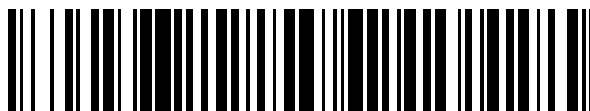


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 883**

51 Int. Cl.:

**G01N 35/00** (2006.01)

**G01N 35/04** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2013 E 13181183 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2840398**

54 Título: **Estación de trabajo de preparación de muestras**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2019**

73 Titular/es:  
**BIOTAGE AB (100.0%)**  
**P.O. Box 8**  
**751 03 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:  
**ANDERSSON, LARS y**  
**WILLIAMS, LEE**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 720 883 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

Estación de trabajo de preparación de muestras.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a instrumentos de laboratorio, en particular a instrumentos para la preparación automatizada de muestras líquidas para análisis posteriores.

### 10 Antecedentes

La Extracción en Fase Sólida (SPE) es una técnica muy simple de usar, empleando columnas o microplacas de extracción desechables (ver Figura 1) que están disponibles en una amplia gama de volúmenes, formatos y sorbentes de reservorio. En principio, la SPE es análoga a la extracción líquido-líquido (LLE). Cuando una muestra líquida pasa a través de la columna de SPE, los compuestos se "extraen" de la muestra y se adsorben en el soporte o material absorbente en la columna. Las interferencias se pueden eliminar selectivamente de la columna con la opción correcta de lavado o disolventes de elución de interferencia. Finalmente, los analitos deseados pueden recuperarse selectivamente de la columna mediante un disolvente de elución, dando como resultado un extracto altamente purificado. La concentración de analito en este extracto es a menudo más alta que en la muestra original.

Alternativamente, se puede seleccionar una columna de extracción que retenga las interferencias presentes en la muestra, pero permite que los analitos pasen sin ser retenidos, lo que proporciona limpieza pero no enriquecimiento de la traza del analito. Los sorbentes de SPE tienen un tamaño de partícula promedio típico de 30-50  $\mu\text{m}$ . Muchos solventes orgánicos pueden fluir a través de columnas o placas de SPE por gravedad, pero para muestras acuosas y solventes más viscosos, los líquidos deben pasar a través del lecho de sorbente usando vacío aplicado a la salida de la columna, presión positiva aplicada a la entrada de la columna o centrifugación (ver Figura 2).

El proceso de extracción líquida con soporte (SLE) es análogo a la extracción líquido-líquido (LLE) tradicional y utiliza los mismos sistemas de disolventes inmiscibles con agua para la extracción de analitos. Sin embargo, en lugar de agitar las dos fases inmiscibles, la fase acuosa se inmoviliza en un material de soporte inerte de tierra de diatomeas y la fase orgánica inmiscible con agua fluye a través del soporte, aliviando muchos de los problemas de manejo de líquidos asociados con el LLE tradicional, como la formación de emulsiones. Como resultado, las recuperaciones a menudo son más altas y demuestran una mejor reproducibilidad de una muestra a otra.

En la preparación de muestras, los principios de LLE tradicional (reparto de analitos entre disolventes orgánicos acuosos e inmiscibles con agua) son bien conocidos y comprendidos. Tradicionalmente, los analitos se extraen de muestras acuosas mediante la adición de un solvente orgánico apropiado inmiscible con agua. Las dos fases inmiscibles se agitan o se mezclan a fondo en un embudo de separación y, en función de la solubilidad relativa de los analitos en las dos fases, los analitos se repartirán en el solvente orgánico. La agitación mejora la eficiencia de la extracción, lo que crea una gran área de superficie para la interfaz de extracción que permite el reparto.

La extracción líquido-líquido puede dar extractos particularmente limpios de fluidos biológicos, ya que los componentes de la matriz como las proteínas y los fosfolípidos no son solubles en los disolventes LLE típicos y, por lo tanto, se excluyen del extracto final. Los mismos beneficios son ciertos para los procedimientos de extracción de líquidos con soporte (SLE).

Debido a que los mismos disolventes inmiscibles con agua se usan en el SLE, las proteínas y los fosfolípidos se eliminan de manera eficiente del extracto final, y no se requieren etapas adicionales como el choque de proteínas (precipitación). Utilizando un procedimiento rápido y simple de carga-espera-elución, la SLE proporciona extractos intrínsecamente más limpios que otras técnicas simples de preparación de muestras, como "diluir y disparar" o precipitación de proteínas. El proceso de extracción eficiente que combina altas recuperaciones de analitos, la eliminación de la formación de emulsiones y la eliminación completa de las interferencias de la matriz, como las proteínas, los fosfolípidos y las sales, resulta en límites de cuantificación más bajos en comparación con la LLE tradicional.

Los productos ISOLUTE® SLE + de Biotage (Uppsala, Suecia) contienen una forma modificada de tierra de diatomeas, que proporciona un soporte para que se produzca el proceso de extracción líquido-líquido, pero no interactúa químicamente con la muestra acuosa. La aplicación de la muestra a la columna hace que la muestra acuosa se extienda sobre la superficie del material, formando una capa inmovilizada de pequeñas gotas mantenidas en su lugar por una red de poros (Figura 3). Cuando se aplica el disolvente de extracción inmiscible con agua para la

etapa de elución, fluye sobre las gotitas acuosas, lo que permite un reparto eficiente del analito. La gran área superficial de la interfaz de extracción y el flujo a través de la naturaleza de la técnica conduce a un procedimiento de extracción muy eficiente, ya que los analitos entran en contacto con solventes nuevos a medida que la fase orgánica se desplaza a través del lecho, imitando un mecanismo de LLE repetido.

5

El procesamiento de las columnas de SLE y las placas de 96 pocillos se realiza en gran medida por gravedad, con un pulso de vacío o presión positiva que se utiliza para iniciar la carga de la muestra y para maximizar la recuperación del disolvente (lo que lleva a una recuperación del analito más reproducible) después de la elución. Se pueden utilizar sistemas de presión positiva o de vacío, tanto manuales como automáticos.

10

Un flujo de trabajo recomendado para procesar columnas y placas ISOLUTE SLE + de Biotage es:

1. Pretratar la muestra según sea necesario (incluida la adición de estándar interno)
2. Asegurar que el recipiente de recolección apropiado esté en su lugar
- 15 3. Cargar la muestra en una columna o placa ISOLUTE SLE +
4. Aplicar vacío (-0,2 bar) o presión (3 psi) durante 2-5 segundos para iniciar la carga
5. Esperar 5 minutos para que la muestra se absorba completamente y forme la capa de extracción
6. Aplicar solvente de extracción inmiscible con agua y deje fluir durante 5 minutos bajo gravedad.
7. Aplicar vacío (-0,2 bar) o presión (10 psi) durante 10-30 segundos para completar la elución
- 20 8. Evaporar el eluato hasta sequedad y reconstituir según sea necesario.

Los sistemas automatizados para transferir muestras líquidas entre contenedores de muestras y contenedores de procesamiento de muestras están disponibles comercialmente. Tales sistemas están disponibles, por ejemplo, de Perkin Elmer bajo el nombre comercial "Janus", de Tecan Trading bajo el nombre comercial "Freedom EVO", y de Tomtec bajo el nombre comercial "Quadra".

25

Tales sistemas generalmente comprenden (i) un contenedor de muestra para contener una muestra, (ii) un contenedor de solvente para contener un solvente, (iii) un contenedor de procesamiento de muestra en forma de columna o una placa de 96 pocillos que comprende un material de procesamiento de la muestra, y (iv) un robot de manejo de líquidos dispuesto para mover una alícuota de la muestra líquida desde el recipiente de la muestra al recipiente de procesamiento de la muestra, y también para mover una alícuota del solvente desde el recipiente del disolvente hasta el recipiente de procesamiento de la muestra.

30

El documento EP0 180511 describe un método para preparar muestras para análisis. Más específicamente, se describe un método en el que al menos un reactivo de reacción y una muestra inicial se inyectan sucesivamente en un cartucho cuya parte superior se ha cerrado previamente de forma sellada, de modo que la inyección del agente de reacción o la muestra provoca un aumento de presión en la parte superior el cartucho adecuado para acelerar el paso del agente de reacción o la muestra a través de la columna. Las ventajas están según la patente de que el tiempo total requerido para la preparación de la muestra se reduce en comparación con las técnicas de la técnica anterior, y que el método no requiere medios de succión.

35

40

El documento US6133045 describe un sistema de extracción al vacío controlado variable para la extracción automatizada de compuestos, tales como ADN genómico y plasmídico. El sistema incluye un alojamiento que define un recinto que incluye una cubierta superior que tiene un pozo abierto para permitir que una placa de muestra anide en ella, un medio de transporte automático para el transporte lateral y la elevación vertical de un residuo y una placa de recolección para abordar selectivamente un área debajo la placa de muestra para el paso de fluido de la placa de muestra y una bomba de vacío de velocidad variable controlada digitalmente acoplada operativamente a dicho alojamiento para evacuar el aire del recinto a un grado por debajo de la presión atmosférica para el paso de fluido de la placa de muestra a cualquier placa de residuos o placa de recolección. El sistema está establecido para minimizar las tareas manuales antes, durante y después de los procedimientos analíticos.

45

50

El documento CH 693 689 describe un aparato para transferir fluidos desde los pocillos de las placas de extracción en fase sólida (SPE). Más específicamente, el aparato está dispuesto para extracción en fase sólida y elución de partículas y fragmentos orgánicos o inorgánicos, y presenta una unidad de transferencia para contener un portador de muestras. Una unidad de ajuste ajusta el espacio vertical entre el portamuestras y las aberturas de salida de la placa de SPE, que se apoya en los bordes del soporte de la placa, que está al menos parcialmente definido por la cámara de succión. Un mecanismo mueve la unidad de transferencia y el portamuestras en un plano en ángulo recto a la vertical.

55

El documento EP 2 490 019 describe un dispositivo de examen y un método de examen para el examen de

60

muestras de sangre total o de plasma/suero. Más específicamente, el dispositivo incluye un cartucho de extracción de fase sólida o un filtro colocado en una pista continua de una mesa de cartuchos. Una mesa de copas está dispuesta debajo de la mesa de cartuchos, y una copa se coloca en una pista continua de la mesa de copas para recibir una muestra purificada por el filtro. Cuando se ve desde arriba, la pista continua de la mesa de cartuchos y la pista continua de la mesa de copas se cruzan entre sí en una posición "m", y cada una de las pistas cruza una posición en la que opera una sonda de muestreo. Un pretratamiento para suero/plasma sanguíneo puede completarse en una rotación de la mesa de cartuchos, y un pretratamiento para sangre completa se finaliza en dos rotaciones de la mesa de cartuchos. Según la patente, esta es una manera eficiente de realizar una serie de exámenes con trabajo reducido, un tiempo más corto para informar y por un dispositivo más pequeño que las alternativas de la técnica anterior.

### Resumen de la invención

La presente invención proporciona un instrumento para el procesamiento de muestras en uso que comprende al menos un recipiente de muestra para contener al menos una muestra líquida;

- al menos un recipiente de solvente para contener al menos un solvente;
- al menos un recipiente de procesamiento de muestras que comprende un material de procesamiento de muestras, en el que dicho recipiente de procesamiento de muestras tiene un extremo superior con una abertura de entrada de líquido y un extremo inferior con una abertura de salida de líquido; y
- un robot de manipulación de líquidos dispuesto para mover una alícuota de dicha muestra líquida desde dicho recipiente de muestra a dicho recipiente de procesamiento de muestras, y para mover una alícuota de dicho solvente desde dicho recipiente de solvente hasta dicho recipiente de procesamiento de muestras;
- una mesa móvil dispuesta debajo del contenedor de procesamiento de muestras, teniendo dicha mesa posiciones para varios contenedores de recolección de líquidos, por lo que el movimiento de dicha mesa posiciona a su vez dichos contenedores de recolección de líquidos directamente debajo de dicho contenedor de procesamiento de muestras;
- un elevador dispuesto para levantar un contenedor de recolección de líquido en posición debajo del contenedor de procesamiento de muestras hasta el nivel de la abertura de salida de líquido de dicho contenedor de procesamiento de muestras; y
- medios para aplicar una presión de gas positiva al extremo superior de dicho recipiente de procesamiento de muestras para empujar los contenidos líquidos de dicho recipiente de procesamiento de muestras a través de la abertura de salida del líquido; en un contenedor de recolección de líquidos, y
- un contenedor de recolección de desechos directamente debajo del contenedor de procesamiento de muestras, en el que dicho contenedor de recolección de desechos se puede mover verticalmente desde una posición debajo de la mesa móvil a una posición por encima de la mesa móvil.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Componentes de una columna de SPE.(1) Reservorio.(2) Lecho absorbente.(3) Punta Luer.(4) Fritas (polietileno, acero inoxidable o Teflon®). Técnica anterior.

Figura 2: Técnicas para el procesamiento de columnas de SPE.(A) Colector de vacío.(B) Centrifugación.(C) Presión positiva (manual).Estado de la técnica.

Figura 3: Mecanismo de extracción de líquidos soportado (SLE).Los triángulos representan el analito, los cuadrados representan los componentes de la matriz (por ejemplo, fosfolípidos, sales y proteínas), los asteriscos representan el soporte de SLE (diatomeas).En la etapa 1, se carga la columna. La muestra acuosa luego fluye sobre el lecho de extracción y se dispersa en pequeñas gotas (etapa 2).En una etapa de elución (etapa 3), los analitos se reparten en el disolvente de elución y se recogen. Estado de la técnica.

Figura 4: Una vista desde arriba del nivel superior del instrumento según la invención.

Figura 5:

- (A) Vista lateral del nivel inferior del instrumento según la invención.
- (B) Vista en perspectiva del nivel inferior del instrumento según la invención.

Figura 6:

(A) Vista superior de una mesa giratoria del nivel inferior del instrumento según la invención.

(B) Vista superior de una mesa giratoria del nivel inferior del instrumento según la invención, que tiene placas de recolección de líquidos en tres posiciones y una placa de conducto de líquidos en una cuarta posición.

5 Figura 7:

(A) Vista lateral del instrumento.

(B) Vista lateral del instrumento en funcionamiento.

## 10 Descripción detallada de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un instrumento relativamente simple que automatice el manejo de líquidos en un laboratorio, y especialmente en la preparación de muestras antes del análisis, con un alto grado de reproducibilidad. Las muestras se transfieren automáticamente mediante una punta de pipeta desechable desde un  
15 recipiente de muestra a un recipiente de procesamiento de muestras, en el que la muestra se procesa como se conoce en la técnica y se describió anteriormente. Luego, la muestra procesada se empuja fuera del contenedor de procesamiento de muestras a un contenedor de recolección de muestras. El contenedor de recolección de muestras se recupera luego del instrumento y la muestra se analiza más a fondo utilizando la tecnología de elección.

20 El instrumento según la presente invención reduce el riesgo de contaminación cruzada entre los contenedores de recolección de muestras al elevar los contenedores de recolección de muestras al nivel de la salida de los contenedores de procesamiento de muestras, o ligeramente por encima. Preferiblemente, la salida del contenedor de procesamiento de muestras tiene una forma que le permite entrar ligeramente en la entrada del contenedor de recolección de muestras. De esta manera, el líquido que sale de un contenedor de procesamiento de muestras se  
25 recolectará en su contenedor de recolección de muestras designado y el riesgo de desviación del líquido, por salpicaduras o de otra manera, a los contenedores de recolección adyacentes se reducirá en gran medida.

El instrumento según la presente invención comprende dos niveles. El nivel superior comprende

- 30 • al menos un recipiente de muestra para contener al menos una muestra líquida;
- al menos un recipiente de solvente para contener al menos un solvente;
- al menos un recipiente de procesamiento de muestras que comprende un material de procesamiento de muestras, en el que dicho recipiente de procesamiento de muestras tiene un extremo superior con una abertura de entrada de líquido y un extremo inferior con una abertura de salida de líquido; y
- 35 • un robot de manipulación de líquidos dispuesto para mover una alícuota de dicha muestra líquida desde dicho recipiente de muestra a dicho recipiente de procesamiento de muestras, y para mover una alícuota de dicho solvente desde dicho recipiente de solvente hasta dicho recipiente de procesamiento de muestras;

El instrumento se describirá ahora con referencia a las figuras. Las figuras muestran una realización del instrumento que utiliza contenedores de procesamiento de muestras en un formato de placa de 96 pocillos. Sin embargo, el instrumento según la invención puede adaptarse para uso con recipientes de procesamiento de muestras en forma de columnas. El instrumento puede estar diseñado para usar dichas columnas individualmente o en estantes, como estantes que sostienen 24 columnas. Las figuras también muestran cómo la mesa móvil del nivel inferior se puede mover por rotación, es decir, es giratoria. La mesa también puede estar dispuesta para ser móvil  
45 en un plano XY paralelo a la placa inferior del instrumento.

La figura 4 muestra una vista desde arriba del nivel superior del instrumento en una realización de la invención. En esta realización, el instrumento está adaptado para su uso con placas de 96 pocillos. En uso, una placa de filtro de 96 pocillos (100) se inserta en el instrumento. La placa del filtro puede ser una placa estándar de SLE o SPE. El  
50 instrumento, en uso, proporciona, además, una placa de muestra (102), una placa de mezcla (104), una gradilla para contener puntas de pipeta de muestra (106), una gradilla para contener pipetas de uso múltiple (108), una bandeja para contener solventes y/o tampones (110), y una bandeja de residuos (112) para las puntas de pipeta usadas. Estas partes del instrumento pueden incluirse en el instrumento tal como se le proporciona al usuario, o el instrumento puede proporcionarse sin ellas para que el usuario elija las partes adecuadas adaptadas a las  
55 necesidades del usuario.

El instrumento proporciona, además, una unidad de pipeta (114). En la realización de 96 pocillos que se muestra en la Figura 4, una unidad de pipeta de ocho cabezas es adecuada para pipetear el contenido de una fila de las placas de 96 pocillos a la vez. La unidad de pipeta (114) está controlada por una unidad central de procesamiento (no se  
60 muestra) y se puede mover en tres dimensiones.

Además, el instrumento comprende una unidad de presión positiva (116). La unidad de presión positiva (116) está montada de manera móvil para poder moverse desde una posición retraída, lo que permite la inserción de una placa de filtro (100) en el instrumento, a una posición de accionamiento inmediatamente por encima de la placa de filtro (100). La unidad de presión positiva (116) puede suministrar una presión positiva controlada a cada pozo en la placa de filtro (100).

La Figura 5A muestra una vista lateral del nivel inferior del instrumento. Este nivel del instrumento comprende una mesa giratoria (200) conectada a un motor paso a paso (202). El motor paso a paso (202) controla la rotación de la mesa (200) a través de cualquier transmisión conveniente, como una transmisión por correa (no mostrada). El nivel inferior también comprende una bandeja de desechos (300) que se puede mover hacia arriba y hacia abajo. El movimiento de la bandeja de residuos es impulsado por un motor (302). La mesa (200) y la bandeja de desechos (300) están montadas en una placa inferior (400).

La Figura 5B muestra una vista en perspectiva de la parte inferior del instrumento. El movimiento de la bandeja de residuos (300) es guiado por rieles guía o ranuras (304). El instrumento también puede incluir un conducto de eliminación de residuos (306) para vaciar la bandeja de residuos (300) sin la necesidad de extraer la bandeja de residuos (300).

La Figura 6A muestra una vista desde arriba de la mesa giratoria (200). La mesa (200) tiene cuatro posiciones (204) para recibir las placas de recolección de líquidos. La Figura 6B muestra una vista desde arriba de la mesa giratoria (200) con posiciones (204) ocupadas por tres placas de recolección de líquido (206) y una placa de conducto de líquido (208). La placa de conducto de líquido (208) tiene el mismo formato de 96 pocillos que la placa de recolección de líquido (206), pero los pocillos están abiertos en la parte inferior, lo que facilita la transferencia de líquido de la placa de filtro (100) a través de la placa de conducto de líquido (208) a la bandeja de residuos (300).

La Figura 7 muestra una vista lateral de los niveles superior e inferior del instrumento. En la Figura 7A, la bandeja de desechos (300) está en su posición más baja. Con la bandeja de desechos (300) en esta posición, la mesa (200) se puede girar para colocar una placa de recolección de líquidos (206) o una placa de conducción de líquidos (208) en posición inmediatamente entre la bandeja de desechos (300) y la placa del filtro (100). En la Figura 7B, la bandeja de desechos (300) se mueve hacia arriba y, a su vez, empuja la placa (206/208) hacia arriba para que esta placa (206/208) haga tope con la parte inferior de la placa del filtro (100). La unidad de presión positiva (116) se puede mover luego a la posición de accionamiento y se utiliza para aplicar presión a los pocillos de la placa de filtro (100), para así empujar el líquido contenido en los pocillos de la placa de filtro (100) dentro de la placa (206/208).

Si los contenidos líquidos de la placa de filtro (100) comprenden el analito de interés para el usuario, la mesa giratoria (200) se gira para colocar una posición (204) que contiene una placa de recolección de líquido (206) en posición para recibir el líquido descargado de la placa del filtro.

Si, por el contrario, el líquido descargado incluye un analito de interés, la mesa giratoria (200) se gira para poner una posición (204) que contiene una placa de tubo líquido (208) en posición para recibir el líquido descargado de la placa del filtro. El líquido descargado pasa luego a través de la placa del conducto de líquido (208) directamente a la bandeja de desechos (300).

**REIVINDICACIONES**

1. Un instrumento para el procesamiento de muestras que comprende
- 5 - al menos un recipiente de muestra (102) para contener al menos una muestra líquida;
- al menos un recipiente de solvente (110) para contener al menos un solvente;
- al menos un recipiente de procesamiento de muestras (100) que comprende un material de procesamiento de
- 10 muestras, en el que dicho recipiente de procesamiento de muestras tiene un extremo superior con una abertura de entrada de líquido y un extremo inferior con una abertura de salida de líquido; y
- un robot de manipulación de líquidos (114) dispuesto para mover una alícuota de dicha muestra líquida desde
- 15 solvente desde dicho recipiente de solvente hasta dicho recipiente de procesamiento de muestras;
- una mesa móvil (200) dispuesta debajo del contenedor de procesamiento de muestras, teniendo dicha mesa posiciones para varios contenedores de recolección de líquidos (206), por lo que el movimiento de dicha mesa coloca a su vez dichos contenedores de recolección de líquidos (206) directamente debajo de dichos contenedores
- 20 de procesamiento de muestras (100);
- medios para aplicar una presión de gas positiva (116) al extremo superior de dicho recipiente de procesamiento de muestras para empujar los contenidos líquidos de dicho recipiente de procesamiento de muestras a través de la
- 25 **caracterizado porque** comprende además
- un elevador (300) dispuesto para levantar un contenedor de recolección de líquido en posición debajo del contenedor de procesamiento de muestras hasta el nivel de la abertura de salida de líquido de dicho contenedor de procesamiento de muestras; y un contenedor de recolección de desechos (300) directamente debajo del contenedor
- 30 de procesamiento de muestras, en el que dicho contenedor de recolección de desechos (300) se puede mover verticalmente desde una posición debajo de la mesa móvil (200) a una posición sobre la mesa móvil.
2. Instrumento según la reivindicación 1, que comprende, además, en una posición de la mesa móvil, un
- 35 conducto de líquido para dirigir un flujo de líquido desde la abertura de salida del recipiente de procesamiento de muestras al recipiente de recolección de residuos.
3. El instrumento según con la reivindicación 1 o 2, en el que la mesa móvil puede girar alrededor de un eje centrado.
- 40 4. El instrumento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que una pluralidad de contenedores de procesamiento de muestras y una pluralidad de contenedores de recolección de líquidos, respectivamente, están dispuestos en un formato de placa de múltiples pocillos o en bastidores de columnas.

Fig 1

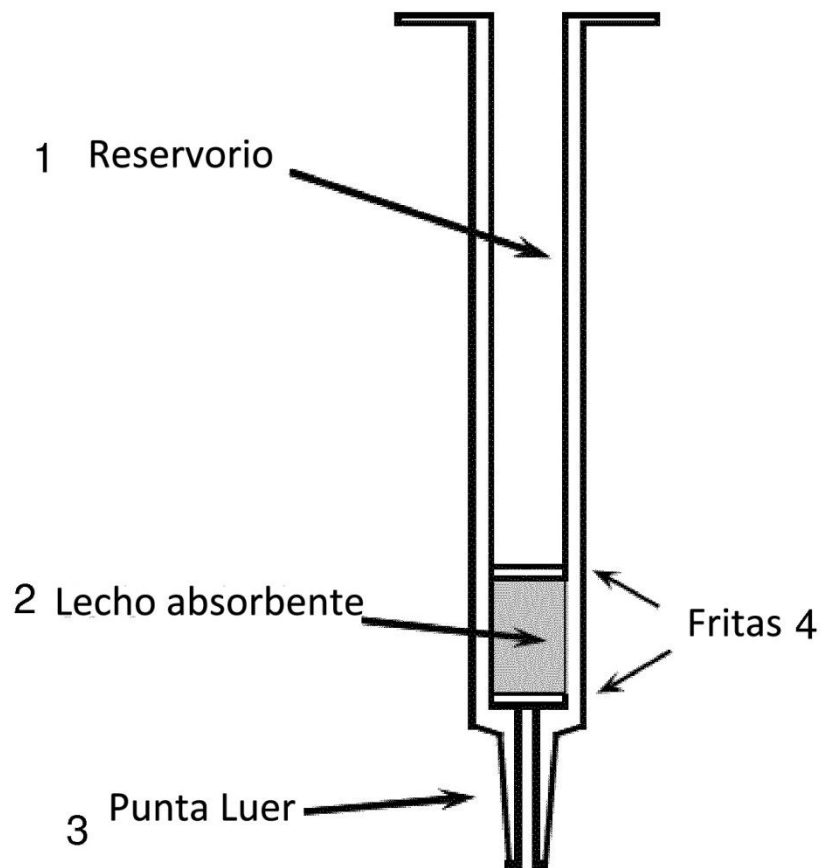
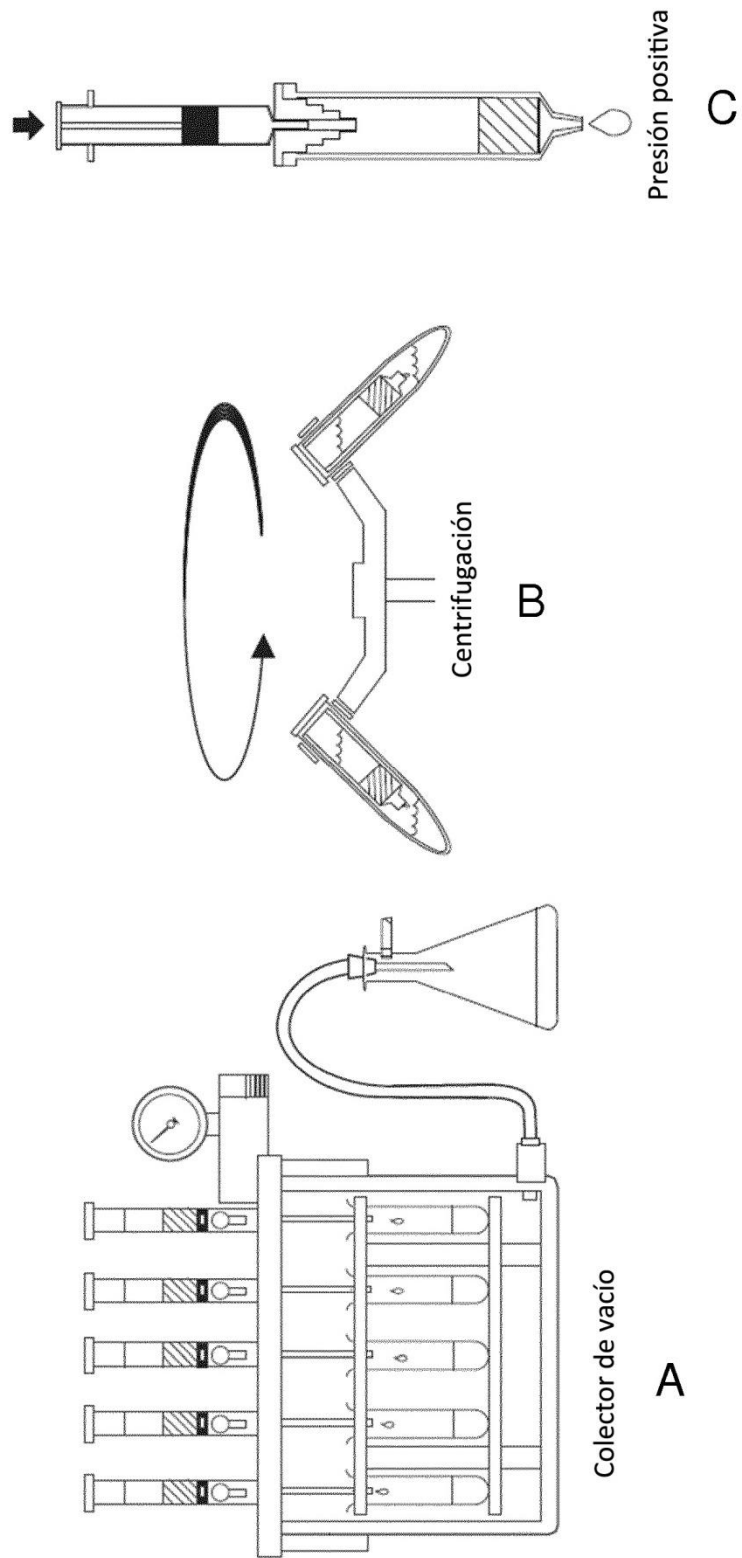




Fig 2



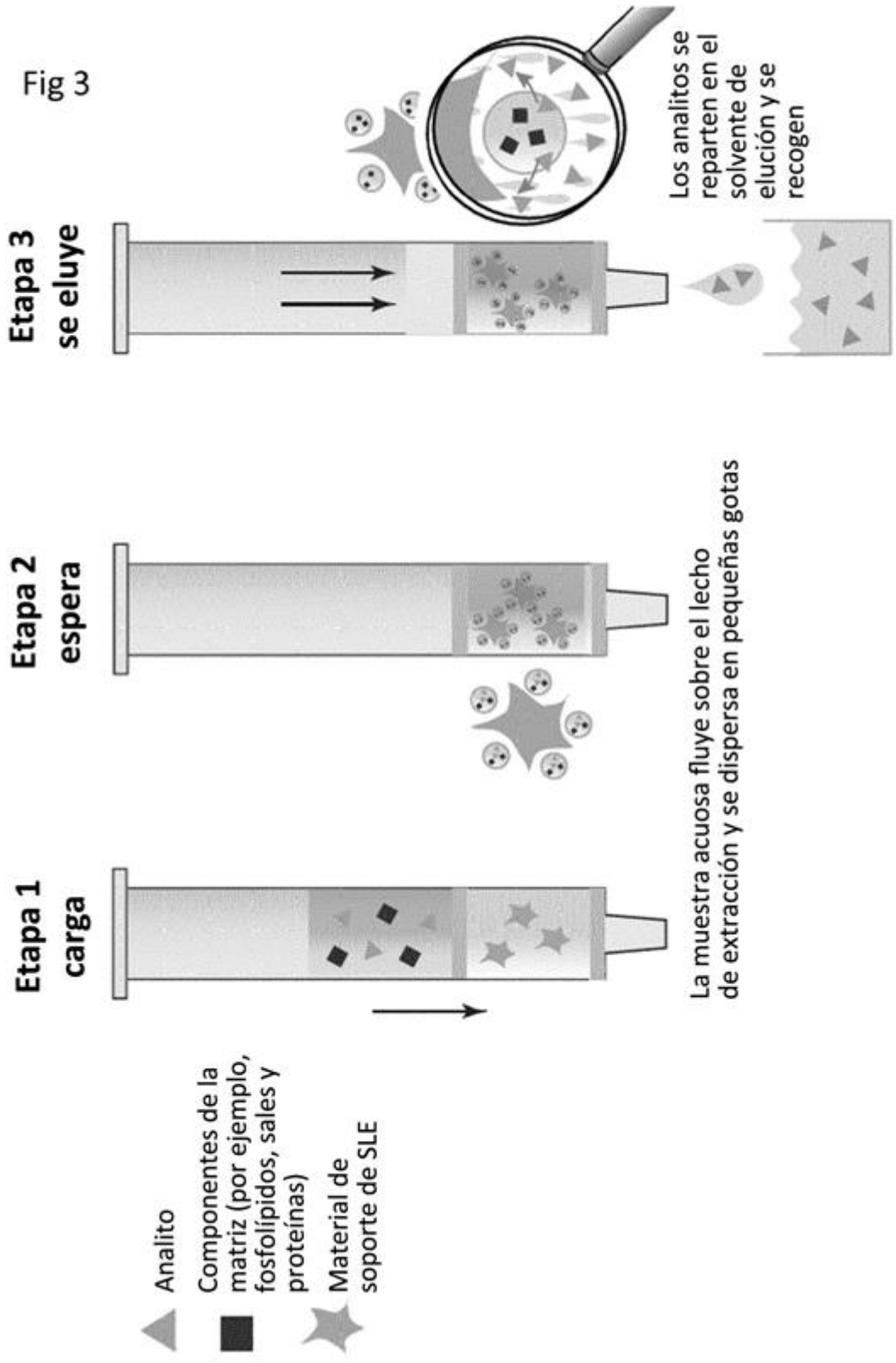
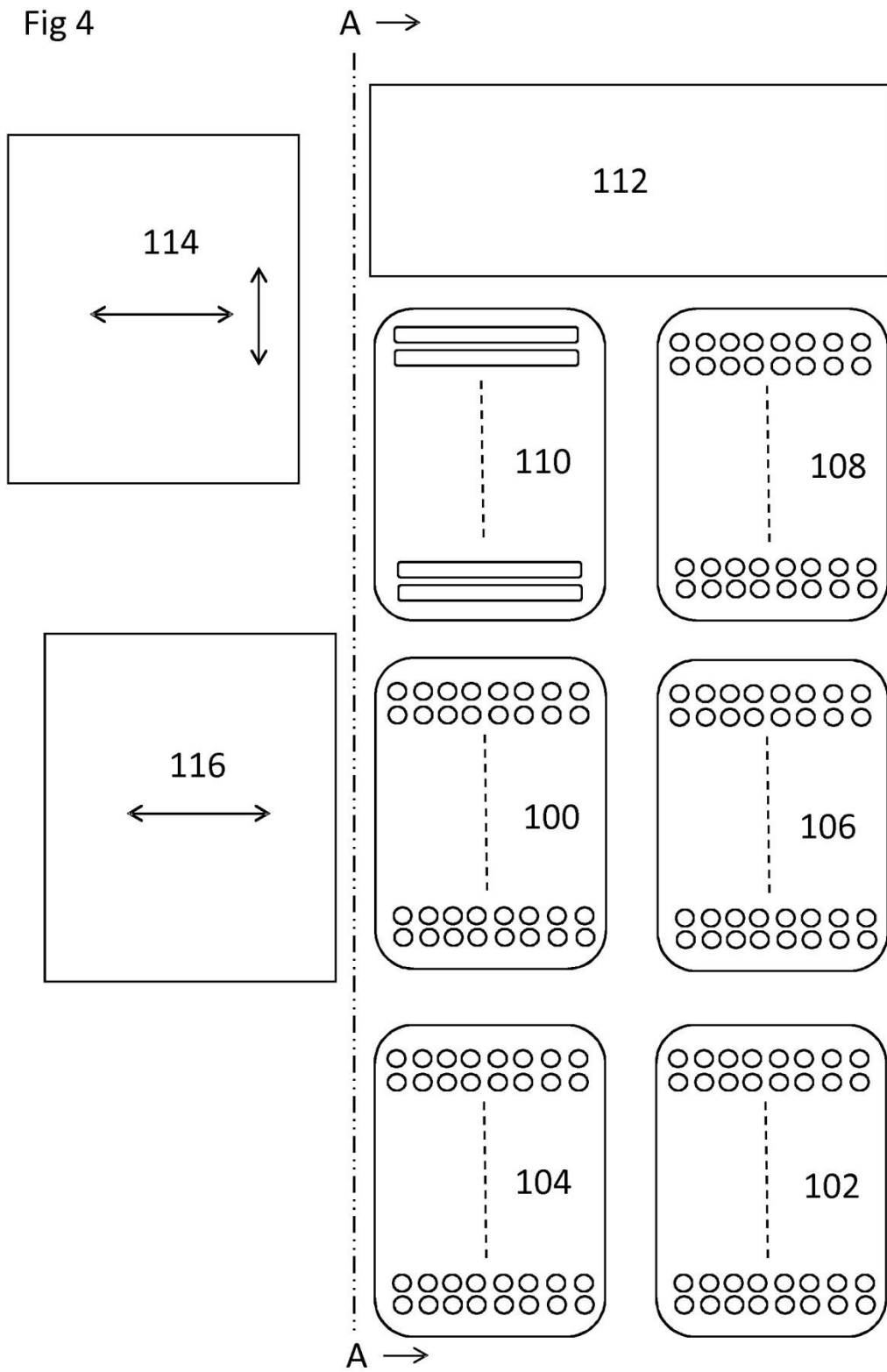


Fig 4



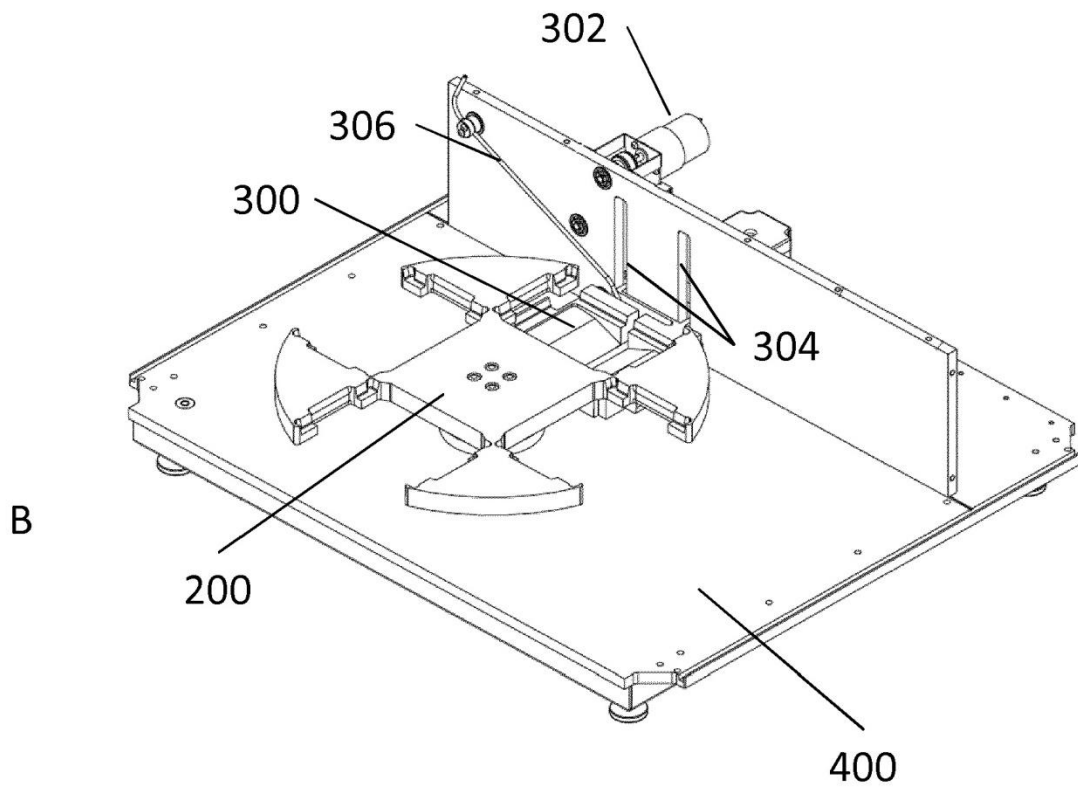
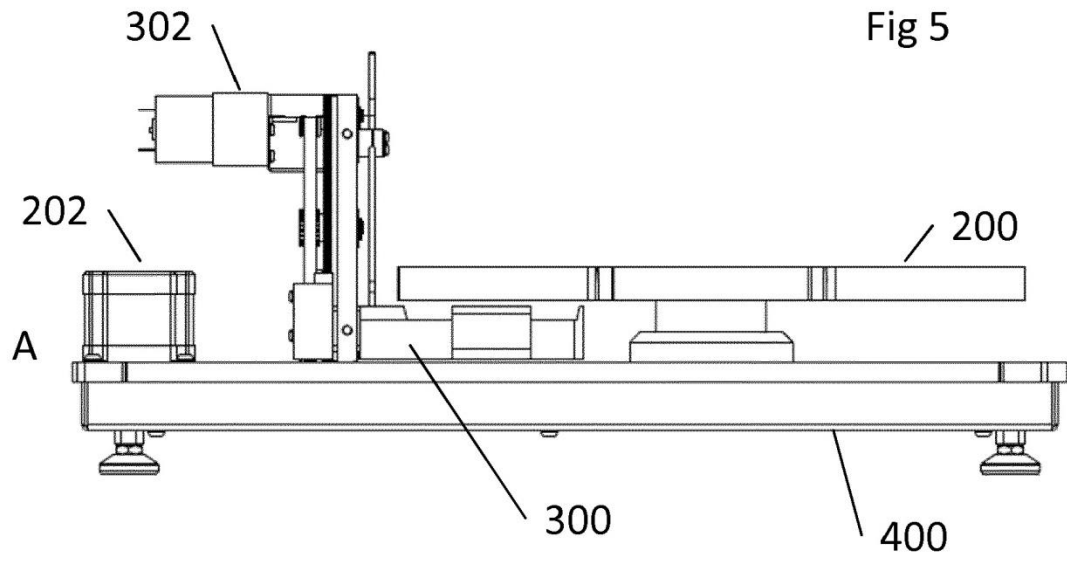
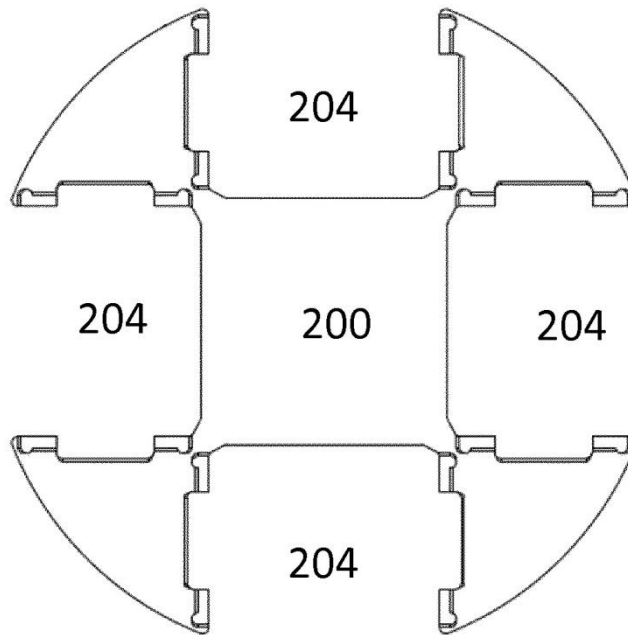


Fig 6

A



B

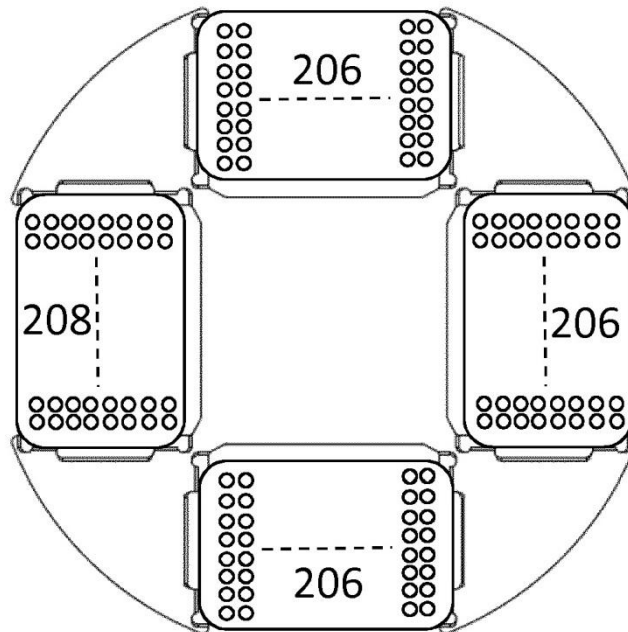


Fig 7A

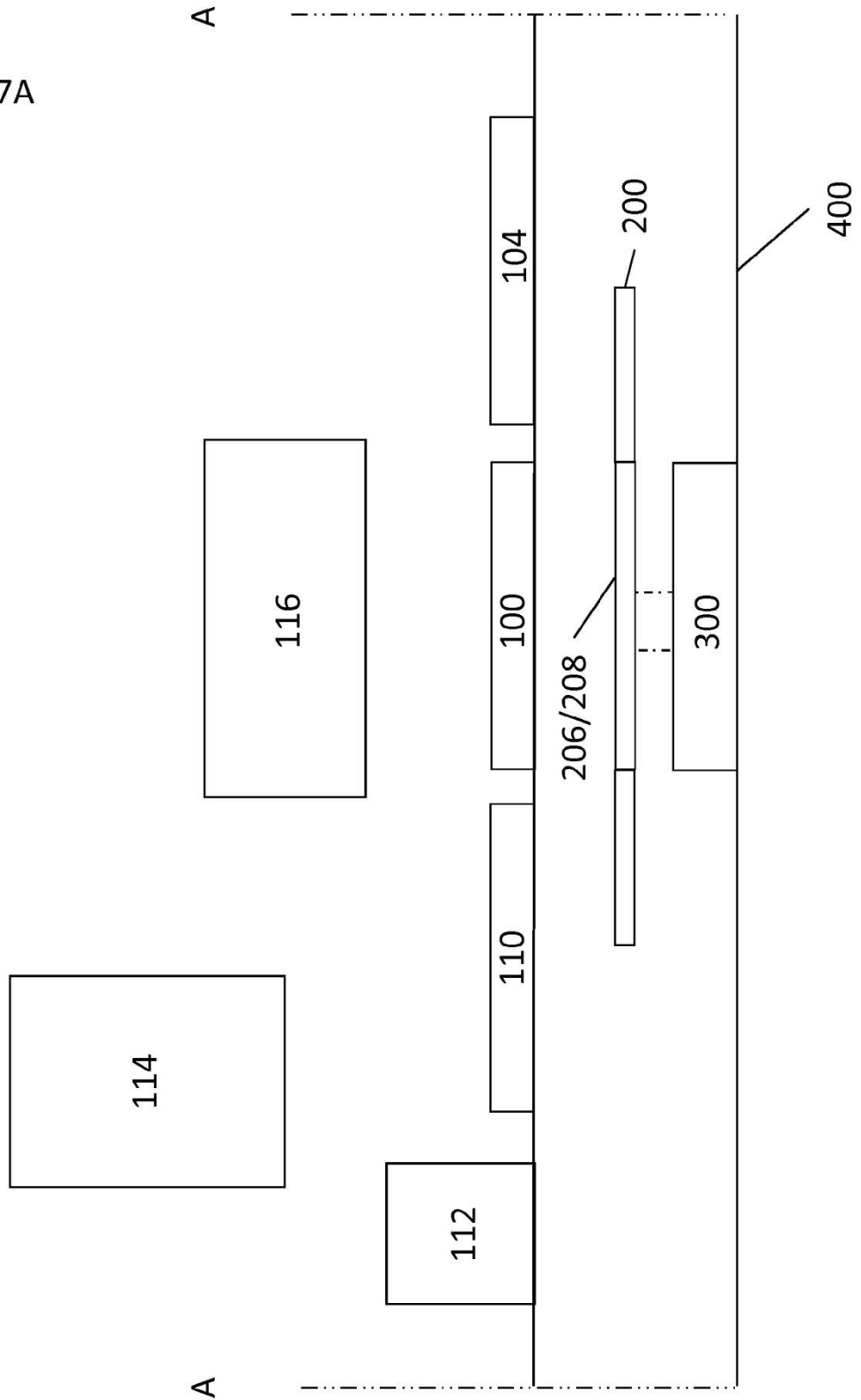


Fig 7B

