

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 274**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/BR2014/000199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14197961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14810520 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3007721**

54 Título: **Bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina y polietilenglicol**

30 Prioridad:
14.06.2013 BR 102013017626

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2019

73 Titular/es:
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (100.0%)
Av. Pedro Calmon n° 550 - Reitoria, 2° andar,
Cidade Universitária
21941-901 Rio de Janeiro - RJ, BR**

72 Inventor/es:
**TRAMBAIOLI DA ROCHA E LIMA, LUIS MAURICIO;
GUERREIRO ROSADO, LUIZ HENRIQUE;
AVILA NETTO GUTERRES, MARIANA FERNANDES DE y
MELO VIEIRA GONÇALVES FERREIRA, BRUNO**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 720 274 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

Bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina y polietilenglicol

5 La presente invención se refiere en general a bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina y polietilenglicol, su uso principalmente en el tratamiento de enfermedades asociadas con el depósito o acumulación de amiloide extracelular, que contribuye a la disfunción o el fallo de órganos sistémicos tales como el páncreas.

10 Una realización particular de la invención, sin excluir cualquier otra, se refiere a bioconjugados de amilina humana sintética o natural y polietilenglicol, y el uso de los mismos en el tratamiento de la diabetes, y los efectos tóxicos causados por la construcción de oligómeros de amilina en la superficie de la membrana de células beta pancreáticas. Dicha construcción contribuye en la patogénesis de la diabetes. La conservación de estas células, ya deterioradas en los pacientes diabéticos, por lo tanto, es un beneficio que se buscaba en la técnica.

15 Antecedentes

La amilina, un polipéptido amiloide de los islotes de Langerhans, identificado como CAS RN: 106602-62-4, es una hormona de las células beta pancreáticas, que se co-secreta con la insulina en respuesta a la alimentación y complementa los efectos de la insulina en el control de la glucosa postprandial. Es un polipéptido de 37 aminoácidos, que se co-secreta con la insulina en una proporción insulina:amilina de 100:1.

25 Las actividades beneficiosas de la amilina en diabetes y obesidad se conocen: aumento en la saciedad lo que da lugar a una ingestión reducida de alimento y la reducción consiguiente de peso; el vaciado gástrico retardado, que mejora los perfiles de metabolismo de glucosa con picos postprandiales y reducción de los niveles de glucagón en pacientes diabéticos.

Los pacientes con diabetes tipo 1 prácticamente no tienen producción de amilina natural, mientras que los pacientes con diabetes de tipo 2 de larga duración tienen niveles menores que los individuos sanos.

30 Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el uso de amilina estructuralmente no modificada como principio activo farmacéutico no es posible. Su solubilidad limitada en solución acuosa ha dado lugar al desarrollo de un compuesto mimético de amilina más soluble, la pramlintida, en la que tres de los 37 aminoácidos de la amilina murina se han reemplazado por prolina. Existe un producto comercial que se corresponde con la pramlintida llamado Symlin®.

35 Aunque la solubilidad de la pramlintida es mayor que la de amilina humana, la pramlintida es más similar a la amilina murina que a la humana, y no tiene una buena estabilidad a pH neutro, de manera que el producto Symlin® se proporciona como una solución ácida. La amilina murina muestra una reducción de la propensión a la aglomeración amiloide en comparación con la amilina humana, lo que sugiere una propensión general para la amilina y sustancias miméticas de amilina. Este producto se tiene que administrar en inyecciones subcutáneas justo después de las comidas con el fin de aumentar los niveles de amilina postprandial. Debido a su corta semivida de 10 a 15 min, dichas inyecciones de pramlintida aumentan la concentración de amilina en la corriente sanguínea como una serie de picos, no siendo capaz de restaurar los niveles basales de amilina durante el ayuno. En la bibliografía científica, la pramlintida se puede asociar con un alto riesgo de hipoglucemia inducida grave, y otros efectos adversos tales como náuseas, vómitos, anorexia y fatiga.

45 La bibliografía técnica no parece que se haya enfocado en una solución para la tendencia a aglomerarse de la amilina humana o el depósito de amilina y sus efectos perjudiciales en las membranas de las células beta, y no hay disponible ninguna solución.

50 Sin estar ligados a teoría alguna, existen indicaciones de que el colesterol de la membrana plasmática de las células beta es el factor clave en la regulación de la denominada polimerización de amilina, y su depósito en dichas membranas. La ausencia o el nivel bajo de colesterol en la membrana plasmática – que es un aspecto habitual en diabetes – inhibe la internalización de los oligómeros de amilina, y favorece la acumulación extracelular potenciando la citotoxicidad de amilina en este estado, dando dicha toxicidad como resultado la apoptosis o destrucción de células beta. Por otra parte, la internalización de amilina monomérica depende del contenido en colesterol de la membrana plasmática.

60 En resumen, una serie de estudios correlaciona la polimerización y el depósito de amilina – con su correspondiente toxicidad – en la superficie de la membrana plasmática de las células beta en ausencia o menor presencia de colesterol y/o con el aumento de gravedad de la diabetes mellitus tipo 2.

Hasta el presente no existen medicamentos o activos farmacéuticos conocidos para el control de la glucemia que también inhiban la agregación de amilina humana o compuestos miméticos de amilina.

65 La presente invención en general se centra en la conjugación de amilina humana y polietilenglicol, y el uso de los mismos en la inhibición de la agregación extracelular de amilina, sin inducir la toxicidad relacionada con la formación

de oligómeros y agrupamientos de amilina.

El texto a continuación se tiene que entender con los siguientes aspectos: (1) la mención de bioconjugados de amilina con polietilenglicol también engloba los bioconjugados de compuestos miméticos de amilina con polietilenglicol; (2) la expresión "compuestos miméticos de amilina" también incluye, para facilidad de la expresión, la amilina humana, natural o sintética, (3) la mención de diabetes también engloba otras enfermedades y disfunciones directa o indirectamente relacionadas con la aglomeración/depósito de compuestos miméticos de amilina.

El uso de los bioconjugados de la invención, particularmente los bioconjugados de amilina humana, presenta distintos beneficios, particularmente la mayor estabilidad del organismo diabética, lo que está altamente recomendado por los métodos como característica deseable de los medicamentos de esta naturaleza:

- aumento de la semivida plasmática, en comparación con amilina y sustancias aminomiméticas tales como pramlintida, permitiendo por lo tanto una permanencia más larga en la corriente sanguínea;
- dosis menores o menos inyecciones para imitar el efecto de la amilina natural;
- buen control de la glucemia;
- reducción de náuseas;
- alta saciedad con respecto a la alimentación;
- baja velocidad de vaciado gástrico;
- mayor solubilidad que la amilina humana;
- reducción de los niveles de glucagón, mejorando por lo tanto el control de la glucosa.

Descripción de los dibujos

- Figura 1 – Cromatograma de la amilina monopegilada obtenida por la reacción de amilina humana y mPEG;
- Figura 2 – Espectrometría de masas que muestra la caracterización de la amilina humana monopegilada;
- Figuras 3 y 4 – ensayos de la interacción de unión con el co-receptor RAMP2 y RAMP3 para la amilina humana monopegilada purificada y libre.
- Figura 5 - ensayo para los amiloides agregados;
- Figura 6 – comparación de estabilidad del plasma entre la amilina libre y la amilina humana monopegilada.

Descripción de la invención

La invención se refiere en general a entidades químicas que tiene el objetivo de evitar la toxicidad típica causada por los compuestos de amilina humana y miméticos de amilina, disminuyendo o evitando la aglomeración (también mencionado en la bibliografía como polimerización), el depósito o fibrilación en las células beta pancreáticas y, en consecuencia, evitar los efectos perjudiciales que la apoptosis o destrucción de dichas células beta pancreáticas causan al organismo humano.

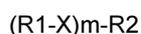
En el primer aspecto al invención se refiere a nuevos bioconjugados no aglomerantes de compuestos de amilina humana y polietilenglicol que se caracterizan por el hecho de que dicho bioconjugado contiene al menos una unidad de polietilenglicol (pudiéndose obtener por lo tanto compuestos monoconjugados o policonjugados), unidos covalentemente a los dos átomos de nitrógeno que se originan por los restos amino alfa y épsilon (cadena lateral) del resto de lisina 1 de la cadena polipeptídica de amilina, en el que los compuestos bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol de fórmula I



donde

- R1 representa un resto de metoxipolietilenglicol (mPEG) y espaciadores funcionales con distintos pesos molares medios,
- R2 representa compuestos de amilina humana,
- X representa NH u O,
- m representa el número de unidades del polímero de mPEG (R1) conjugado con compuestos de amilina humana (R2) obtenido de la conjugación de mPEG-succinimidilo con compuestos de amilina humana mediante un enlace amida o éster por reacción de la amina primaria o restos de hidroxilo funcionales;

y compuestos de fórmula II



donde

- R1 representa un resto metoxipolietilenglicol (mPEG) y espaciadores funcionales con distintos pesos molares

medios,
 R2 representa compuestos de amilina humana,
 X representa NH u O,
 m representa el número de unidades de polímero mPEG (R1) conjugado con compuestos de amilina humana
 (R2) obtenido de la conjugación de aldehído de mPEG con compuestos de amilina humana.

La mención de compuestos miméticos de amilina en los bioconjugados de la invención engloba derivados activos de dichos compuestos miméticos de amilina tales como sales, isómeros, hidratos, solvatos, profármacos, metabolitos, polimorfos e isómeros.

Es importante recordar que la mención de compuestos miméticos de amilina, en el presente documento, engloba la propia amilina humana, sea natural o sintética o una bio-semi-sintética.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de los nuevos bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina con polietilenglicol en la prevención del tratamiento de enfermedades o problemas causados o favorecidos por el depósito o acumulación de amiloide que da lugar a disfunción o fallo de órganos sistémicos (es decir, órganos o tejidos externos al sistema nervioso central) ,tal como la hiperglucemia, diabetes, baja tolerancia a glucosa o metabolismo de glucosa deficiente, obesidad, síndrome metabólico y trastorno alimentarios, e indirectamente a problemas y enfermedades vasculares que dan como resultado el aumento de presión sanguínea, tal como aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedades cardíacas en general, enfermedad de Alzheimer.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de nuevos bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina con polietilenglicol para la preparación de productos de baja toxicidad, medicamentos, composiciones y asociaciones útiles para la prevención o tratamiento de enfermedades causadas o favorecidas por el depósito o acumulación de amiloide que da lugar a disfunción o fallo de órganos sistémicos.

En otro aspecto más, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de baja toxicidad que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los nuevos bioconjugados no aglomerantes de compuestos miméticos de amilina con polietilenglicol y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones son adecuadas para una variedad de formas de administración tales como la oral, entérica, parenteral, lingual, sublingual, nasal, dérmica, epidérmica, transdérmica, mucosa, vaginal, rectal, ocular, etc.

Las composiciones de la invención se presentan en cualquier forma de dosificación necesaria o adecuada, tales como en solución, suspensión, emulsión, microemulsión, espuma, pasta, crema, comprimidos, cápsulas (duras o blandas, supositorios), bolos, geles, polvos, aerosoles, pulverizadores, etc.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se emplean en la composición de la invención son conocidos por el experto habituado en la técnica tal como los descritos, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, Mack Publishing Co., New Jersey (1991). Como ya se sabe, los excipientes específicos se escogen de acuerdo con la vía de administración deseada, en la práctica del área farmacológica.

La composición farmacéutica de la invención puede comprender adicionalmente uno o más principios activos, distintos de la amilina humana, tales como (sin excluirse entre ellos) insulina, iones (tales como zinc y sodio), antidiabéticos, antibióticos, antihipertensivos, antirretrovirales, etc. Dichas composiciones pueden ser inmediatas, retardadas o de liberación lenta, incluyendo también la administración de que la administración del nuevo bioconjugado de amilina humana sea concomitantes o secuencias con los otros principios activos.

Otro aspecto más de la invención se refiere al uso de los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol como un adyuvante en la prevención o tratamientos de enfermedades causadas o favorecidas por el depósito o acumulación de amiloide que da lugar a la disfunción o fallo de órganos sistémicos.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un medicamento caracterizado por el hecho de que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más bioconjugados de amilina humana y polietilenglicol.

Otro aspecto más de la invención se refiere a bioconjugados de amilina humana y polietilenglicol, así como productos, medicamentos, composiciones y asociaciones que los comprenden, caracterizados por el uso en terapia médica.

Otro aspecto más de la invención se refiere al método o tratamiento o prevención de enfermedades causadas o favorecidas por el depósito o acumulación de amiloide, caracterizado porque comprende la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más bioconjugados de compuestos miméticos de amilina, particularmente amilina humana, y polietilenglicol.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se refieren a realizaciones particulares de la presente invención y no pretenden, de ninguna manera, limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

5

1. Preparación de un conjugado de acuerdo con la invención

Se hizo reaccionar durante 2 h a 25 °C de una solución de amilina humana a 5 mg/ml en presencia de 10 mM de PBS (solución tampón de fosfato) pH 7,4, y un exceso molar de 5 mPEG/ 1 amilina humana.

10

La reacción se interrumpió por la adición de una cantidad igual de acetonitrilo al 30 %/ácido trifluoroacético al 0,1 % (en agua) y luego se llevó a cabo una cromatografía en una columna C18 Kromasil de fase inversa a 4 mg/min, con el detector fijado en 220 nm. (Kromasil es un producto lineal comercializado por Separation Product Group, un departamento de AkzoNobel Company, Suecia). Este proceso de purificación se muestra en la figura 1. El cromatograma muestra un pico de amilina monoPEGilada a los 12 minutos.

15

Se llevó a cabo una espectrometría de masas con ionización y desorción láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) para caracterizar la amilina humana monoPEGilada. La Figura 2 muestra el pico de amilina humana monoPEGilada a 9 kDa.

20

2. Ensayo de unión al receptor de la amilina humana y la amilina humana monoPEGilada

La amilina humana monoPEGilada purificada se ensayó en cuanto a la interacción de unión con el co-receptor RAMP2 y RAMP3.

25

Se marcó la RAMP (proteína modificadora de la actividad receptora) con isotiocianato de fluoresceína durante 1 h a 4 °C en PBS (con suero fetal bovino) pH 7,4 y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en Sepharose G25 (medio de cromatografía basado en agarosa, suministrado por la compañía de EE. UU. GE Healthcare) utilizando el mismo tampón. Se confirmó el marcado por mediciones de la absorbancia de UV a A280 y A490, permitiendo la estimación de la eficacia de acoplamiento, que se basa en aproximadamente 0,5 fluoresceína/molécula de RAMP. La unión se llevó a cabo midiendo la anisotropía de fluorescencia de RAMP-FITC (isotiocianato de fluoresceína) en función de amilina murina, amilina humana PEGilada y utilizando la lisozima de la clara de huevo de gallina (HEWL) como control de la unión no específica.

30

De acuerdo con las Figuras 3 y 4, el ensayo de unión muestra una afinidad de unión aparentemente similar de ambas amilinas humanas purificada monoPEGilada y libre para los co-receptores RAMP2 y RAMP3 en ensayo duplicados (amilina humana monoPEGilada Cn^o1, Cn^o2; y amilina libre n^o 1 y n^o 2), indicando que el resto de PEG no interfiere la afinidad del co-receptor. El ensayo de control utilizando HEWL muestra la unión no específica del co-receptor.

35

3. Efecto de la PEGilación en el perfil de agregación de la amilina humana

La amilina humana purificada monoPEGilada del Ejemplo 1 se resuspendió en DMSO y se diluyó en PBS pH 7,4 y se le permitió incubar a 37 °C. Se evaluaron las muestras en cuanto a agregados de amiloide utilizando la sonda de tioflavina T (ThT) cromogénica de amiloide.

45

La Fig. 5 muestra los resultados. La amilina humana libre se agrega muy rápido, en 3 días casi toda la amilina humana libre estaba agregada en forma de amiloide. La amilina humana monoPEGilada, el día 7, aún no mostraba signos de agregación. Este ensayo prueba que el proceso de PEGilación era capaz de inhibir la aglomeración de la amilina humana.

50

4. Farmacocinética del producto de amilina humana PEGilada

La farmacocinética del producto de amilina humana monoPEGilada se caracterizó *in vivo* en ratones Swiss. Los ratones se alojaron en una habitación de temperatura controlada con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. El agua y el alimento se suministraban *ad libitum*. Se formaron dos grupos, control (amilina humana libre, no PEGilada) y amilina PEGilada. Los animales recibieron 100 µl de solución salina que contenían 10 µg de péptidos de amilina humana, sea amilina humana libre o amilina humana monoPEGilada purificada. Se recolectó sangre por vía retro-orbital del ratón (n = 3 ratones para cada intervalo de tiempo), y se sometió el plasma a un ensayo ELISA para la amilina humana según el fabricante (Millipore, número de catálogo EZHA-52K - <http://www.millipore.com/catalogue/item/ezha-52k>).

60

La Figura 6 muestra la caída plasmática rápida de amilina libre, mientras que la amilina humana monoPEGilada muestra una mayor duración de estabilidad en el plasma. Este ensayo prueba que el proceso de PEGilación de la amilina humana es capaz de aumentar su semivida.

65

REIVINDICACIONES

1. Bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol, en los que dicho bioconjugado contiene al menos una unidad de polietilenglicol unida covalentemente al átomo de nitrógeno que forman los restos alfa y/o épsilon (cadena lateral) del resto de lisina 1 de la cadena polipeptídica de amilina; en el que los bioconjugados no aglomerantes de compuestos de amilina humana y polietilenglicol, tienen la fórmula I



10 donde R1 representa un resto de metoxipolietilenglicol (mPEG) y espaciadores funcionales con distintos pesos molares medios,
R2 representa la amilina humana,
X representa NH u O,
15 m representa el número de unidades del polímero de mPEG (R1) conjugado con la amilina humana (R2) obtenido de la conjugación de mPEG-succinimidilo con la amilina humana, mediante un enlace amida o éster por reacción de la amina primaria o restos de hidroxilo funcionales;

o compuestos de fórmula II



donde

25 R1 representa un resto metoxipolietilenglicol (mPEG) y espaciadores funcionales con distintos pesos molares medios,
R2 representa la amilina humana,
X representa NH u O,
m representa el número de unidades de polímero mPEG (R1) conjugado con la amilina humana (R2) obtenido de la conjugación de aldehído de mPEG con la amilina humana.

30 2. Los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en los que dicha amilina humana es natural, sintética o bio-semisintética.

35 3. Los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en los que dicha amilina humana está en forma de sal, isómero, hidrato, solvato, profármaco, polimorfo e isómero de la misma.

40 4. Los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1, en los que dichos bioconjugados, así como los productos farmacéuticos, medicamentos, composiciones y asociaciones que comprenden dichos bioconjugados son para su uso en terapia médica.

45 5. Los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades y disfunciones causadas o favorecidas por el depósito o acumulación de amiloide.

50 6. Los bioconjugados no aglomerantes de amilina humana y polietilenglicol para el uso de la reivindicación 5, en el que dichas enfermedades o disfunciones se seleccionan de entre el grupo que consiste en hiperglucemia, diabetes, baja tolerancia a la glucosa o metabolismo deficiente de la glucosa, obesidad, síndrome metabólico, trastornos alimentarios, aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus, enfermedad coronaria cardíaca, enfermedades cardíacas y enfermedad de Alzheimer; preferentemente en la que la enfermedad o disfunción es la diabetes mellitus.

55 7. Los bioconjugados de amilina humana y polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la preparación de productos de baja toxicidad útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades causadas o favorecidas por el depósito o acumulación de amiloide.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un bioconjugado no aglomerante de amilina humana con polietilenglicol de acuerdo con la reivindicación 1 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

60 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente uno o más principios activos distintos de la amilina humana.

65 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho uno o más principios activos distintos de la amilina humana se seleccionan de entre el grupo que consiste en insulina, iones tales como de zinc o sodio, antidiabéticos, antibióticos, antihipertensivos, y antirretrovirales; preferentemente en los que uno o más principios activos distintos de la amilina humana es la insulina.

11. Un adyuvante que comprende un bioconjugado no aglomerante de una amilina humana y polietilenglicol como se describe en la reivindicación 1, para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades.
- 5 12. Un medicamento que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un bioconjugado no aglomerante de amilina humana y polietilenglicol como se describe en la reivindicación 1.
13. Un procedimiento para obtener un bioconjugado de amilina humana y PEG que comprende las etapas de:
- 10 a. reacción de una solución de amilina humana con un exceso de mPEG (metoxipolietilenglicol);
b. interrupción de la reacción;
c. purificación del producto de la reacción;
d. secado del producto purificado.
- 15 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en el que
- La etapa a comprende la reacción durante 2 h a 25 °C de una solución de amilina humana a 5 mg/ml en presencia de PBS (solución tampón de fosfato) 10 mM a pH 7,4 y un exceso molar de 5 de mPEG / 1 de amilina humana;
- 20 La etapa b comprende la adición de una cantidad igual de un 30 % de acetonitrilo / 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua para interrumpir la reacción.

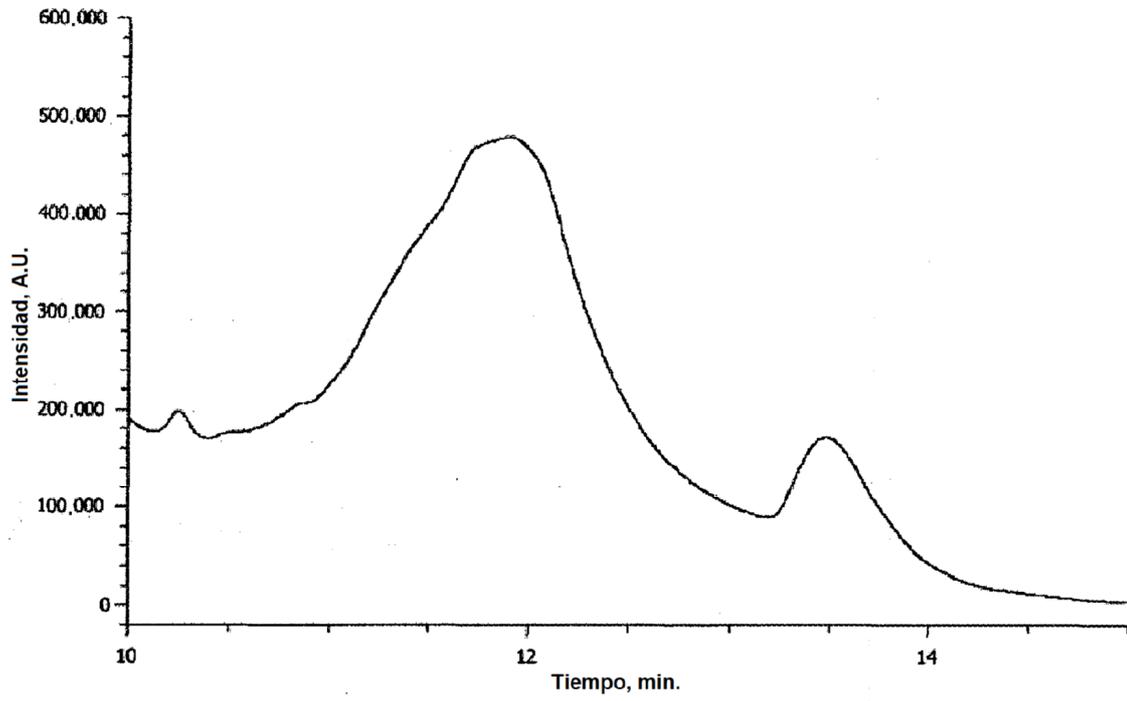


FIG. 1

Fig 2

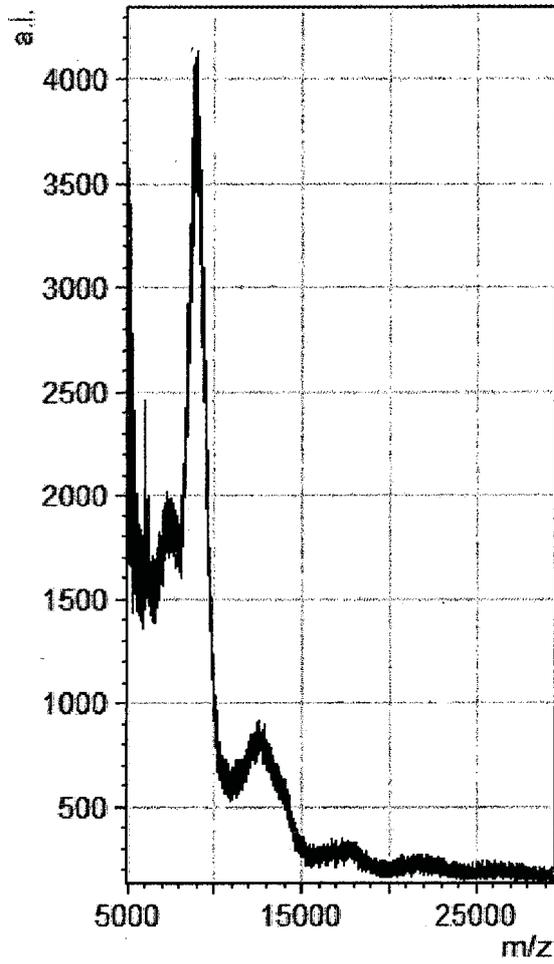


FIG. 2

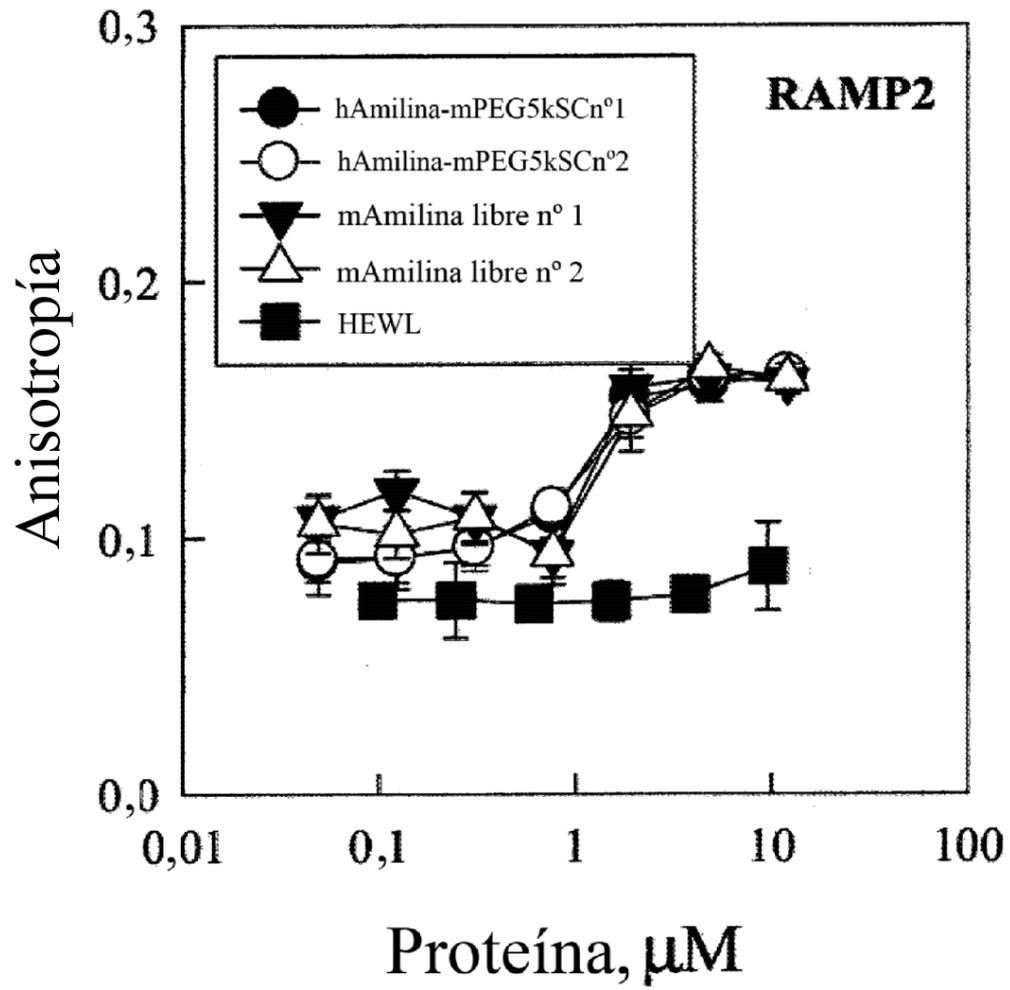


FIG. 3

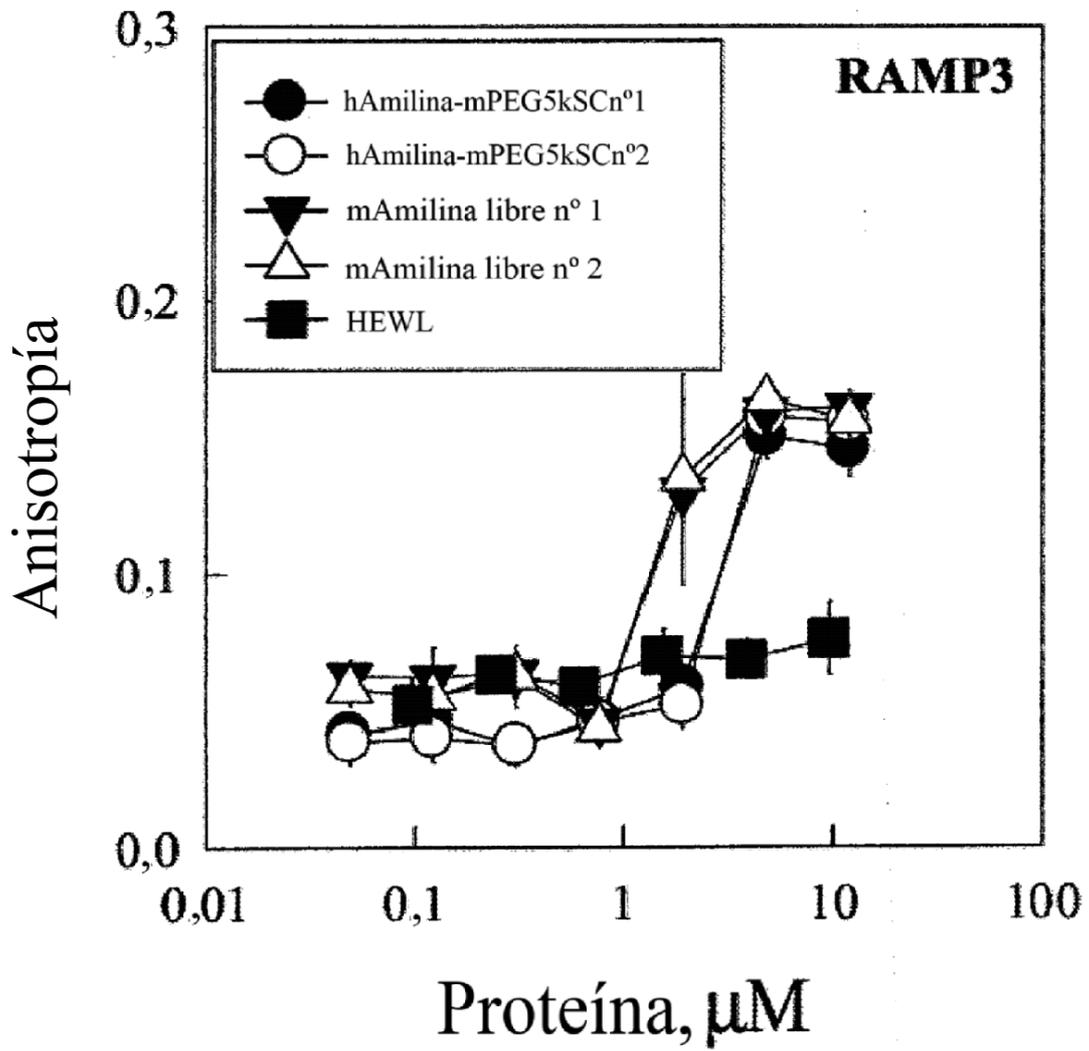


FIG. 4

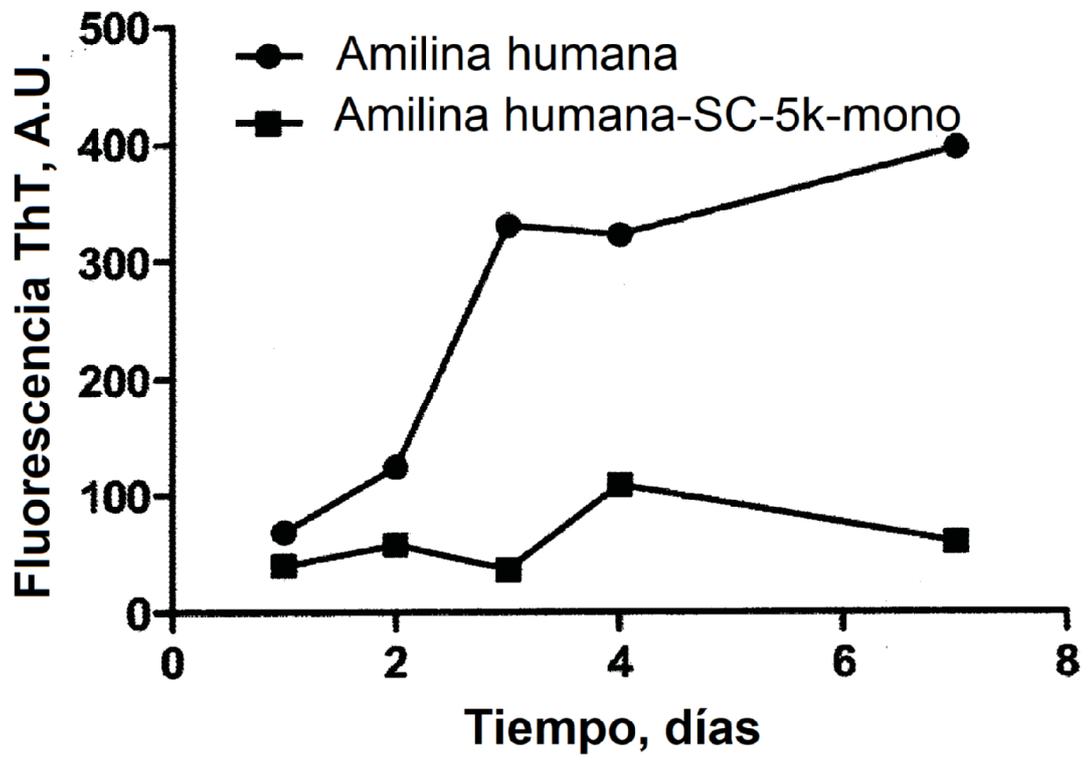


FIG. 5

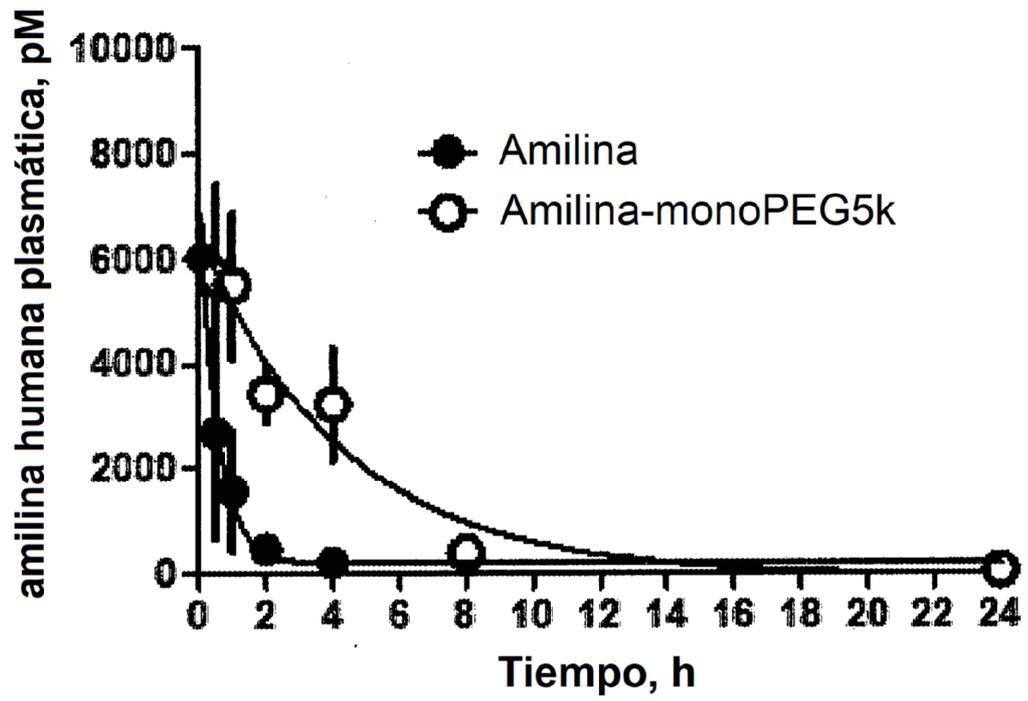


FIG. 6