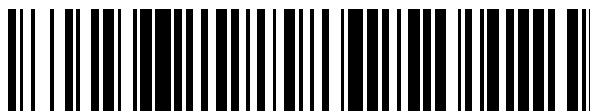


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 034**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

A61L 2/04 (2006.01)

A61L 2/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2016** **PCT/EP2016/059169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16173982**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2016** **E 16718357 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 3288596**

54 Título: **Procedimiento para la inactivación de virus continua en un microrreactor**

30 Prioridad:

28.04.2015 EP 15165505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2019

73 Titular/es:

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Kaiser-Wilhelm-Allee 1
51373 Leverkusen, DE

72 Inventor/es:

SCHWAN, PETER;
VESTER, ANDREA y
LOBEDANN, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 720 034 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

Procedimiento para la inactivación de virus continua en un microrreactor

La presente invención se refiere a un procedimiento para la inactivación de virus continua en un segmento de tiempo de detención.

- 5 Los procesos de producción biofarmacéuticos requieren distintas etapas ortogonales para la reducción de virus. Un procedimiento que se usa a menudo para la inactivación de virus (con envuelta) es el contacto con un medio ácido.

La inactivación de virus a un valor de pH bajo en el modo por lotes se conoce y se usa con frecuencia en la producción biofarmacéutica de principios activos, por ejemplo anticuerpos (Sofer 2003, Virus Inactivation in the 1990s - and into the 21st Century. Parte 4. BioPharm International). En este sentido, el material que se va a inactivar, un líquido, que posiblemente contiene virus activos, se introduce en un recipiente adecuado, se ajusta a un valor de pH ≤ 4 con la ayuda de una solución ácida, si es necesario se homogeneiza y se deja reposar durante el tiempo requerido. La inactivación de los virus se lleva a cabo por el contacto de los virus con una solución ácida a lo largo de un tiempo dependiente del producto y del proceso determinado. El contenido completo de la bolsa, por lo tanto, experimenta la inactivación con un tiempo de detención prácticamente idéntico y, en consecuencia, la reducción del virus que se produce es prácticamente idéntico en cada elemento fluido del recipiente.

Ahora bien, si un proceso para la producción de productos biofarmacéuticos y biológicos, en particular anticuerpos farmacéuticos, se va a ejecutar en el modo de operación continuo, entonces el tiempo de espera (= tiempo de detención) requerido debe realizarse para la inactivación del virus.

Una inactivación de virus continua, en el sentido de la solicitud, significa que la alimentación del flujo de alimentación en el módulo de inactivación de virus y la evacuación del flujo de producto del módulo de inactivación de virus se realizan sin pausa.

Una posibilidad de llevar a cabo la inactivación de virus continua es la irradiación con luz UV-C. En los documentos WO2002038191, EP1339643B1, EP1464342B1, EP1914202A1 y EP1916224A1 se describe el uso de un bucle de detención helicoidal en el que el material que se va a inactivar es irradiado con luz UV-C y los virus presentes, en consecuencia, se inactivan. Si un fluido fluye a través de un tubo en espiral helicoidal, la fuerza centrífuga actúa sobre el fluido. Mediante estas fuerzas centrífugas se inducen flujos secundarios (que se denominan vórtices de Dean), lo que lleva a un entremezclado radial mejorado y, por lo tanto, a una irradiación más homogénea del material que se va a inactivar. La estructura de hélice que se usa en dicha fuente es una hélice helicoidal recta sin cambios en la dirección de los ejes de la hélice. Para la aplicación de una inactivación de virus continua a un valor de pH bajo, el uso de una estructura helicoidal recta, como se emplea en la irradiación UV-C, no es viable, ya que, aunque la distribución del tiempo de detención es más estrecha que en el tubo recto con un caudal de flujo laminar, sigue siendo aún más ancha. Debido a que la distribución del tiempo de detención es relativamente más ancha, esta geometría requiere, además, una instalación más grande para la inactivación de virus por pH.

En un flujo de tubo laminar, se forma un perfil de velocidad parabólico, y se genera como resultado una amplia distribución del tiempo de detención (**Fig. 1**). Como la velocidad máxima en el centro del flujo de tubo es dos veces la velocidad media, pero en las paredes del tubo la velocidad es igual a cero (condiciones de adhesión), sucede en estos casos una distribución de tiempo de detención muy amplia. Los tiempos de detención así obtenidos se encuentran entre el tiempo de detención promedio (causado por los elementos fluidos que fluyen rápidamente en el centro del tubo) y un tiempo de detención infinitamente largo (causado por los elementos fluidos que se adhieren en la proximidad de la pared). Debido a que, por un lado, para la inactivación eficaz de los virus se requiere un tiempo mínimo de detención, por otro lado, sin embargo, los tiempos prolongados de detención a valor de pH bajo podrían dañar el producto (como, por ejemplo, una proteína), es vital lograr una distribución del tiempo de detención estrecha en una operación continua. En este caso, no es una alternativa aceptable provocar un cambio en la situación del flujo laminar a un flujo turbulento con un tiempo uniforme de detención. Los flujos turbulentos tienen velocidades de flujo muy altas. Por lo tanto, si se logran los tiempos de detención prolongados habituales para la inactivación de virus a un valor de pH bajo (por ejemplo 60 - 120 minutos), desfavorablemente, se forman instalaciones grandes, que también tienen una elevada caída de presión.

El documento WO1998/02237 describe una solución al problema del perfil de velocidad parabólica en un reactor tubular que opera continuamente para la precipitación de productos en una mezcla de reacción líquida por la aplicación de un modo de proceder segmentado (Segmented Flow Processes), en el que volúmenes discretos de la mezcla de reacción están separados de volúmenes discretos de un líquido de separación no miscibles con la mezcla de reacción, en donde, el tiempo de detención de la mezcla de reacción en el reactor tubular es suficiente para la precipitación. Los volúmenes discretos se generan en condiciones de flujo de pistón, (denominado condiciones de "Plug Flow") y por cada volumen las condiciones de reacción son prácticamente idénticas, de manera tal que se obtiene un producto uniforme por cada volumen.

Tuercke et al. describen la realización segmentada - líquido/líquido o líquido/gas - en reactores microestructurados en una operación continua para la síntesis orgánica y producción de micropartículas como, por ejemplo, emulsiones múltiples y nanopartículas y la polimerización (Organic Process Research & Development 2009,

13, 1007–1013). El procedimiento de la fase segmentada también fue empleado por el Instituto Fraunhofer para la Tecnología Química (ICT, por sus siglas en inglés) para separar células. La técnica para fases segmentadas es, además, empleada en el transporte de muestras en el Sistema Baychromat® para la toma de muestras y análisis (documento US 2009/0178495).

- 5 Hasta ahora no se ha estudiado o mencionado la aplicabilidad de las condiciones de flujo de pistón o flujo segmentado para procedimientos que requieren al mismo tiempo un largo tiempo de detención y una distribución del tiempo de detención estrecha como, por ejemplo, la inactivación de virus a un valor de pH bajo.

Partiendo del estado de la técnica, el objetivo era proporcionar una solución novedosa, simple y económica que permitiera el tiempo de detención requerido en un segmento de tiempo de detención con un flujo continuo para la inactivación de virus continua, en particular a un valor de pH bajo, con una distribución de tiempo de detención estrecha.

La invención logra este objetivo con un procedimiento para la inactivación de virus continua de un flujo de producto que se va a inactivar en un reactor 1, con un diámetro hidráulico bajo de 0,01 mm a 6 mm, preferentemente de 0,5 mm a 3 mm, que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) proporcionar el flujo de producto que se va a inactivar,
b) ajustar las condiciones de inactivación de virus,
c) introducir en el flujo de producto un medio de separación no miscible con el flujo de producto para la segmentación del flujo de producto,
d) alimentar y hacer pasar el flujo de producto segmentado desde c) con las condiciones de inactivación de virus
20 en un segmento de detención formado por el reactor 1
e) evacuar desde el segmento de detención,
f) preferentemente, separar de manera continua el medio de separación.

Preferentemente el reactor así como los elementos del módulo para la segmentación del flujo de producto que está en contacto con el flujo de producto, son esterilizables, preferentemente en autoclave, pueden irradiarse con rayos gamma o gasificarse con óxido de etileno (ETO), lo que permite una operación mínima de microbios o incluso estéril.

Preferentemente, el reactor es un reactor tubular. Con particular preferencia, se usa un reactor tubular hecho con material desechable, por ejemplo un tubo flexible, que se desecha después de usarse para poder prescindir de la limpieza. Por dicha propiedad, preferiblemente se usa un tubo flexible que cumpla con los requisitos relativos de calidad, por ejemplo: calidad clínica. (USP Class VI). Por ejemplo, el reactor tubular es un tubo flexible hecho de silicona. Como ejemplo se mencionan los tubos flexibles Pharmed®-BPT (tubo flexible de silicona), C-Flex-374® (tubo flexible termoplástico), o Sanipure® de la empresa Saint-Gobain Performance Plastics, sin limitarse a los mismos. En la instalación de prueba, se empleó un tubo flexible comercial de SaniPure® con un diámetro interno de 1,6 mm.

La configuración geométrica del reactor tubular en su longitud es como se desee: recta, en espiral o curva, siempre y cuando no se rompa. Se prefiere una disposición para ahorrar espacio del reactor tubular. Normalmente, al reactor tubular lo sostiene una estructura de apoyo. Por ejemplo, el reactor tubular se enrolla alrededor de marcos fijados a un soporte, en donde los marcos pueden ser redondos o cuadrados. También es posible un arrollamiento helicoidal alrededor de una o varias columnas. Para una inactivación UV, la columna puede presentar una lámpara UV y el reactor tubular puede ser transparente a UV. Además, se pueden establecer las condiciones térmicas de inactivación de virus calentando la estructura de apoyo en el reactor tubular. Para una inactivación térmica, las estructuras enrolladas pueden también introducirse en un baño de líquido para provocar con ello cambios de temperatura abruptos.

Como alternativa, se puede usar un reactor tubular que está formado por una o varias placas apiladas una sobre otra, en particular placas de plástico, en las que está incorporado un canal con una entrada y una salida. Si este reactor de placas comprende varias placas, la entrada y la salida de las placas centrales están situadas de manera que mediante el apilamiento se forme un canal continuo de la longitud deseada. Además, la configuración geométrica del canal es como se desea en su longitud: recta, en espiral o curva.

La sección transversal del reactor 1 es, por lo general, redonda u ovalada, pero también puede ser cuadrada.

En la etapa a), se proporciona un flujo de producto de líquido que puede contener tanto un producto como virus que potencialmente pueden ser inactivados.

Son mencionadas como posibles condiciones de inactivación de virus para la etapa b), un pH bajo (preferentemente ≤ 4), detergentes, tratamiento con UV o tratamiento térmico.

Preferentemente, en la etapa b), el valor de pH del flujo de producto se ajusta a un valor ≤ 4 , siempre que el valor de pH del material que se va a inactivar no tenga ya el valor requerido. El valor de pH del flujo de producto, por lo general, se registra con un sensor antes de entrar al dispositivo para la inactivación de virus (**Fig. 8**). Por lo general, este sensor de pH no posee control de tareas. Registrar la señal de pH sirve solamente para controlar el proceso.

Ajustar el valor de pH de la solución que se va a inactivar a ≤ 4 puede realizarse, por ejemplo, al agregar una solución de HCl. La adición se realiza, por lo general, antes del dispositivo para la inactivación de virus. Después de la etapa e) o f), por lo general, el valor de pH se ajusta a >4 con una base, por ejemplo, solución de hidróxido de sodio (NaOH) para terminar la inactivación de virus. La neutralización se puede llevar a cabo como una operación por lotes o como un procedimiento de producción continuo, y por lo tanto, se puede integrar en un proceso por lotes o en un proceso continuo.

Como agente de separación, en el procedimiento de acuerdo con la invención, se emplea una fase no miscible con el flujo de producto. Preferentemente, el agente de separación es un aceite o un gas como, por ejemplo aire, CO₂ o nitrógeno, preferentemente un gas, con mayor preferencia nitrógeno, debido a su inercia de reacción con respecto al flujo de producto y la baja solubilidad en el flujo de producto acuoso.

Para la introducción del agente de separación y segmentación del flujo de producto en la etapa c), en general, el reactor, además de una entrada 4, presenta una entrada 6 para el agente de separación, en general, en forma de una pieza en T, a la que está conectado un medio para introducir pulsos del agente de separación, ya sea una válvula de abertura controlada, que se abre, con una línea de presión o una bomba conectada, (Fig. 3). La segmentación se realiza por ejemplo con una bomba con una pulsación de 0,1 a 200 por minuto. Por lo general, la corriente del reactor fluye con un flujo volumétrico de 1 a 1000 l/min, preferentemente de 10 a 100 ml/min.

Como alternativa a la introducción pulsada, el agente de separación puede alimentarse de manera continua a través de una membrana. En esta forma de realización, se emplea un módulo para la segmentación del flujo de producto que comprende una o varias fibras huecas con una pared hidrófoba, a través de la que el agente de separación se introduce en el flujo de producto. Es también posible usar un módulo de fibra hueca con una pared hidrófila, en donde en la luz de las fibras huecas, el agente de separación se transporta continuamente y se introduce por la pared del flujo de producto. Esta segunda forma de realización supone que los poros de las fibras huecas dejan pasar el producto. El uso de una segmentación de membrana, en general, supone que las condiciones de inactivación de virus no perjudican las propiedades necesarias de la membrana. Por lo tanto, se prefiere el uso de una pieza en forma de T cuando se emplean detergentes.

Una introducción química de un agente de separación, por ejemplo de CO₂, también sería posible, en particular si la condición de inactivación de virus tolera variaciones de pH.

Mediante tales segmentaciones del flujo de producto, se forman en volúmenes de flujo de producto de 0,1 ml a 100 ml, con intervalos de volumen de 0,1 ml a 10 ml entre dos volúmenes de flujo de producto.

Por lo general, la extensión mínima de un segmento, en particular de un segmento de agente de separación, es tres veces el diámetro interno del reactor. Una extensión máxima razonable de un segmento es la quinta parte del segmento de detención.

Debido a la acción capilar y la tensión superficial en el reactor, se mantiene la segmentación de las fases, de manera tal que dos segmentos de una fase están separados por un segmento de la otra fase. Como resultado, se minimiza la retromezcla entre dos segmentos de una fase y el tiempo de detención del sistema total se reduce enormemente.

Los segmentos de flujo de producto transportados de manera individual (=volumen de flujo de producto) se pueden considerar como contenedores de inactivación pequeños que siempre están completamente vacíos y, se mezclan solo mínimamente entre sí.

Por lo general, la línea de producción en la etapa d) se alimenta y se transporta al reactor con una velocidad de flujo de 0,1 a 1000, preferentemente de 1 a 100, con mayor preferencia de 10 a 100 ml/min, por lo general con ayuda de bomba. En esta etapa, el tiempo de contacto (= tiempo de detención) deseado se realiza entre las condiciones de inactivación de virus, en particular de la solución ácida, y virus eventualmente presentes. El tiempo de detención es suficientemente prolongado para inactivar los virus sin dañar demasiado el producto. Por lo general, se determina experimentalmente en un procedimiento por lotes, antes de convertirse en un procedimiento continuo, y normalmente asciende desde 30 min para productos sensibles al pH hasta 10 h para productos menos sensibles. El tiempo de detención requerido así como el tiempo de detención máximo dependen del producto. Por lo general, se optimiza el tiempo de detención máximo, de manera tal que el producto se dañe mínimamente para así mantener tan bajo como sea posible el requisito de etapas de purificación posteriores.

Como parámetros de diseño para el procedimiento de acuerdo con la invención se mencionan de manera correspondiente:

- Diámetro interior del tubo d_i del reactor
- Longitud del tubo L, en donde la longitud del tubo L y el diámetro interno del tubo se adaptan a las dimensiones de la instalación total/caudal del flujo de la instalación de manera tal que en el caso de aplicación respectivo se cumplan los tiempos de detención requeridos.
- Flujo volumétrico deseado, volumen de flujo de producto, volumen de agente de separación y frecuencia de impulsos.

La separación continua del agente de separación, por lo general, se realiza por un separador que actúa por gravedad, fuerza centrífuga o por las propiedades de membrana.

Si se emplea un gas como agente de separación, por lo general el flujo volumétrico se desgasifica continuamente. Para esto, se puede utilizar una botella lavagases, una válvula de ventilación, o con preferencia un módulo de desgasificación de membrana.

Si el proceso de producción requiere uno o varios ajustes del valor de pH, el dispositivo para la inactivación de virus, por lo general, se conecta a una unidad para ajustar el valor de pH. Por lo general, se usan dos unidades para ajustar el valor de pH, la primera antes de la inactivación para ajustar el flujo de producto a un valor de $\text{pH} \leq 4$, otra después de la inactivación para neutralizar el flujo de producto.

Si el dispositivo para inactivar el virus se integra al proceso continuo de producción, se prefiere una o más unidades para ajustar el valor de pH, en el que el flujo de producto atraviesa un bucle de recirculación. La **Fig. 8** representa la inactivación de virus y la posterior neutralización a modo de ejemplo, sin estar limitados a estos. M0503 transporta el flujo de producto hacia la bolsa B0502 donde se ajusta el valor de pH después de haber dejado la inactivación de virus a un valor de $\text{pH} \geq 4$. La bomba de recirculación M0504 transporta los contenidos de la bolsa B0502 a través del bucle de recirculación en donde el sensor del pH pH0502 mide el valor de pH del flujo de producto. Detrás del sensor pH 0502, el agente de ajuste para adaptar el valor de pH se agrega para regular el pH. Esto se realiza a través de la configuración predeterminada de la velocidad de giro para M0505.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, el flujo de producto que se va a inactivar es, por lo general, una solución de un biorreactor o una columna de cromatografía, en particular una solución de proteína o peptídica como, por ejemplo una solución de anticuerpos.

La ventaja técnica de la inactivación de virus continua de acuerdo con la invención en comparación con la inactivación de virus habitual en el estado de la técnica en el modo por lotes, consiste en su capacidad de integración en el proceso de tratamiento continuo, también denominado "Downstream Processing", sin la necesidad de cambiar el modo de proceder del proceso. Asimismo, no hay cambios en el control de proceso desde el lote al continuo y viceversa, pero el denominado "Downstream Processing", o el proceso de producción completo (ascendente y descendente) se puede ejecutar de manera continua. También, la inactivación de virus continua se puede combinar más fácilmente con una etapa parcial continua de un proceso de tratamiento por lo demás por lotes.

La presente invención, inclusive las formas de realización preferidas, se explica unto con los dibujos y los ejemplos siguientes, sin estar restringida a estos. Las formas de realización se pueden combinar aleatoriamente entre sí, siempre y cuando no se consiga lo contrario por el contexto.

Los números de referencia usados son:

- 1= tubo o tubo flexible curvado y/o enrollado helicoidal
- 2= inversiones de dirección y/o pandeo de 2 de los ejes de torsión h con un ángulo α de 45° a 180°
- 3 = marcos
- 4 = entrada
- 5 = salida
- 6 = soporte de apoyo
- 7 = pie
- 8 = línea de flujo de producto

La **Fig. 1** muestra un perfil de flujo parabólico del tubo con un caudal de flujo laminar (superior: sección longitudinal del tubo). Líneas de igual velocidad en dirección de flujo en el tubo con un caudal de flujo laminar (inferior: sección transversal del tubo)

- a = pared de tubo
- b = dirección axial del tubo en dirección de flujo.
- c = dirección radial
- d = líneas de igual velocidad de flujo en dirección de flujo

La **Fig. 2** muestra el principio de la segmentación

La **Fig. 3** muestra medios alternativos para la introducción pulsada del agente de separación conectado al reactor tubular.

La **Fig. 4** muestra un diagrama de flujo de la inactivación de virus con la posterior adaptación del valor de pH, en donde el dispositivo para la inactivación de virus está representado únicamente de manera esquemática.

La **Fig. 5** muestra un marco cuadrado para enrollar el tubo del reactor.

La **Fig. 6** muestra varios marcos montados sobre un soporte.

Ejemplo 1:

Para los estudios experimentales, se eligió un diámetro interior de tubo flexible de 1,6 mm. El reactor tubular se enrolló sobre marcos con las siguientes dimensiones -

5 diámetro del marco de 63 mm; longitud del borde externo del marco 195 mm. El marco se fabricó de manera correspondiente a la **Fig. 5** y se montó sobre el soporte según la **Fig. 6**. Por brazo se realizaron siempre 11 vueltas con un mínimo de separación. La longitud del tubo flexible usada por marco es en proporción al diámetro del marco suponiendo un número de vueltas constante por brazo.

10 En este sentido, la salida del marco superior está conectado con la entrada del marco inferior a este, de manera tal que el enrollamiento del tubo flexible del marco se realizó de arriba abajo. Como alternativa también es posible hacer pasar el flujo de arriba abajo o en la horizontal. La instalación de prueba se atravesó con un flujo volumétrico de alrededor de 3 ml/min.

Los ensayos para medir el tiempo de detención en el dispositivo para la inactivación de virus continua se llevaron a cabo con ayuda de una medición de UV en la salida del sistema.

15 Como sustancia de marcado se usó una solución de vitamina B12 con una concentración de 0,25 g/l, ya que la vitamina B12 absorbe la luz UV a una longitud de onda de 280 nm y por lo tanto es adecuada como indicador.

20 En primer lugar, el dispositivo se lavó con agua destilada. En el instante k, al comienzo de la inactivación del virus, el sistema se cambió a la solución de marcado y se inició el registro de la señal medida del sensor UV (a continuación se aplicó al sistema una función escalonada de la solución de marcado). Cuando la señal UV en la salida del sistema correspondía a la señal UV de la solución de marcado, podían finalizarse los ensayos, ya que el sistema, a partir de este instante, se llena por completo con la solución de marcado y por lo tanto podía registrarse por completo la respuesta del sistema a la función escalonada.

Los trabajos que han llevado a esta solicitud, se patrocinaron de acuerdo con el acuerdo de subvención "Bio.NRW: MoBiDiK – Bioproducción Modular – Desechable y Continua" en el marco del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

25

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inactivación de virus continua de un flujo de producto que se va a inactivar en un reactor (1) con un diámetro hidráulico de 0,01 mm a 6 mm, preferentemente de 0,5 mm a 3 mm, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. proporcionar el flujo de producto que se va a inactivar,
b. ajustar las condiciones de inactivación de virus, mediante ajuste de un pH a un valor ≤ 4 , por detergentes, un tratamiento UV o térmico,
c. introducir en el flujo de producto un medio de separación no miscible con el flujo de producto para la segmentación del flujo de producto,
- 10 d. alimentar y hacer pasar el flujo de producto segmentado desde c) con las condiciones de inactivación de virus en un segmento de detención formado por el reactor (1).
e. evacuar desde el segmento de detención.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa b), el valor de pH del flujo de producto se ajusta a un valor ≤ 4 , siempre que el valor de pH del material que se va a inactivar no tenga ya el pH requerido.

- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** la solución que se va a inactivar es una solución de macromoléculas, preferentemente una proteína o una solución peptídica, con mayor preferencia una solución de anticuerpos.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende asimismo una etapa f) realizándose en la etapa f) una separación continua del medio de separación.

20

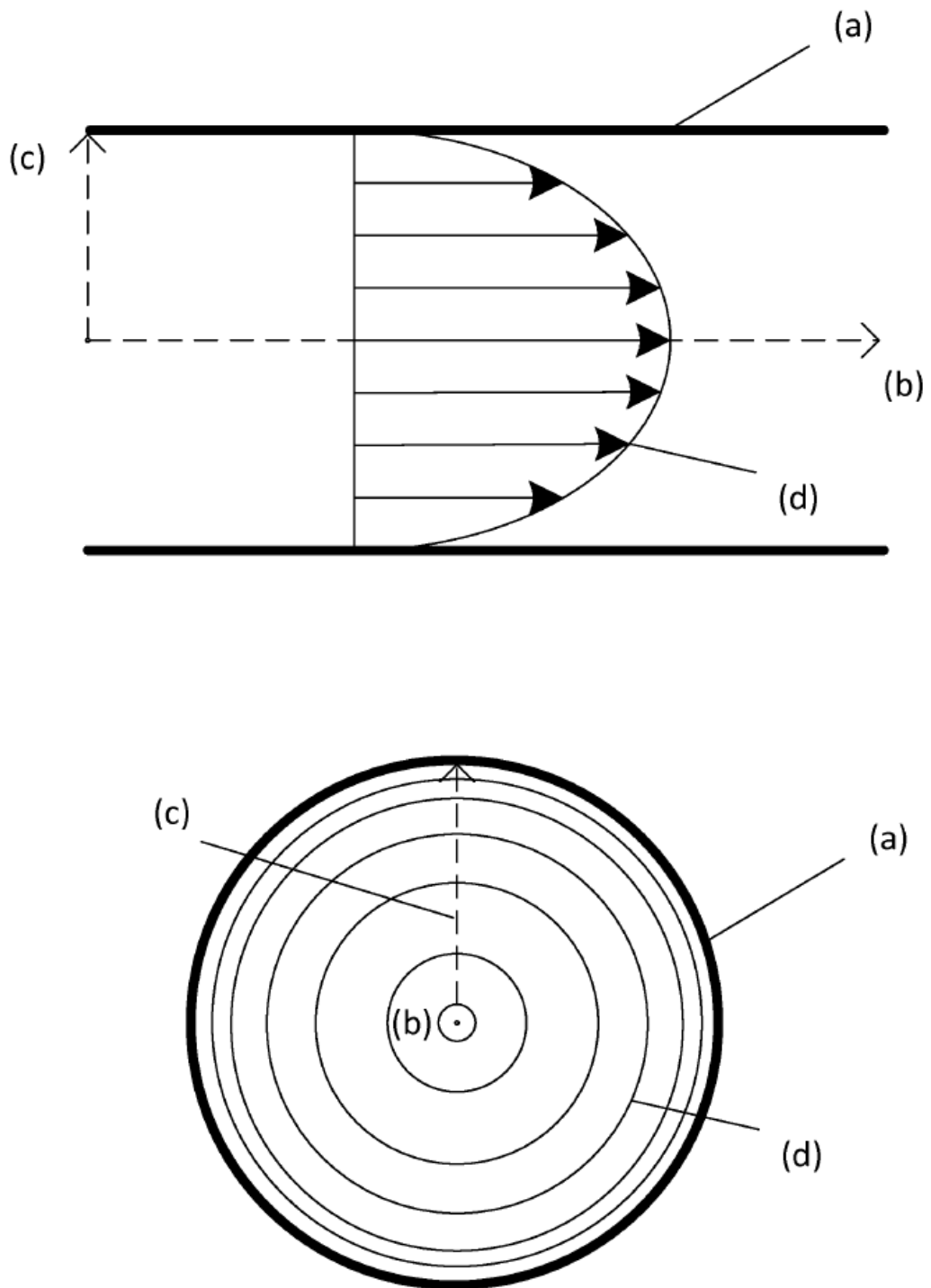


Fig. 1

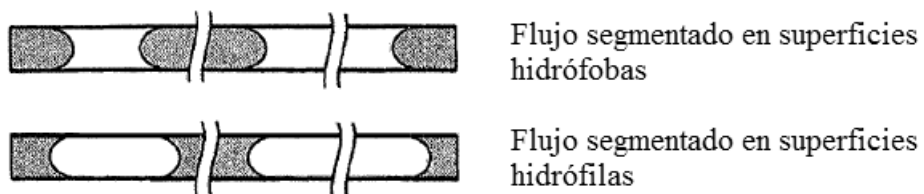


Fig. 2

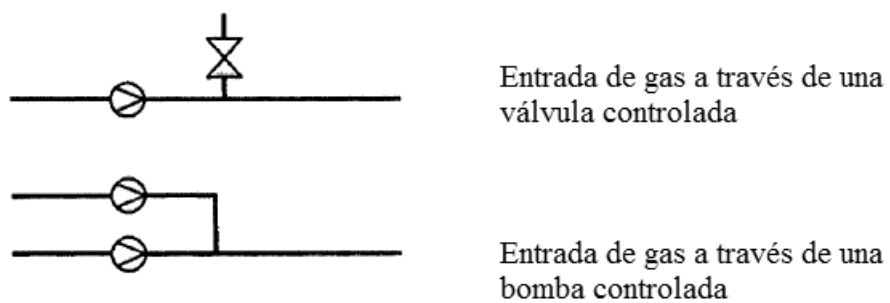


Fig. 3

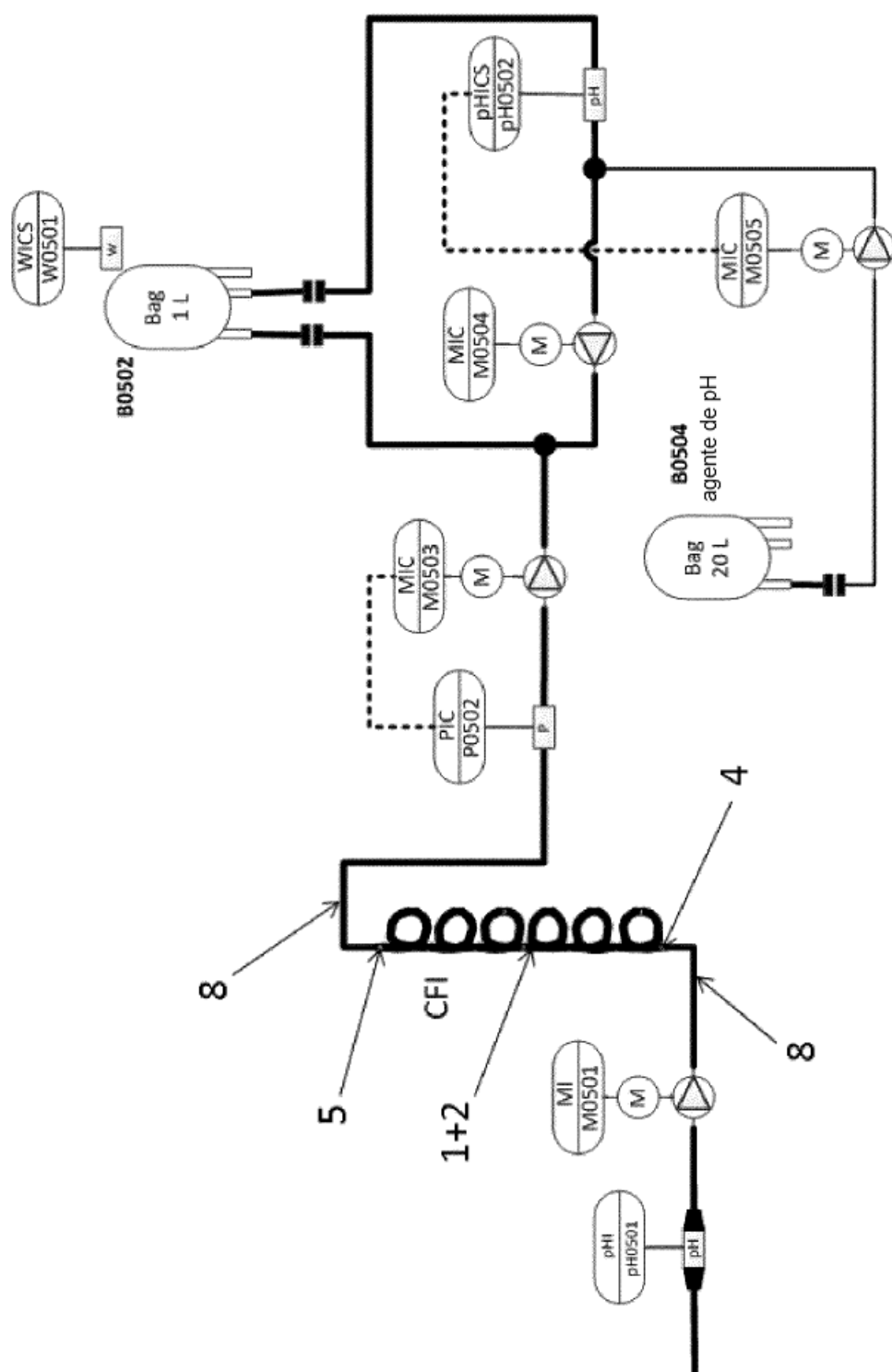


Fig. 4

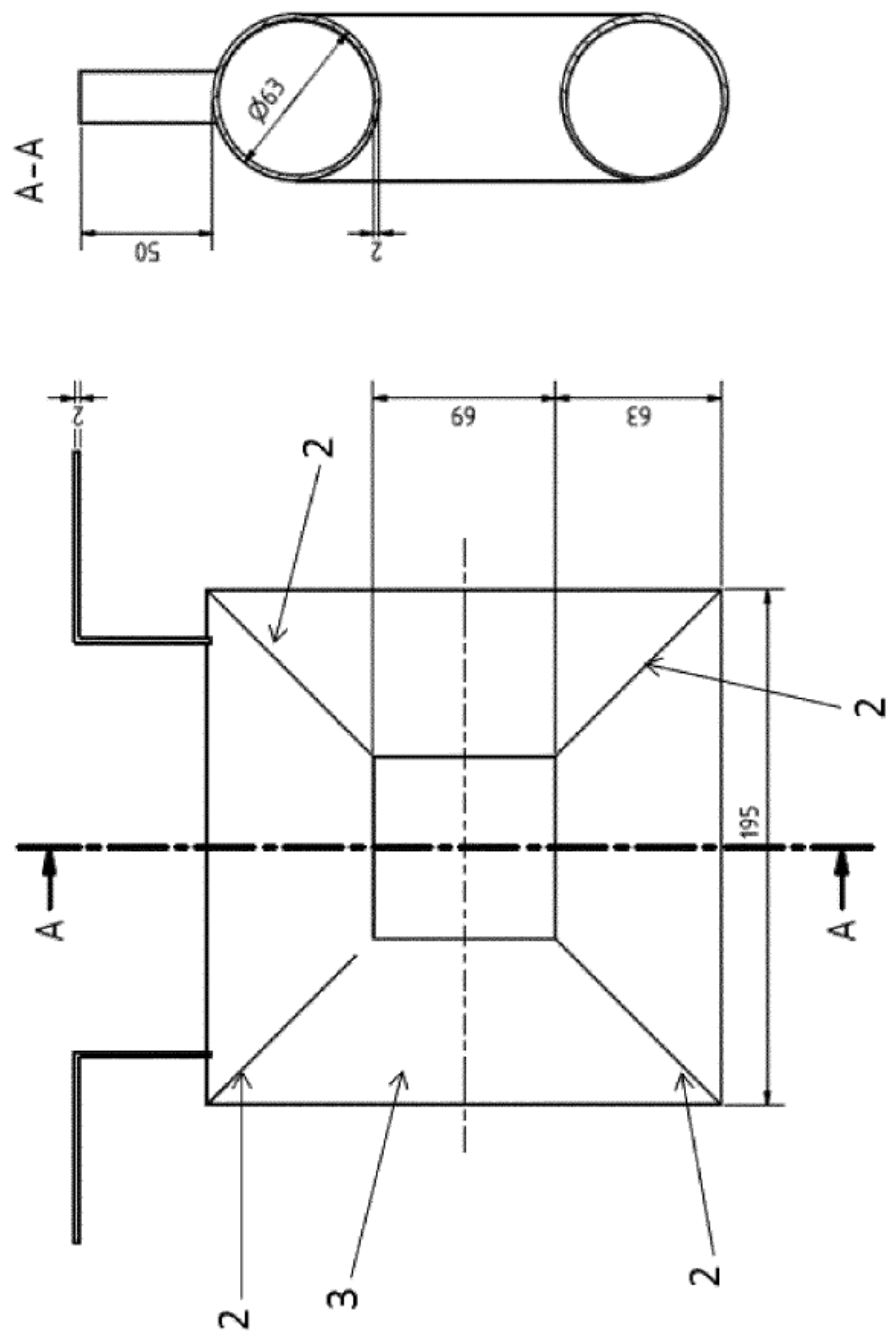


Fig. 5

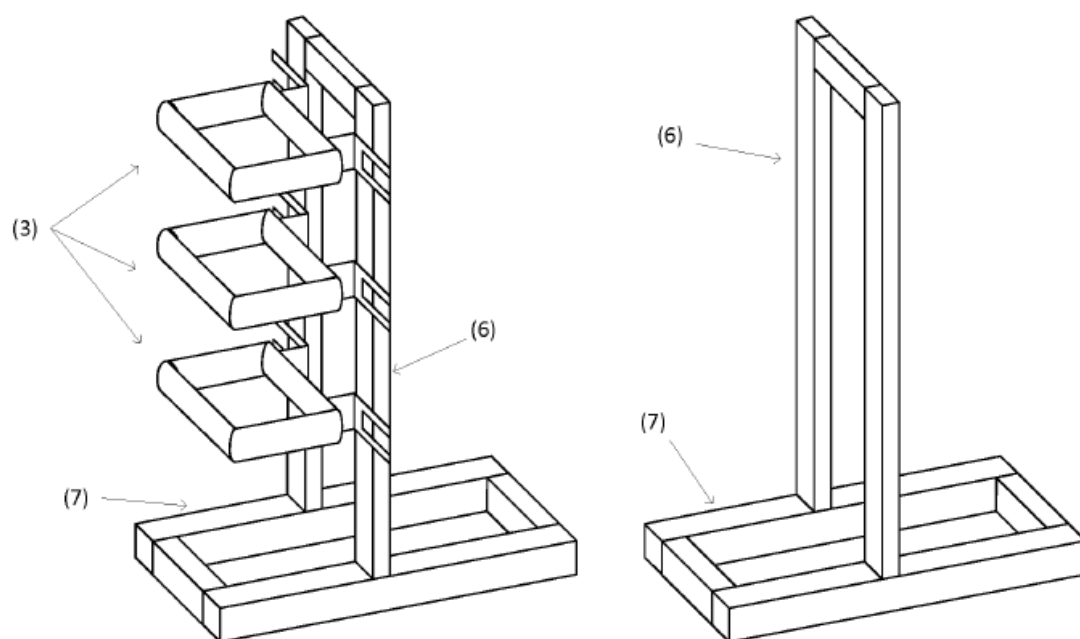


Fig. 6