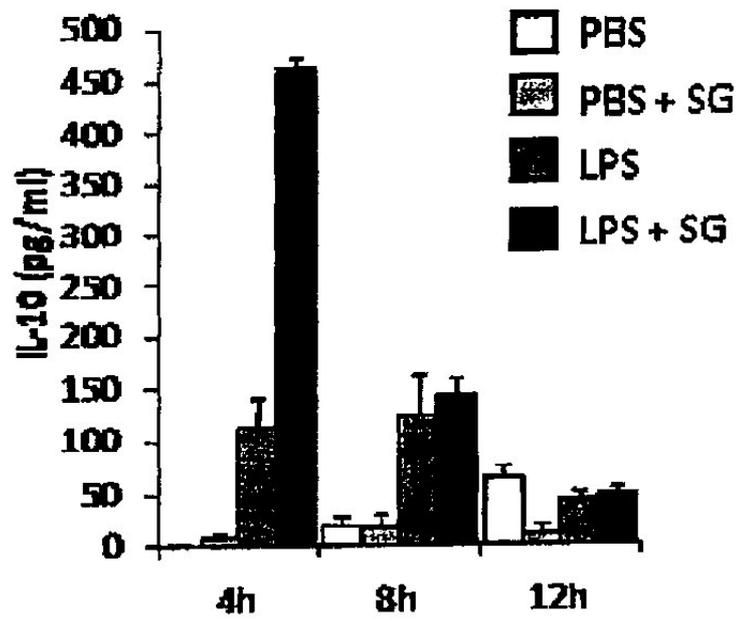
[Fig. 18]



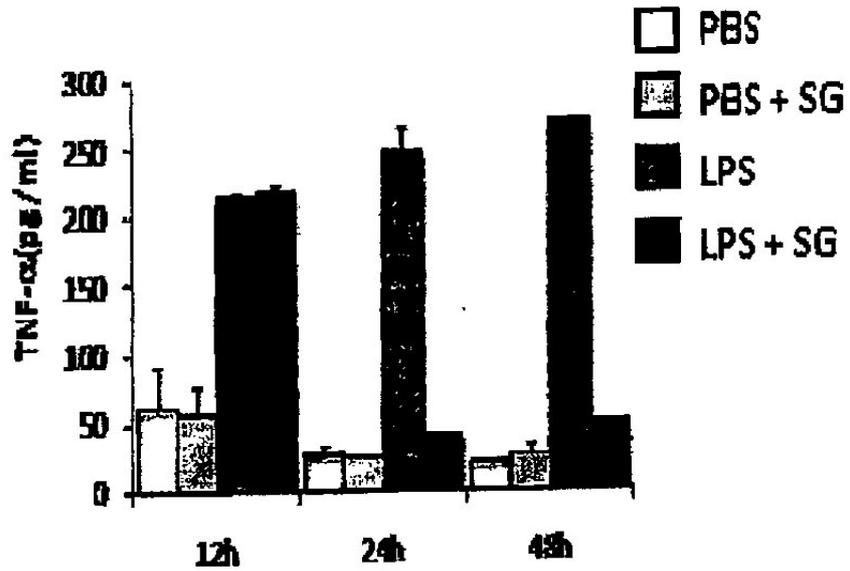
[Fig. 19]



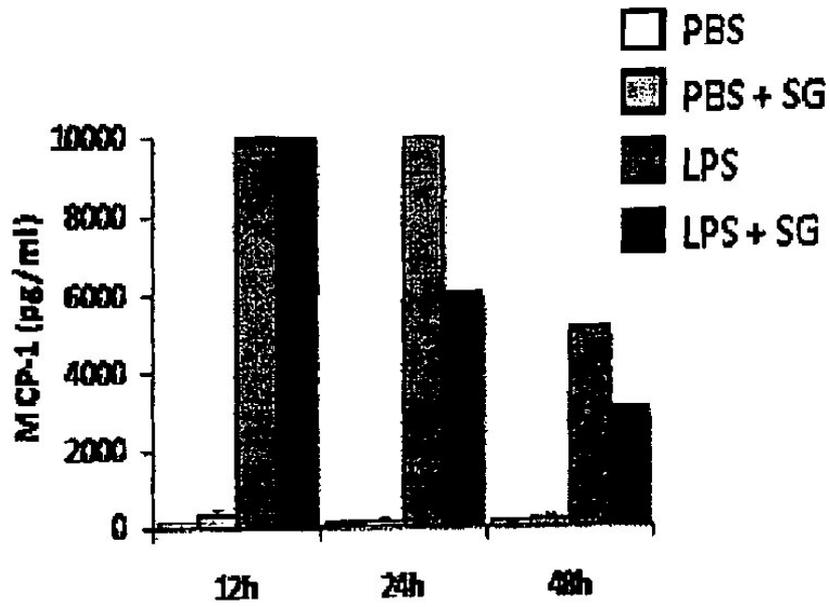
[Fig. 20]



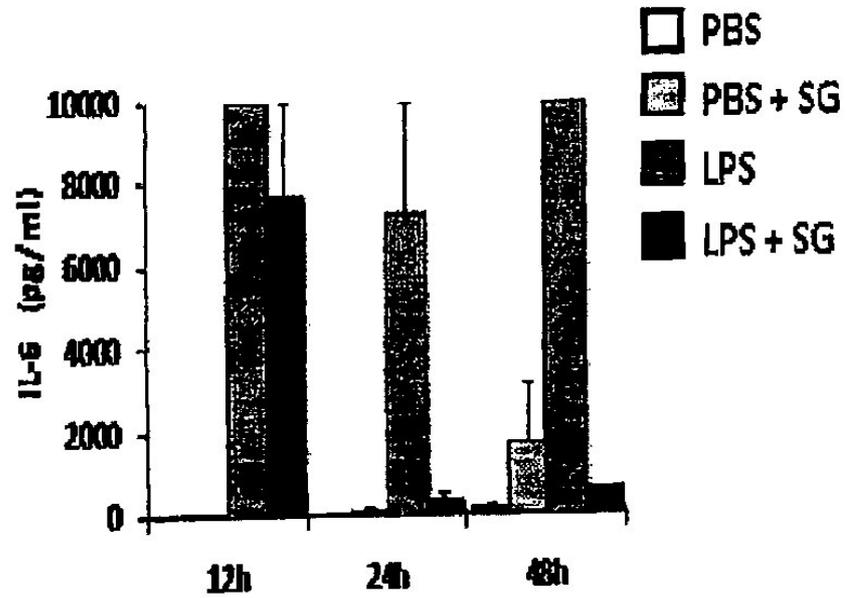
[Fig. 21]



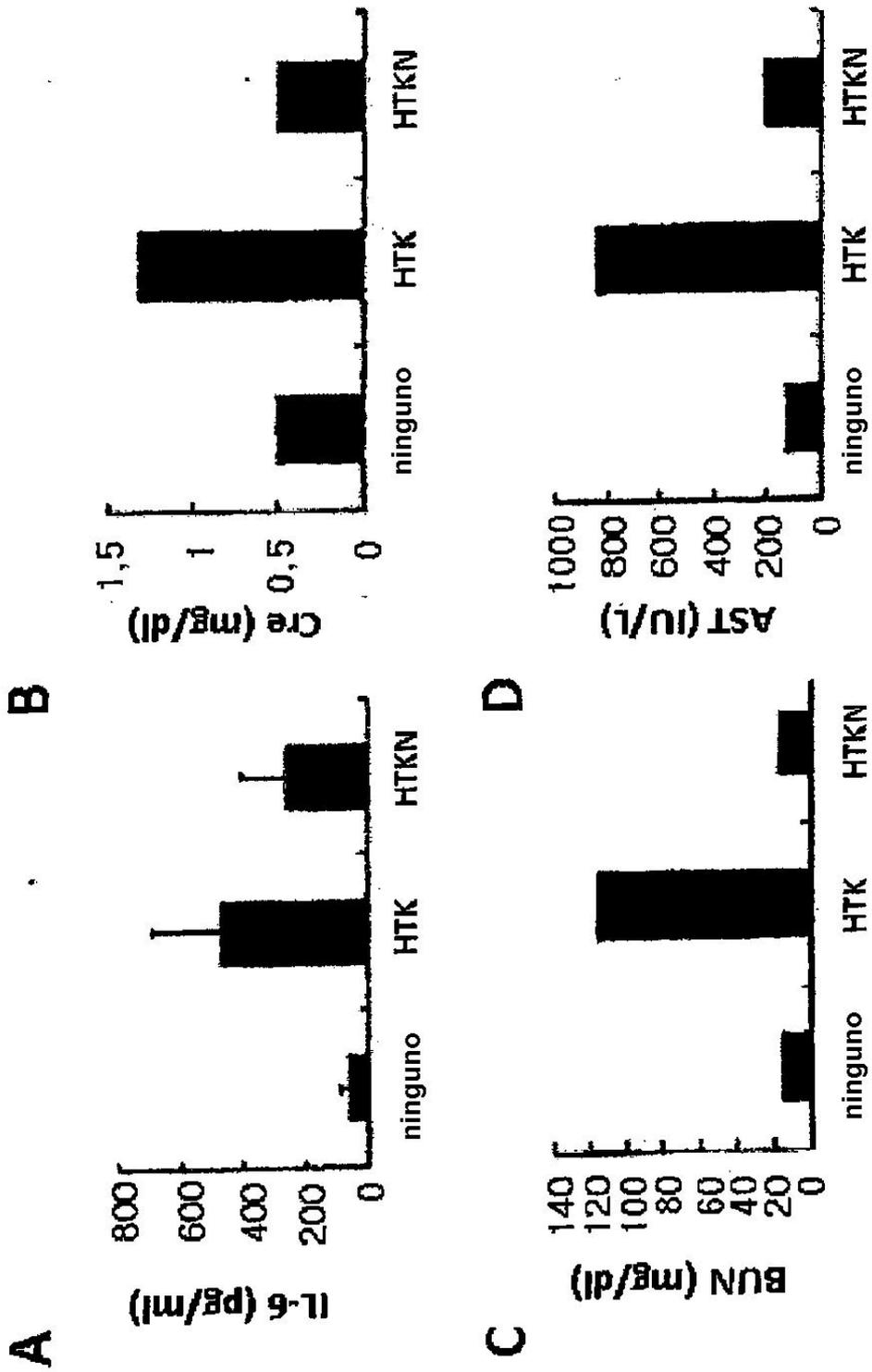
[Fig. 22]



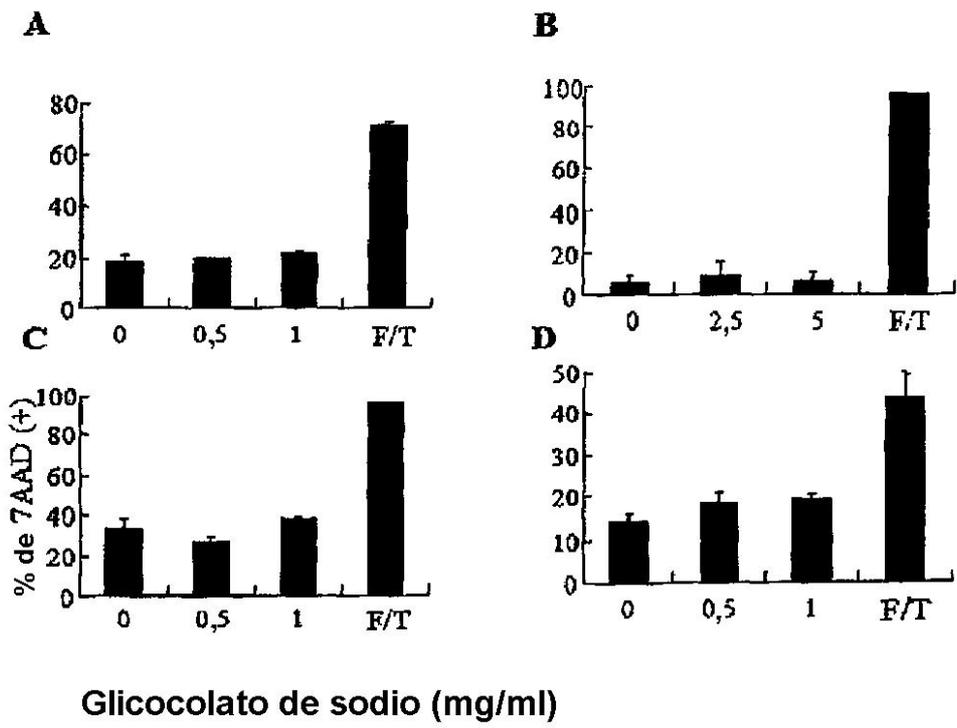
[Fig. 23]



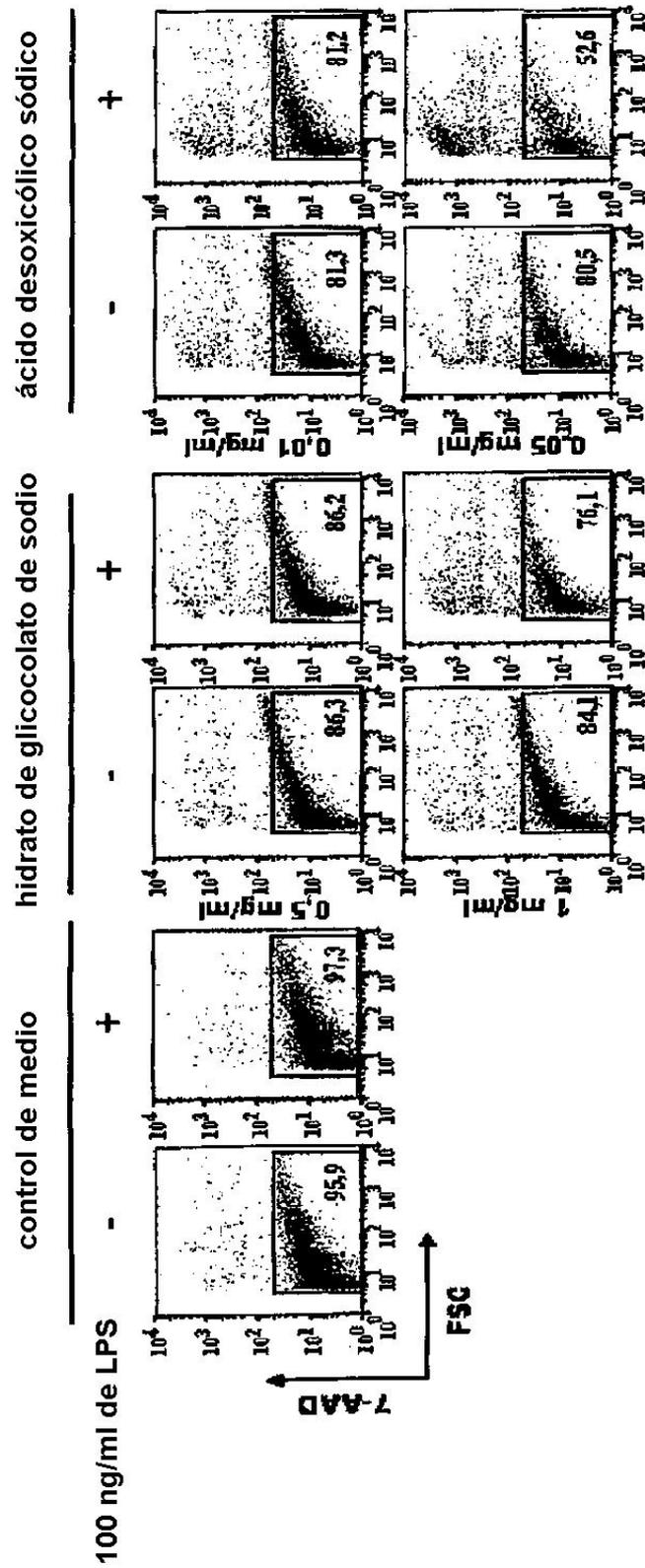
[Fig. 24]



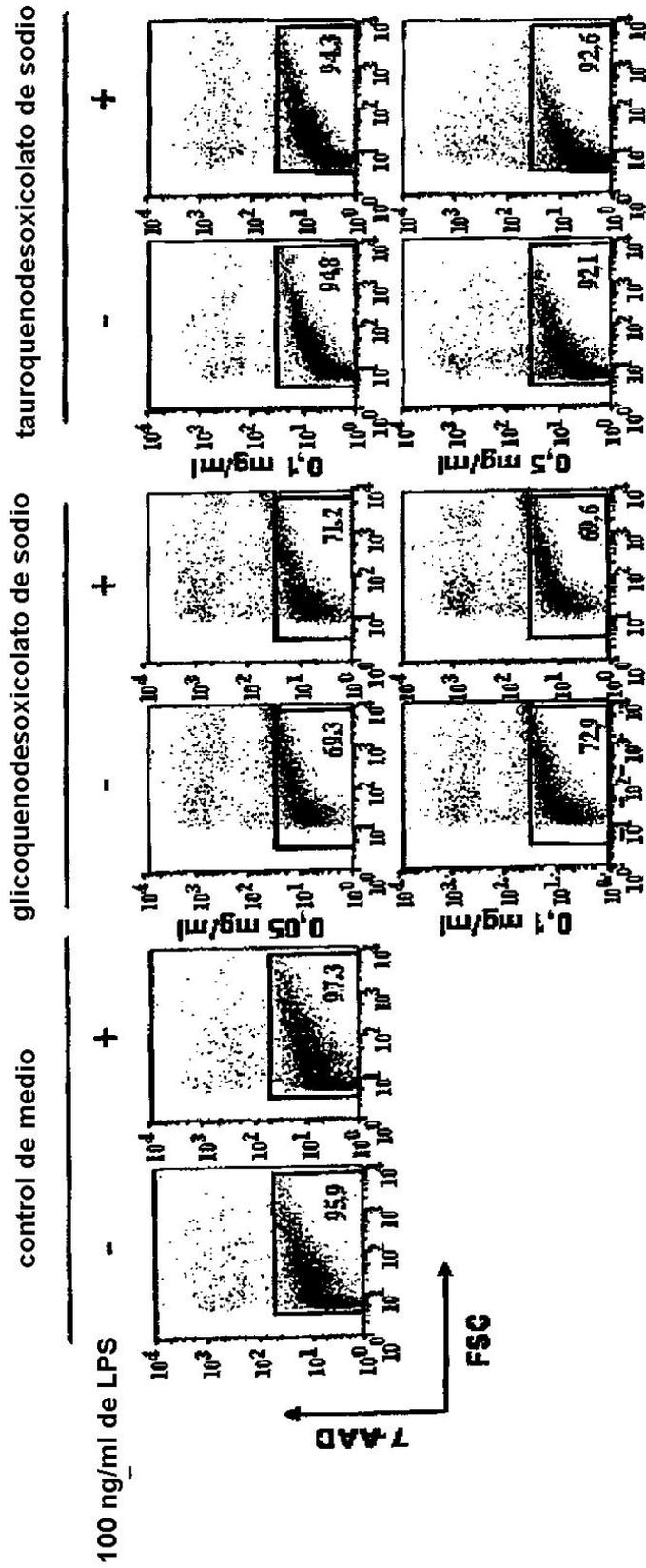
[Fig. 25]



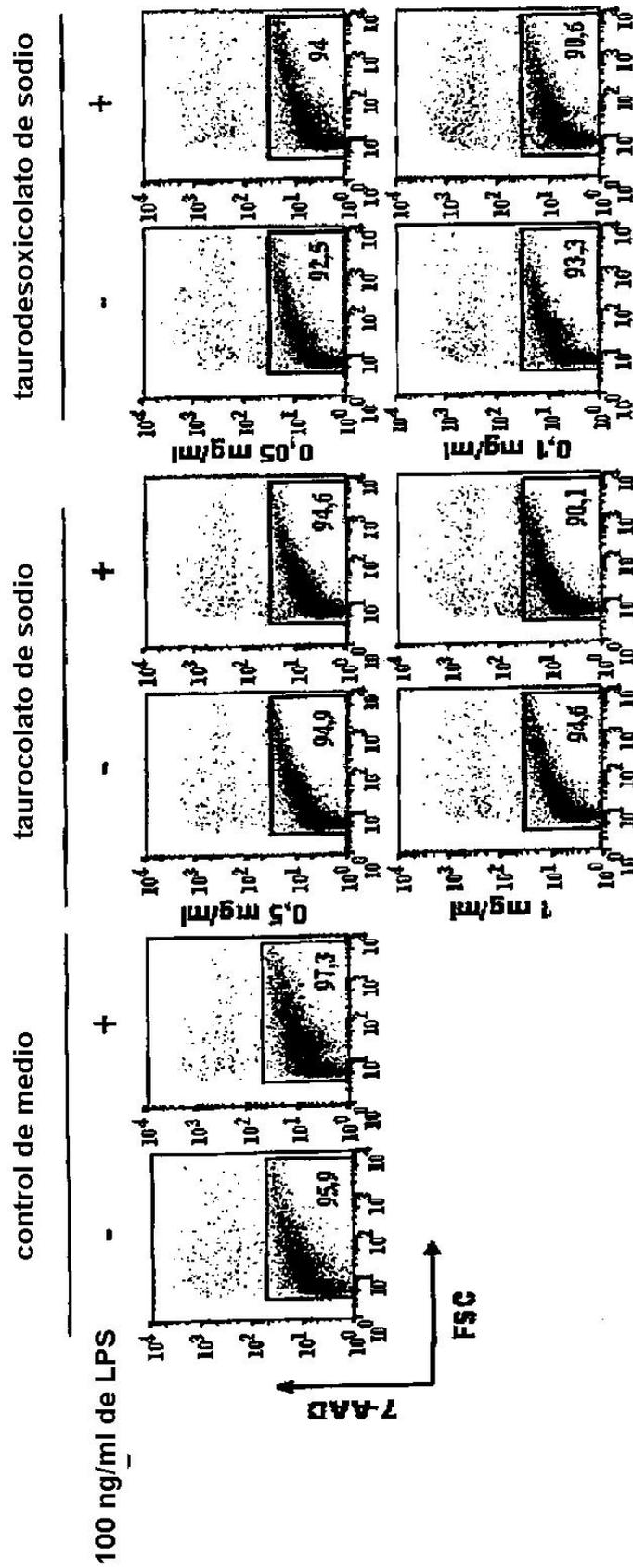
[Fig. 26]



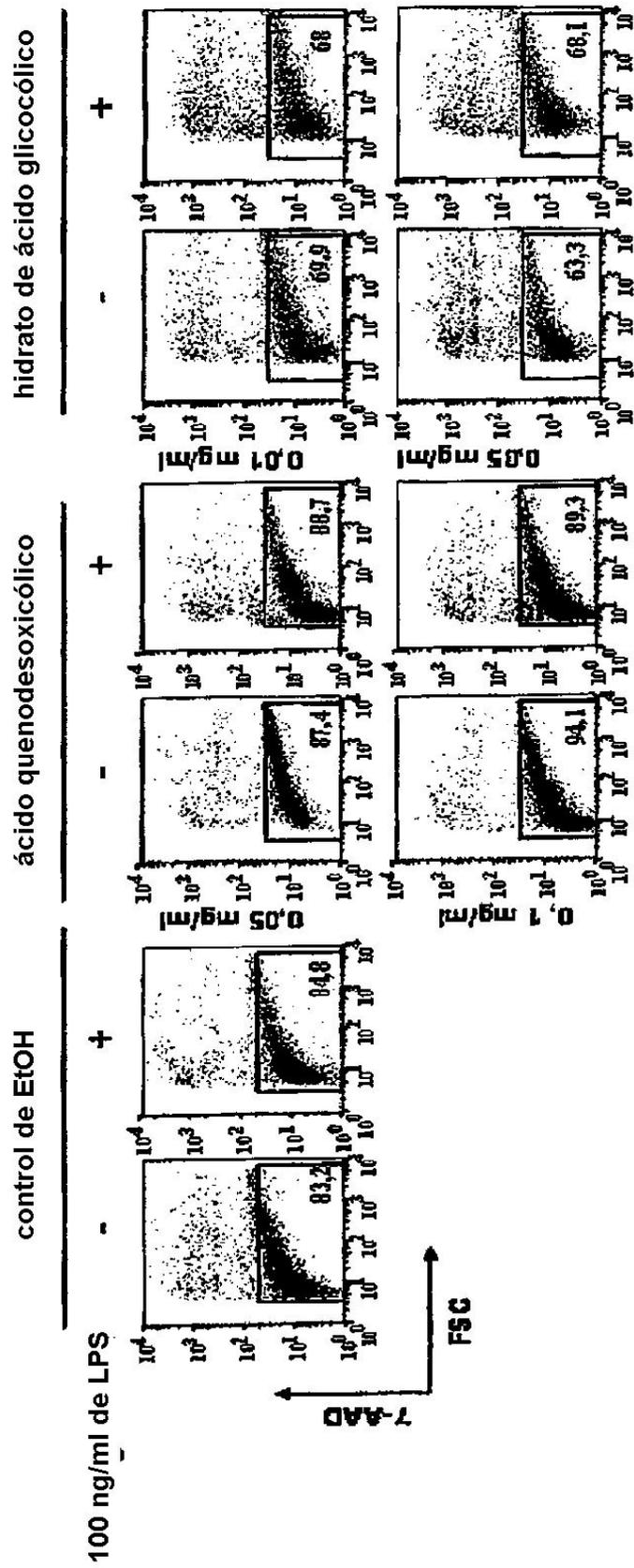
[Fig. 27]



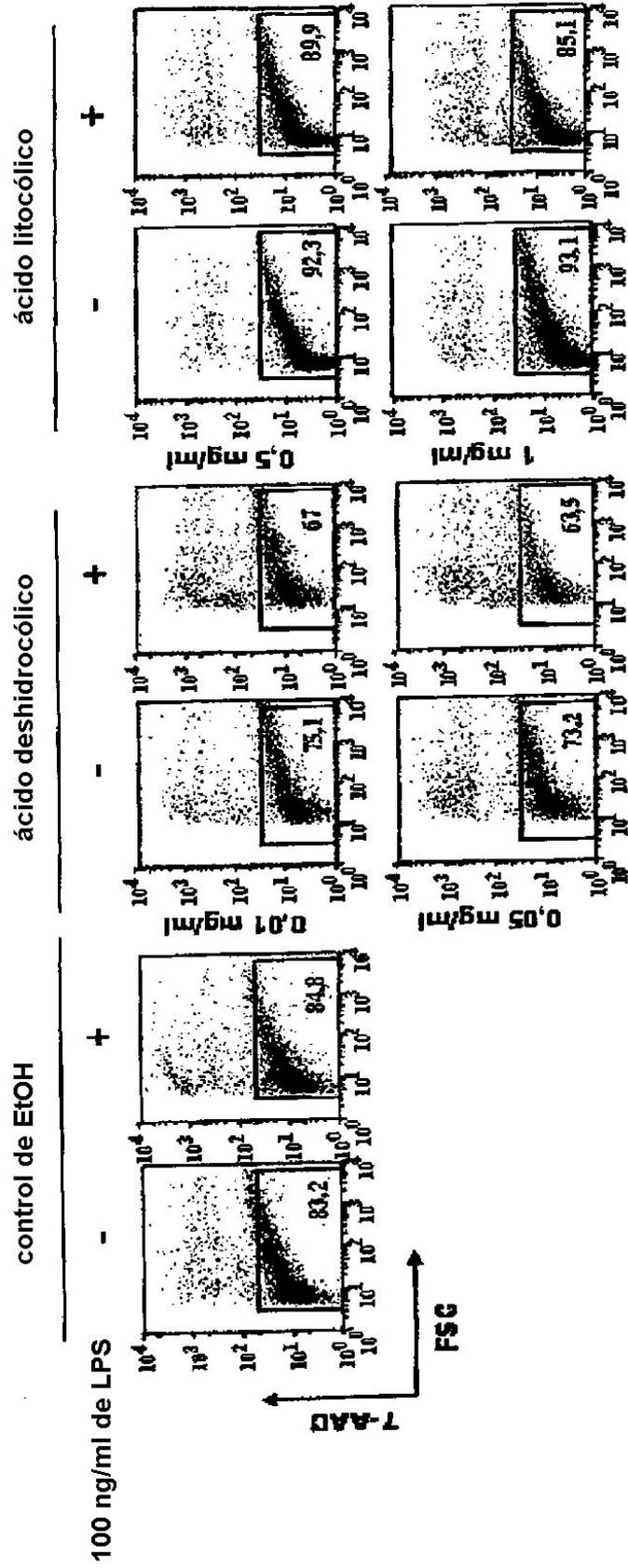
[Fig. 26]



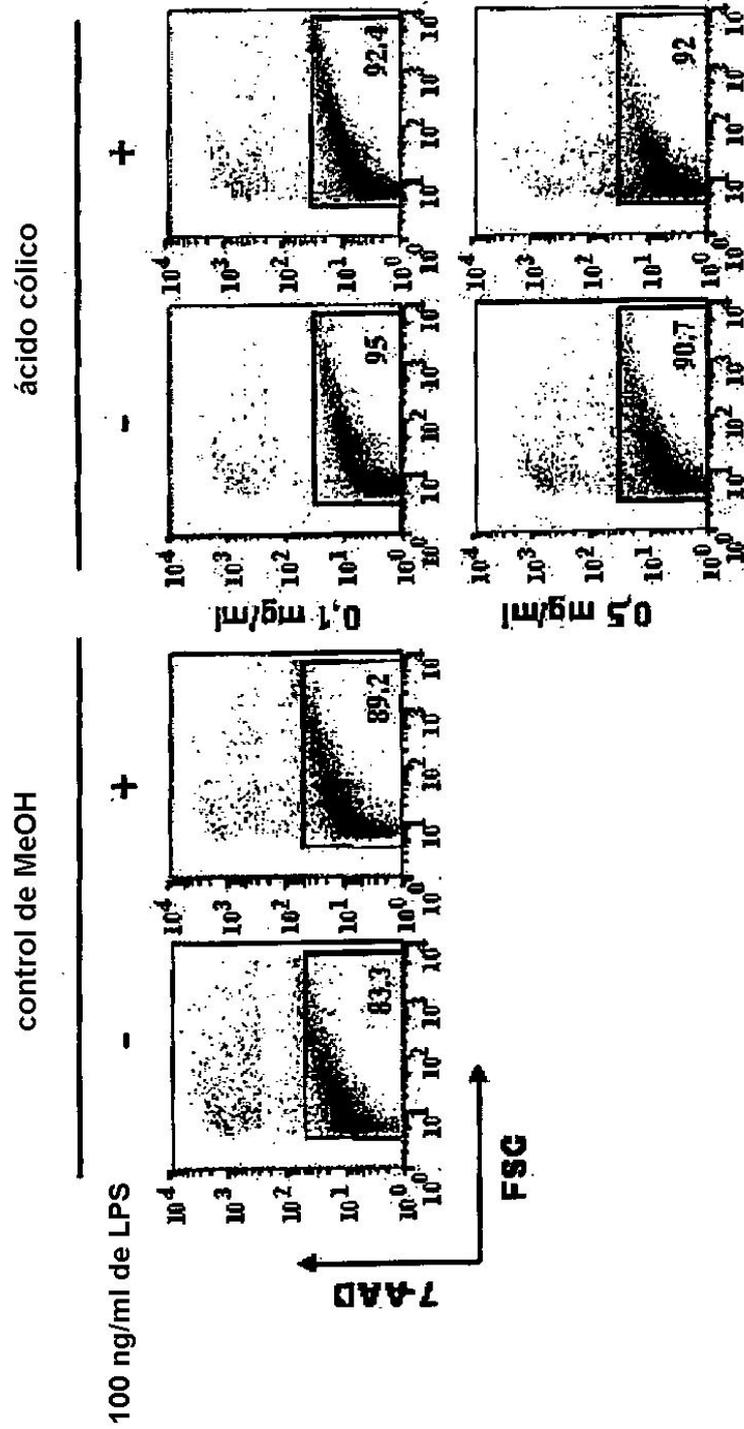
[Fig. 29]



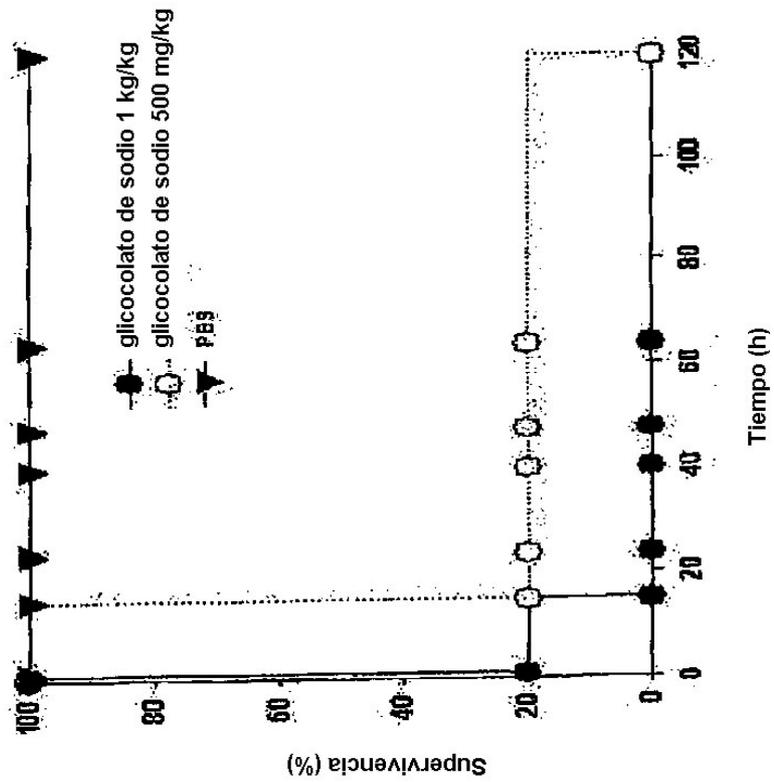
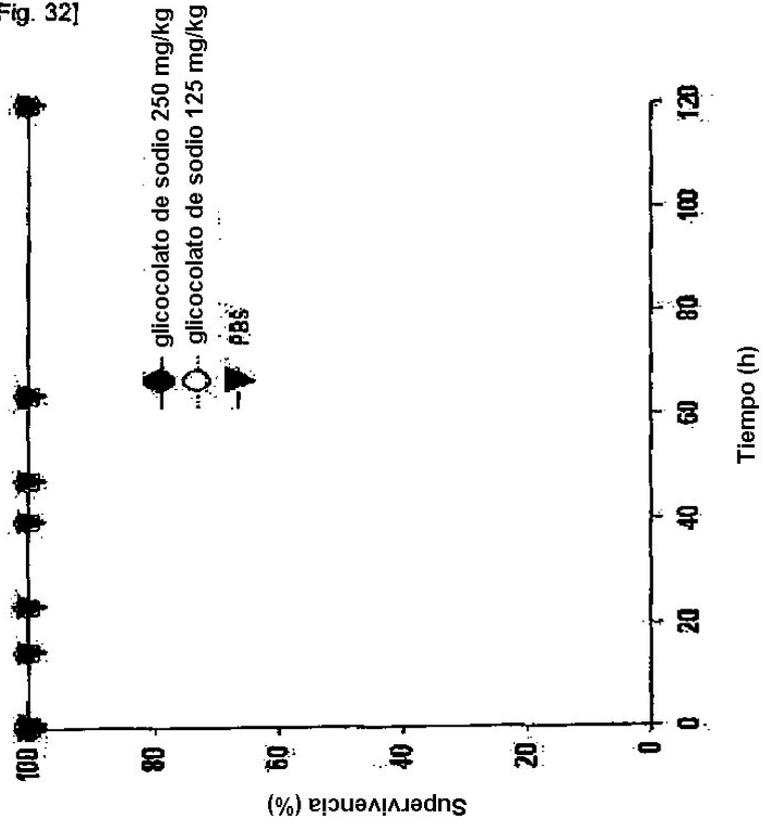
[Fig. 30]



[Fig. 31]



[Fig. 32]



[Fig. 33]

