



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00379**

(22) Data de depozit: **22.05.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.05.2014** BOPI nr. 5/2014

(41) Data publicării cererii:  
**30.03.2009** BOPI nr. 3/2009

(73) Titular:  
• **INSTITUTUL DE BIOCHIMIE,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **PETRESCU ȘTEFANA-MARIA,  
STR.POSTĂVARUL NR.5, BL.C 5, SC.7,  
ET.4, AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **VASILE GABRIELA, STR.SIBIU NR.4,  
BL.OD 2, SC.5, ET.7, AP.176, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**BRIGITTE BOUCHARD ET AL.,  
"PRODUCTION AND CHARACTERIZATION  
OF ANTIBODIES AGAINST HUMAN  
TYROSINASE", THE JOURNAL OF  
INVESTIGATIVE DERMATOLOGY,  
VOL.102, NR.3, PP.291-295, MARTIE 1994;  
ȘTEFANA M.PETRESCU ET AL.,  
"THE GLYCOSYLATION OF TYROSINASE  
IN MELANOMA CELLS AND THE EFFECT  
ON ANTIGEN PRESENTATION",  
GLYCOBIOLOGY AND MEDICINE,  
PP.257-266, NEW YORK, 2003**

## (54) ANTICORPI POLICLONALI ANTI-TIROZINAZĂ UMANĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, destinați diagnosticării și tratamentului cancerului de piele. Anticorpii policlonali conform invenției prezintă specificitate ridicată față de tirozinaza umană, și capacitate redusă de interacție cu alte proteine din familia tirozinazei și cu tirozinaza de la alte specii decât cea umană.

Revendicări: 5  
Figuri: 6

Seq. nr. 1  
1 ATCTCTGAG TGTGCTGG AAGGGAAT CTGCTGCTT AATTGGGAG  
TTCTGGAG  
41 CCGCGGAGG AAGAGGGA GATGAGGAT GGGGCTGG TACTGGGCT  
CTGGAGGCT  
121 CCGAGCCCT GCGGGCAT TCGTGGAG CTGCTGCTT CCGAGGCT  
TGGAGGGA  
181 GGTATGCTT CCGCGGGA GGGGGAAG GAGCTCTG GGGAGGCT  
GGGCGAGG  
241 TCTGTGAG GATGCTCT TGTCTGAT ACCCTGGG GCGGATTC  
CCTCCAGG  
301 GGTGGTGG GGGGAGGG GGTCTCGG CTTCTAAT GGGGCTGG  
AGGCTCTG  
361 CATTCTG GATGAGG GGGGGAAG CAGTTGG GATGGGGG  
GAGGCTGG  
421 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
481 AGCTCTGG TCGCTCTG TGGAGGCT TACTGAG CAGGCTGG  
CGAGGAGG  
541 GGGGCTCT GGGGAGG GAGGCTCT TACTGAG CAGGCTGG  
CGAGGAGG  
601 TGGGCTCT GGGGAGG GAGGCTCT TACTGAG CAGGCTGG  
CGAGGAGG  
661 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
721 CTCTCTGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
781 TGTGGTGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
841 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
901 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
961 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
1021 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
1081 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
1141 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG  
1201 GGTGGAGG GGTGGTGG GAGGAGCT CTGGGATG AGTGGCGG  
AGAGGAGG

Seq. nr. 2  
10 20 30 40 50 60  
ATLAVYQL WPTGDAAP FRACVSAAG MEKSCGPPG CEGAPGQGL GRSQCSTL  
70 80 90 100 110 120  
ENAVLWQFP PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG  
130 140 150 160 170 180  
ENFVGLGAP MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG  
190 200 210 220 230 240  
YPTGDAAP PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG  
250 260 270 280 290 300  
AKVCTCTG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG  
310 320 330 340 350 360  
PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG PPTGCGGAG  
370 380 390 400 410 420  
SHVAVLAV MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG MEKSCGPPG

Fig. 1

Examinator: biochimist CREȚU ADINA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 123600 B1

1 Inventția se referă la anticorpi policlonali față de tirozinaza umană, destinați diagnosticării și tratamentului cancerului de piele, în special a melanomului malign.

3 Melanomul este una dintre cele mai agresive forme de cancer care se dezvoltă la nivelul pielii. Este o tumoră malignă a melanocitelor, celule ce derivă din crestele neurale. 5 Cu toate că majoritatea melanoamelor primare iau naștere la nivelul pielii, ele se pot găsi și la suprafața mucoaselor sau a altor locuri la nivelul cărora migrează celule neuronale.

7 Melanomul este o tumoră activă din punct de vedere metabolic, ce exprimă și secretă în circulație enzime, citochine și alte molecule. Cele mai studiate molecule imunoreglatoare 9 sunt două antigene de diferențiere a melanocitelor: tirozinaza și antigenul de melanom recunoscut de celulele T, MART-1/melan-A. Tirozinaza este o enzimă implicată în sinteza 11 melaninei atât în celulele de melanom, cât și în melanocite, reprezentând una dintre țintele principale ale anticorpilor găsiți în serul pacienților cu vitiligo și/sau melanom. Este o 13 glicoproteină înalt glicozilată și o metaloenzimă, enzimă ce conține cupru în centrul activ.

15 Anticorpicii policlonali produși de celulele B, ca reacție la pătrunderea unui antigen în organism, declanșează activarea sistemului-imun, fiind utilizați în terapiile anti-tumorale, în vederea eliminării tumorii prin intermediul sistemului imun. Datorită specificității ridicate față 17 de epitopi aparținând antigenului, anticorpicii sunt folosiți într-o gamă foarte largă de tehnici biochimice ca reactivi de diagnostic. În particular, anticorpicii sunt folosiți și în imunohisto- 19 chimie, tehnică ce permite vizualizarea proteinelor sau a altor antigene la nivel tisular sau celular.

21 Problema pe care o rezolvă invenția de față este obținerea unui produs cu proprietatea de a reacționa ca anticorp cu antigene de tipul tirozinazei umane.

23 Anticorpicii conform invenției au specificitate față de regiunea truncată solubilă a tirozinazei umane. Acești anticorpi pot fi utilizați pentru diagnosticul cancerului de piele, în 25 special a melanomului malign, pentru terapia melanomului malign și pentru identificarea tirozinazei umane.

27 Avantajele aplicării acestei invenții sunt următoarele:

29 - anticorpicii descriși în invenție recunosc tirozinaza umană "wild type" (WT), cât și mutante truncate, întrucât sunt specifici față de regiunea truncată solubilă a tirozinazei;

31 - anticorpicii descriși în invenție au specificitate înaltă față de tirozinaza umană din celule de melanom sau melanocite, și pot fi folosiți în diagnosticul melanomului în imunohistochimie;

33 - injectarea proteinei recombinante, rezultată într-o etapă intermediară a procedurii de obținere a anticorpilor, la pacienți cu melanom, poate fi folosită ca vaccin anti-melanom.

35 Anticorpicii conform invenției pot fi obținuți folosind ca imunogen tirozinaza truncată la aminoacidul 402, moleculă care conține epitopii necesari recunoașterii tirozinazei umane. Acest antigen se poate obține folosind tirozinaza recombinantă exprimată la bacterii. Pentru 37 obținerea anticorpilor policlonali se pot folosi procedee convenționale care implică imunizarea animalelor cu tirozinaza recombinantă, și recuperarea anticorpilor din ser al animalelor 39 imunizate.

41 Anticorpicii descriși în această invenție pot fi folosiți pentru detectarea tirozinazei din țesuturi, celule sau extracte celulare, ca reactivi de analiză, în scopul diagnosticării prezenței acestei proteine în diferite cancere de piele. În urma analizării rezultatelor, s-a constatat o 43 specificitate ridicată a anticorpilor policlonali obținuți față de tirozinază. Pentru validarea specificității anticorpilor, aceștia au fost testați prin comparație cu anticorpicii T311. Rezultatele 45 au scos în evidență o specificitate crescută a anticorpilor policlonali față de tirozinază. Acești anticorpi policlonali pot fi folosiți pentru evidențierea tirozinazei în diferite tehnici biochimice 47 (Western blotting, imunoprecipitare) și în imunohistochimie, cu rezultate superioare anticorpilor monoclonali T311.

# RO 123600 B1

Anticorpul conform invenției au următoarele proprietăți:	1
- specificitate înaltă pentru tirozinaza umană exprimată constitutiv de celule melanotice sau supraexprimată în celule de melanom;	3
- capacitate redusă sau absentă de interacțiune cu tirozinaza de la alte specii decât cea umană;	5
- capacitate redusă sau absentă de interacțiune cu celelalte proteine din familia tirozinazei TRP1 și TRP2 de la om.	7
Se dau, în continuare, cinci exemple de realizare a invenției, în legătură și cu fig. 1...6, ce reprezintă:	9
- fig. 1, secvența de nucleotide (secv. nr. 1) și aminoacizi (secv. nr. 2) a tirozinazei TYR 402;	11
- fig. 2, secvența primerilor folosiți pentru clonarea TYR 402;	
- fig. 3, etapele de purificare a polipeptidului; electroforeza SDS-PAGE a extractului proteic obținut în urma etapelor de purificare: 1. lizat celular indus cu IPTG; 2. lizat celular neindus cu IPTG; 3,4. supernatant de la separarea corpiilor de incluziune; 5. lizat indus din corpiii de incluziune nesolubilizați (după spălare); 6. lizat neindus din corpiii de incluziune nesolubilizați (după spălare); 7. sni din corpiii de incluziune nesolubilizați (după spălare); 8. sn ni din corpiii de incluziune nesolubilizați (după spălare); 9,10. corpi de incluziune solubilizați ept sol-10. ept sol cu sds; 11. corpi de incluziune solubilizați-neindus; 12. supernatant corpi de incluziune-indus; 13. supernatant corpi incluziune-neindus. Proteinele separate prin SDS-PAGE au fost colorate cu Coomassie blue;	13
- fig. 4, caracterizarea purității preparatului; analiza prin SDS-PAGE și colorare cu Coomassie blue a proteinei solubilizate din corpiii de incluziune (2) și a proteinei rezultate din ultima etapă de purificare (1);	15
- fig. 5, utilizarea anticorpilor pentru identificarea tirozinazei prin Western Blotting; celule umane HEK (human embryonic kidney) au fost transfectate tranzient atât cu tirozinaza WT (1, 3, 6), cât și cu tirozinaza truncată TYR 402 (2, 4, 7). Proteinele au fost apoi transferate pe o membrană de nitroceluloză, și au fost detectate utilizând atât anticorpul T311 (1, 2), cât și cei descriși în invenție (3 - 8) diluați 1:500 (3, 4, 5) și 1:250 (6, 7, 8). 5, 8 - lizate de celule netransfectate;	17
- fig. 6, utilizarea anticorpilor pentru imunoprecipitarea tirozinazei; celule HEK, transfectate tranzient cu tirozinaza WT, au fost marcate cu <sup>35</sup> S, pentru 30 min, imunoprecipitate cu anticorpul descriși și analizate prin SDS-PAGE și autoradiografie în condiții reducătoare (2, 4) și nereducătoare (1, 3).	19
<b>Exemplul 1. Clonarea tirozinazei recombinante</b>	21
cDNA-ul proteinei de interes (TYR 402, fig. 1, secv. nr. 1) a fost clonat într-un vector de expresie pentru bacterii prin reacția PCR (polymerase chain reaction), folosind primeri specifici (fig. 2). În acest scop s-a folosit vectorul pHAT2, ce conține promotor pentru expresia proteinei în bacterii. Tulpina bacteriană folosită a fost BL21-DE3 Ril. În urma reacției PCR, fragmentul de interes (TYR 402) a fost clonat în vectorul pGEM, folosind kitul pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). Acest kit reprezintă un sistem convenabil de donare a produșilor obținuți în urma reacției PCR, datorită faptului că vectorul liniar conține, la ambele capete, resturi de timidină. Polimeraza folosită în reacția PCR (Taq polimeraza) adaugă deoxiadenozină la capetele fragmentului amplificat. Datorită legăturilor de hidrogen formate între nucleotidele complementare (timina de la nivelul vectorului și adenina de la nivelul insertului), insertul poate fi integrat în vectorul de clonare pGEM. Următoare etapă a fost	23
	25
	27
	29
	31
	33
	35
	37
	39
	41
	43
	45

# RO 123600 B1

1 preluarea insertului (TYR 402) din vectorul pGEM, și introducerea în vectorul de expresie  
pHAT2, folosind enzimele de restricție NcoI și EcoRI. Siturile de restricție ale acestor  
3 enzime au fost adăugate în secvența de oligonucleotide (primeri) prezentată mai sus. În  
urma reacției de restricție a vectorului pGEM recombinant, au rezultat două fragmente,  
5 primul reprezentând vectorul, și cel de-al doilea fragment reprezentând insertul. Pentru  
introducerea insertului în vectorul pHAT2, acesta a fost supus digestiei enzimatică cu  
7 enzimele NcoI și EcoRI. Reacția de restricție a avut loc la 37°C, timp de 16 h. Ultima etapă  
a constat în reacția de ligare realizată între insertul obținut în urma restricției vectorului  
9 pGEM și vectorul pHAT2 digerat.

## **Exemplul 2. Obținerea proteinei recombinante**

11 DNA-ul recombinant a fost introdus în tulpina bacteriană BL21(DE3)Ril pentru  
exprimarea tirozinazei, iar expresia proteinei a fost indusă prin adăugarea de iso- $\beta$ -*d*-  
13 tiogalactopiranozidă (IPTG), urmată de incubarea suspensiei bacteriene 4 h, la 37°C.  
Celulele au fost centrifugate și peletul a fost supus unor etape de sonicare și solubilizare.  
15 După sonicare se adaugă 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pentru chelatarea EDTA, DN-ază (0,01 mg/ml) și  
lizozim aproximativ 0,1 mg/ml, și se incubează la temperatura camerei, pentru 20 min. Se  
17 centrifughează corpii de incluziune (6000 rpm, pentru 15 min). S-a dispersat peletul cu o  
spatulă, și apoi s-a resuspendat prin sonicare în tamponul de liză. Se adaugă DN-ază și  
19 lizozim pentru a crește puritatea peletului. Corpii de incluziune se spală cu tamponul de liză  
fără Triton-X100. Peletul se resuspendă prin sonicare. Tamponul final de spălare conține:  
21 50 mM Tris-HCl, pH=8,0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% NaN<sub>3</sub>. Se colectează peletul ce  
conține corpii de incluziune, și se solubilizează în 1% SDS (fig. 3). Pentru injectare, se poate  
23 folosi atât proteina solubilizată din corpii de incluziune, cât și proteina purificată printr-o  
metodă cromatografică. Expresia proteinei a fost evidențiată prin colorarea gelului cu  
25 Comassie-Blue (fig. 4).

## **Exemplul 3. Obținerea anticorpilor anti-tirozinază TYR 402**

27 În urma etapei de purificare s-a obținut 1...5  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteină care a fost injectată la  
iepuri. Amestecul de injecție a fost format din adjuvant Freud complet (2,5 ml), ser fiziologic  
29 (2 ml) și TYR 402 (500  $\mu$ l). S-au realizat 4...8 injecții (1 ml amestec) la intervale de 2...3  
săptămâni, iar după fiecare injecție a fost recoltată o cantitate mică de sânge, pentru  
31 testarea titrului de anticorpi. Această testare calitativă a fost făcută prin metoda Ouchterlony.  
Această metodă constă în incubarea antigenului (TYR 402) cu serul colectat de la iepuri.  
33 Incubarea se realizează pe lame pe care în prealabil a fost turnat un gel de agaroză. După  
solidificare, se decupează sub formă de rozetă (un godeu central și mai multe periferice). În  
35 godeul central se depune antigenul (TYR 402), iar în cele periferice, serul colectat ce conține  
anticorpii anti-TYR. După incubare, antigenele, respectiv, anticorpii difuzează în gel,  
37 formându-se linii de precipitat. După obținerea unui titru constant de anticorpi, iepurii au fost  
exsangvinizați, iar serul obținut a fost alicotat și testat prin western blot și pulse chase, prin  
39 comparație cu anticorpii comerciali existenți T311.

## **Exemplul 4. Utilizarea anticorpilor pentru identificarea tirozinazei prin Western Blotting**

41 Pentru testarea specificității se folosește un experiment Western Blotting, în care se  
identifică tirozinaza WT și forma truncată, transfectate tranzient în celule HEK. Lizatele  
43 celulare au fost separate prin SDS-PAGE, și probate cu anticorpii descriși în invenție. După  
cum se poate vedea în fig. 5, anticorpii produși prezintă o specificitate ridicată atât față de  
45 proteina WT, cât și față de cea truncată, specificitate identică celei a anticorpilor monoclonali  
cunoscuți T311.  
47

# RO 123600 B1

<b>Exemplul 5. Utilizarea anticorpilor pentru imunoprecipitarea tirozinazei din celule</b>	1
Tehnica de marcare metabolică este utilizată pentru studierea biosintezei, procesării, transportului intracelular, secreției, degradării și proprietăților fizico-chimice ale proteinelor.	3
O etapă foarte importantă în cadrul aceste tehnici este cea de imunoprecipitare. Această etapă constă în precipitarea antigenului dintr-o anumită soluție (în cazul nostru, este vorba despre lizat celular transfectat tranzient cu tirozina WT), prin intermediul anticorpilor specifici față de acel antigen. După cum se observă în fig. 6, anticorpilor policlonali sunt specifici pentru proteina WT, putând fi folosiți în experimente de imunoprecipitare în condiții reducătoare.	5
	7

# RO 123600 B1

## Revendicări

1

3

1. Anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, **caracterizați prin aceea că** au specificitate față de regiunea truncată solubilă a tirozinazei umane cu secvența de aminoacizi din fig. 1, secv. nr. 2.

5

7

2. Anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** se utilizează pentru diagnosticul cancerului de piele.

9

3. Anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** se utilizează pentru diagnosticul melanomului malign.

11

4. Anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** se utilizează pentru identificarea tirozinazei umane.

13

5. Anticorpi policlonali anti-tirozinază umană, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** se utilizează pentru terapia melanomului malign.

# RO 123600 B1

(51) Int.Cl.  
A61K 39/395 (2006.01)

```
secv. nr. 1
1 atcactgtag tagtagctgg aaagagaaat ctgtgactcc aattagccag
ttcctgcaga
61 ccttgtgagg actagaggaa gaatgctcct ggctgttttg tactgcctgc
tgtggagttt
121 ccagacctcc gctggccatt tccctagagc ctgtgtctcc tctaagaacc
tgatggagaa
181 ggaatgctgt ccaccgtgga ggggggacag gagtccctgt ggccagcttt
caggcagagg
241 ttctgtcag aatatacttc tgtccaatgc accacttggg cctcaatttc
ccttcacagg
301 ggtggatgac cgggagtcgt ggccttccgt cttttataat aggacctgcc
agtgtctctgg
361 caacttcatt ggattcaact gtggaaactg caagtttggc ttttggggac
caaactgcac
421 agagagacga ctcttgggta gaagaaacat cttcgatttg agtgccccag
agaaggacaa
481 attttttgcc tacctcactt tagcaaagca taccatcagc tcagactatg
tcatacccat
541 agggacctat ggccaaatga aaaatggatc aacacccatg tttaacgaca
tcaatattta
601 tgacctcttt gtctggatgc attattatgt gtcaatggat gcaactgctg
ggggatctga
661 aatctggaga gacattgatt ttgccatga agcaccagct tttctgcctt
ggcatagact
721 cttcttgttg cggtggaac aagaaatcca gaagctgaca ggagatgaaa
acttcactat
781 tccatattgg gactggcggg atgcagaaaa gtgtgacatt tgcacagatg
agtacatggg
841 aggtcagcac ccacaaatc ctaacttact cagcccagca tcattcttct
cctcttggca
901 gattgtctgt agccgattgg aggagtacaa cagccatcag tctttatgca
atggaacgcc
961 cgagggacct ttacggcgta atcctggaaa ccatgacaaa tccagaaccc
caaggctccc
1021 ctcttcagct gatgtagaat tttgcctgag tttgacccaa tatgaatctg
gttccatgga
1081 taaagctgcc aatttcagct ttagaaatac actggaagga tttgctagtc
cacttactgg
1141 gatagcggat gcctctcaaa gcagcatgca caatgccttg cacatctata
tgaatggaac
1201 aatgta taa
secv. nr. 2
10 20 30 40 50 60
MLLAVLYCLL WSFQTSAGHF PRACVSSKNL MEKECCPPWS GDRSPCGQLS GRGSCQNILL
70 80 90 100 110 120
SNAPLGPQFP FTGVDDRESW PSVFYNRTCQ CSGNFMGFNC GNCKFGFWGP NCTERRLLVR
130 140 150 160 170 180
RNIFDLSAPE KDKFFAYLTL AKHTISSDYV IPIGTYGQMK NGSTPMFNDI NIYDLFVWMH
190 200 210 220 230 240
YYVSM DALLG GSEIWRDIDF AHEAPAFLPW HRLFLLRWEQ EIQLTGDEN FTIPYDWRD
250 260 270 280 290 300
AEKCDICTDE YMGGOHPTNP NLLSPASFFS SWQIVCSRLE BYNSHQSLCN GTPEGPLERN
310 320 330 340 350 360
PGNHDKSRTP RLPSSADVEF CLSLTQYESG SMDKAANFSF RNTLEGFASP LTGIADASQS
370 380 390 402
SMHNALHIYM NGTMSQVQGS ANDPIFLLHH AFVDSIFEQW LR
```

Fig. 1

Primer 1. FW: 5'*GAATTCGAGCTCCATTTCCCTAGAGCCTG3'*

Primer 2. RW: 5'*CTCGAGTTAACGGTGCCTTTGGAGCC3'*

Fig. 2

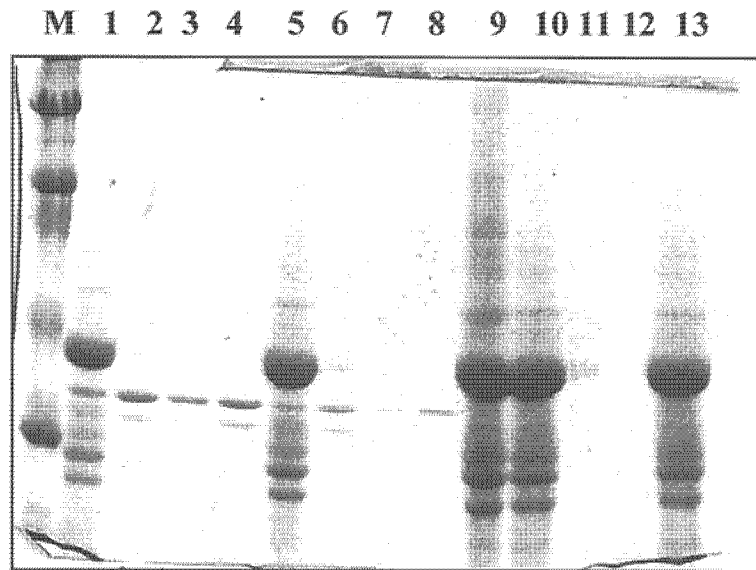


Fig. 3

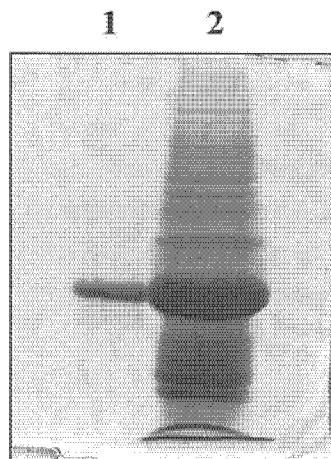


Fig. 4



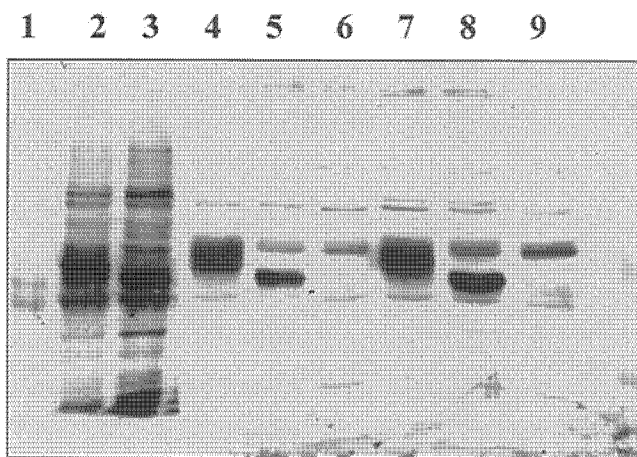


Fig. 5

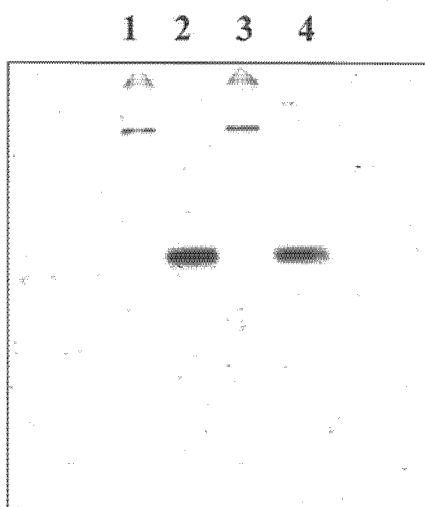


Fig. 6

