

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234534**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420057**

(22) Data zgłoszenia: **30.12.2016**

(51) Int. Cl.

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania kompozytowych implantów kostnych, sposób wytwarzania granulatu na kompozytowe implanty kostne i kompozytowy implant kostny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.07.2018 BUP 14/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT WYSOKICH CIŚNIEŃ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WITOLD ŁOJKOWSKI, Warszawa, PL
TADEUSZ CHUDOBA, Warszawa, PL
ELŻBIETA PIETRZYKOWSKA, Łochów, PL
ROMAN MUKHOVSKYI, Novyi Rozdil, UA
SYLWIA DĄBROWSKA, Kulesze Kościelne, PL
AGNIESZKA CHODARA, Janów Lubelski, PL
JANIS LOCS, Jaunolaine, LV
JACEK KROPIWNICKI, Białystok, PL
MICHAŁ CHARKIEWICZ,
Juchnowiec Kościelny, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Adamczyk

PL 234534 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kompozytowych implantów kostnych zawierających syntetyczny hydroksyapatyt, sposób wytwarzania granulatu na kompozytowe implanty kostne tego typu oraz kompozytowy implant kostny zawierający syntetyczny hydroksyapatyt.

Implant kostny składający się w całości z syntetycznego hydroksyapatytu ma dużą biokompatybilność i bioaktywność, ale jednocześnie ma niską udurowalność oraz zbyt wysoki moduł Younga. Dlatego do wytwarzania takich implantów często stosuje się kompozyt, składający się z krystalicznego hydroksyapatytu i polimeru, na przykład bioresorbowalnego polilaktydu (PLA).

Optymalny materiał na implant kostny powinien być biokompatybilny (czyli bezpieczny dla organizmu), posiadać właściwości osteokondukcyjne, osteoindukcyjne i osteogenne, odpowiednią wytrzymałość biomechaniczną, być biodegradowalny, prosty do wypreparowania i implantacji oraz nadawać się do sterylizacji. Za złoty standard w leczeniu ubytków kości uznawany jest autologiczny przeszczep kości. Materiał do tego celu pobiera się z różnych miejsc ciała pacjenta, a przeszczepiany fragment kości posiada wszystkie właściwości potrzebne do gojenia kości uszkodzonej. Nie jest to jednak idealny sposób leczenia tkanki kostnej. Do czynników limitujących należą m.in. ograniczona ilość tkanki, którą można pobrać, uogólniony proces chorobowy pacjenta, anatomiczne ograniczenia operacyjne oraz nadmierna resorpcja kości podczas gojenia. Stosuje się również przeszczepy allogeniczne (od innego pacjenta) lub ksenogeniczne (pochodzący od innego gatunku). Kolejnym sposobem na regenerację kości jest zastosowanie materiałów syntetycznych (alloplastycznych). W ostatnich latach prowadzono badania właściwości biologicznych, chemicznych i fizycznych syntetycznych materiałów do regeneracji tkanki kostnej. Badano także wpływ właściwości mechanicznych i mikrostruktury na proces regeneracji tkanki kostnej. Obecnie najpowszechniej stosuje się materiały metalowe, ceramiczne, polimerowe.

Przykład kompozytowego implantu z hydroksyapatytu i PLA ujawniony w publikacji J. Russias i wsp. pt. „Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation” (Materials Science and Engineering: C, Vol. 26, 2006, str. 1289–1295). Kompozyt ten otrzymano metodą chemiczną, poprzez rozpuszczenie polilaktydu w chlorku metylenu oraz dodaniu do niego mikrometrycznych cząsteczek ceramicznych hydroksyapatytu, które poddano procesowi kalcynacji w temperaturze 1100°C przez jedną godzinę. Po wymieszaniu tych komponentów uzyskano masę, z której odlano w teflonowym pojemniku kształtki. Kształtki te suszono w temp. pokojowej przez 24 godziny w celu pozbycia się rozpuszczalnika, a następnie poddano je prasowaniu osiowemu przez 15 minut, pod ciśnieniem 45 MPa i w temperaturze do 220°C. Uzyskano tą drogą kompozyty zawierające od 50 do 90% cząstek ceramicznych i wytrzymałości na zginanie od 65 do 125 MPa.

Także publikacja Sandrine Gay i wsp. pt. „Preparation and characterization of dense nanohydroxyapatite/PLLA composites” (Materials Science and Engineering: C, Volume 29, Issue 1, 1 January 2009, str. 172–177) ujawnia otrzymywanie kompozytów z hydroksyapatytem (HAP) metodą chemiczną. Jako rozpuszczalnik polimeru użyto chloroformu, a drugim składnikiem był HAP o wielkości cząstek 100 nm. Rozpuszczony polimer z cząstkami HAP został odlany do postaci cienkiej warstwy, którą po cięciu na małe kawałki i umieszczeniu w formie do prasowania osiowego. Prasowanie odbyło się w temp. 160°C i pod ciśnieniem 300 MPa. Badano wpływ udziału HAP na właściwości mechaniczne kompozytu. Wraz ze wzrostem ilości hydroksyapatytu wzrastała wytrzymałość na ściskanie materiału i moduł Younga, ale rosła też jego kruchość, w porównaniu do czystej ceramiki. Przy 50% zawartości HAP w kompozycie uzyskano wytrzymałość na ściskanie 100 MPa i moduł Younga 6 GPa.

Wytwarzanie implantów poprzez rozpuszczenie biodegradowalnych polimerów w rozpuszczalniku, np. w acetonie lub octanie etylu, wymieszanie z cząsteczkami ceramicznymi, a następnie odlanie w formie ujawniają także publikacje US 5397572 i US 5492697.

Publikacja Artoum Rakovsky i wsp. pt. „Strong bioresorbable Ca phosphate-PLA nanocomposites with uniform phase distribution by attrition milling and high pressure consolidation” [Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, Volume 18, February 2013, str. 37–46] ujawnia kompozyt z HAP i PLA uzyskany w wyniku mielenia składników w heksanie w atmosferze argonu. Następnie otrzymany proszek kalcynowano w temperaturze 700°C przez 24 godziny, do uzyskania fazy β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Wydłużając czas mielenia do 24 godzin uzyskano materiał o wysokiej homogeniczności, wytrzymałości na ściskanie 400 MPa oraz module Younga 10 GPa.

W publikacji WO 2015/135822 A1 ujawniono bioaktywny kompozyt o osnowie polimerowej z cząstkami fosforanu wapnia, między innymi hydroksyapatytu. Kompozyt taki może mieć postać żelu, hydrożelu lub pasty i stosowany jest jako wstrzykiwane wypełnienie. Zawiera cząstki stałe o wielkości

od 50 nm do 10 μm . Podobne rozwiązanie ujawniono w publikacji US 9333080 B2. Opisany tam kompozyt zawierający 30% polimeru biokompatybilnego i 70% ceramiki ma postać masy do wstrzyknięcia, o właściwościach mechanicznych podobnych do naturalnej kości. Wielkość cząstek składnika ceramicznego wynosi od 10 μm do 1000 μm .

Publikacje US 7875342 B2 i US 7052710 B2 ujawniają metodę otrzymywania porowatych implantów, w której w pierwszym etapie przygotowuje się porowate spieki ceramiczne. Następnie spieki te nasycą się rozpuszczonym polimerem. Otrzymywane w ten sposób implanty mają gęstość rzeczywistą materiału w zakresie od 50 do 80%, wielkość porów wynosi od 1 μm do 600 μm , przy czym średnia wielkość tych porów mieści się w zakresie od 5 μm do 400 μm .

W publikacji WO 2004/067052 A1 przedstawiono wytwarzanie bioabsorbowalnych implantów metodą wtrysku z polimeru ulegającego bioabsorpcji i aktywnego biologicznie ceramicznego wypełniacza, w tym hydroksyapatytu. Jako bioabsorbowalny polimer zastosowano polilaktyd, poliglikolid, polidiosksonon, polikaprolakton, ich kopolimery i/lub ich mieszaniny. Formowanie wtryskowe do formy metalowej wymaga podgrzania mieszaniny do temperatury ok. 200°C.

Celem wynalazku było wytworzenie implantu z bioresorbowalnych materiałów, nadających się do stosowania w ortopedii i stymulujących organizm do regeneracji tkanki kostnej.

Cel ten realizuje sposób wytwarzania implantów według wynalazku zawierający etap tworzenia mieszaniny hydroksyapatytu z polilaktydem oraz etap formowania implantu z utworzonej mieszaniny. Polega on na tym, że w etapie tworzenia mieszaniny miesza się wysuszony syntetyczny hydroksyapatyt o wielkości cząstek nie przekraczającej 50 nm z rozdrobnionym polilaktydem o wielkości drobin nie przekraczającej 0,5 mm. Udział hydroksyapatytu w mieszaninie wynosi od 60% do 90% wagowo. Następnie uzyskaną mieszaninę rozdrabnia się kriogenicznie w temperaturze nie wyższej niż -150°C i uzyskany granulát suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C. W etapie formowania implantu wysuszony granulát umieszcza się w szczelnie zamykanych elastycznych formach i poddaje prasowaniu pod ciśnieniem nie mniejszym niż 25 MPa i nie większym niż 200 MPa.

W jednym z wariantów sposobu wytwarzania implantów według wynalazku do prasowania stosuje się ciśnienie hydrostatyczne.

W kolejnym wariantcie sposobu wytwarzania implantów według wynalazku stosuje się hydroksyapatyt o zawartości wody z zakresu od 1,5% do 5% określonej metodą termogravimetryczną w temperaturze 200°C.

W kolejnym wariantcie sposobu wytwarzania implantów według wynalazku stosuje się hydroksyapatyt o stosunku molowym wapnia do fosforu z zakresu od 1,57 do 1,61.

W kolejnym wariantcie sposobu wytwarzania implantów według wynalazku rozdrabnianie kriogeniczne trwa od 4 do 12 minut.

W innym wariantcie sposobu wytwarzania implantów według wynalazku prasowanie prowadzi się w temperaturze z zakresu od 50°C do 200°C.

W jeszcze innym wariantcie sposobu wytwarzania implantów według wynalazku w etapie formowania implantu stosuje formę kauczukową i medium hydrostatyczne w postaci oleju metylosilikonowego.

Sposób wytwarzania granulátu według wynalazku polega na tym, że wysuszony syntetyczny hydroksyapatyt o wielkości cząstek nie przekraczającej 50 nm miesza się z rozdrobnionym polilaktydem o wielkości drobin nie przekraczającej 0,5 mm. Udział hydroksyapatytu w tworzonej mieszaninie wynosi od 60% do 90% wagowo. Uzyskaną mieszaninę rozdrabnia się kriogenicznie w temperaturze nie wyższej niż -150°C, po czym uzyskany granulát suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C.

Implant według wynalazku składa się z zasadniczo jednolitej mieszaniny polilaktydu z hydroksyapatytem i zawiera od 60% do 90% wagowo hydroksyapatytu. Charakteryzuje się tym, że rozmiar cząstek hydroksyapatytu nie przekracza 50 nm, a stosunek molowy wapnia do fosforu w tych cząstkach wynosi od 1,57 do 1,62. Porowatość implantu jest równomierna w całej objętości i mieści się w zakresie od 1 do 30%, przy czym rozmiar porów mieści się w zakresie od 10 μm do 250 μm .

W jednym z wariantów implantu według wynalazku średnia wielkość porów mieści się w zakresie od 13 do 43 μm , przy czym rozmiar ponad 60% porów jest większy niż 100 μm .

Wynalazek pozwala na uzyskanie implantów kostnych o mikrostrukturze stymulującej organizm do regeneracji oraz właściwościach mechanicznych zbliżonych do naturalnej kości. Składniki materiału implantu według wynalazku są bioresorbowalne, polilaktyd jest powszechnie stosowany w medycynie, a sam materiał implantu jest hydrofobowy i stymulujący organizm do odbudowy tkanki kostnej. Wynalazek umożliwia wytwarzanie implantów o skomplikowanych kształtach np. śrub kostnych.

Przykłady realizacji wynalazku zostały uwidocznione na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia obraz mikrostruktury materiału implantu z pierwszego przykładu wykonany za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (obraz SEM), fig. 2 przedstawia obraz SEM implantu z drugiego przykładu. Fig. 3 przedstawia rozkład porów w materiale implantu z drugiego przykładu, a fig. 4 i fig. 5 przedstawiają obrazy SEM mikrostruktury materiału implantu odpowiednio z przykładu trzeciego i czwartego.

Wynalazek zostanie bardziej szczegółowo przedstawiony w poniższych przykładach realizacji:

Przykład 1

W pierwszym etapie przygotowano kompozytowy granulát, z którego następnie uformowano gotowy implant. W celu uzyskania wspomnianego granulátu odważono 2,8 g syntetycznego hydroksyapatytu o rozmiarze cząstek nie większych niż 50 nm i stosunku molowym wapnia do fosforu (Ca/P) równym 1,61. Hydroksyapatyt ten osuszone, wygrzewając go w temperaturze rosnącej od 100°C do 600°C przez 3 godziny, przy czym szybkość narastania temperatury wynosiła 2°C/min. Po swobodnym schłodzeniu do temperatury otoczenia uzyskano proszek hydroksyapatytowy o zawartości wody w zakresie od 1,5 do 5% określonej metodą termogravimetryczną w temperaturze 200°C. Odważono także 1,2 g handlowego rozdrobnionego polilaktydu o gęstości 1,24 g/cm³, lepkości względnej 3,3 i wielkości drobin około 0,5 mm. Odmierzone ilości hydroksyapatytu i polilaktydu zmieszano na sucho i umieszczono w pojemniku młynka kriogenicznego typ 6775 firmy SPOEX SamplePrep. Młynek taki umożliwia uderzeniowe rozdrabnianie substancji umieszczonych, czyli przewodzącym ciepło pojemniku, zanurzonym w ciekłym azocie. W pojemniku oprócz mielonej substancji znajduje się ferromagnetyczny trzpień rozdrabniający, który przemieszczany jest wewnątrz pojemnika zmiennym polem magnetycznym. W opisanym wyżej młynku kriogenicznym wytworzono temperaturę -190°C i ustawiono częstotliwość uderzeń trzpienia rozdrabniającego na 12/s. Młynek włączano czterokrotnie na dwie minuty, przy czym między kolejnymi okresami pracy młynka zastosowano pięciominutowe przerwy na schłodzenie zawartości pojemnika do wyjściowej temperatury. Następnie otrzymany kompozytowy granulát o rozdrobnieniu do 100 µm, który suszono w próżni i w temperaturze 50°C przez 12 godzin. Odmierzono 2 gramy wysuszonego granulátu kompozytowego i umieszczono go w zamykanej szczelnie kauczukowej walcowej formie o średnicy 14 mm i objętości 2,31 cm³. Kauczukową formę umieszczono w stalowej komorze objętości 120 cm³ wypełnionej olejem metylosilikonowym i nagrzanej do temperatury 155°C. Po szczelnym zamknięciu komory wytworzono w niej ciśnienie 50 MPa i utrzymywano je przez 12 minut. Dzięki temu kompozytowy granulát w kauczukowej formie został poddany prasowaniu hydrostatycznemu i po zdjęciu ciśnienia oraz schłodzeniu do temperatury pokojowej przybrał w sposób trwały kształt formy. Otrzymano w ten sposób walcową kształtkę o wysokości 15 mm i średnicy 8 mm, zawierającą 30% wagowo polilaktydu i 70% hydroksyapatytu, o charakterystycznej strukturze mikroskopowej zarejestrowanej przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i przedstawionej na fig. 1. Wytrzymałość na ściskanie materiału uzyskanej kształtki wynosiła 110 MPa, jego porowatość wyznaczona metodą Archimidesa wynosiła 30%, a moduł Younga – 8 GPa.

Przykład 2

Analogicznie jak w pierwszym przykładzie przygotowano mieszaninę wysuszonego w ten sam sposób jak poprzednio hydroksyapatytu z rozdrobnionym polilaktydem, przy czym udział wagowy hydroksyapatytu w mieszaninie wyniósł 90%, a wielkość jego cząstek nie przekraczała 10 nm. Uzyskaną mieszaninę rozdrobniono w tym samym co poprzednio młynku kriogenicznym, przy czym młynek włączano trzykrotnie na dwie minuty, a przerwy między kolejnymi okresami pracy młynka trwały 6 minut. Następnie otrzymany kompozytowy granulát suszono w próżni i w temperaturze 100°C przez 3 godziny. Odmierzono 2 gramy wysuszonego granulátu kompozytowego i umieszczono go w takiej samej formie jak w pierwszym przykładzie i umieszczono w tej samej komorze ciśnieniowej, przy czym temperatura oleju metylosilikonowego wynosiła 165°C. Po szczelnym zamknięciu komory wytworzono w niej ciśnienie 50 MPa i utrzymywano je przez 12 minut. Otrzymano w ten sposób walcową kształtkę o wysokości 15 mm i średnicy 8 mm, zawierającą 10% wagowo polilaktydu i 90% hydroksyapatytu, o mikrostrukturze mikroskopowej przedstawionej na fig. 2 i gęstości 2,63 g/cm³. Wytrzymałość na ściskanie materiału uzyskanej kształtki wynosiła 80 MPa, a wytrzymałość na zginanie – 26 MPa. Porowatość materiału uzyskanej kształtki, wyznaczona za pomocą tomografii komputerowej wynosiła 1%, a rozkład wielkości porów przedstawiono na fig. 3.

Przykład 3

W pierwszym etapie przygotowano kompozytowy granulát, z którego następnie uformowano gotowy implant. W celu uzyskania wspomnianego granulátu odważono 3,2 g syntetycznego hydroksyapa-

tytu z przykładu pierwszego i tak samo osuszonego. Odważono także 0,8 g handlowego polilaktydu opisanego w przykładzie pierwszym. W celu uzyskania granulatu kompozytowego, tak samo jak w przykładzie pierwszym wymieszano, a następnie kriogenicznie zmielono polilaktyd z hydroksyapatytem, po czym wysuszonego produktu mielenia. Z dwóch gramów tego granulatu kompozytowego uformowano hydrostatycznie, w sposób opisany w przykładzie pierwszym, walcowy implant o wysokości 15 mm i średnicy 8 mm, zawierający 20% wagowo polilaktydu i 80% hydroksyapatytu, o gęstości $2,12 \text{ g/cm}^3$ oraz charakterystycznej mikrostrukturze zarejestrowanej przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i przedstawionej na fig. 4. Wytrzymałość na ściskanie materiału uzyskanej kształtki wynosiła 100 MPa, jego porowatość wyznaczona metodą Archimedesesa wynosiła 10%, a moduł Younga – 7 GPa.

Przykład 4

Na wstępie, z handlowego polilaktydu i hydroksyapatytu z przykładu pierwszego przygotowano granulaty kompozytowe o wielkości granułów z zakresu od $50 \text{ }\mu\text{m}$ do $500 \text{ }\mu\text{m}$, zawierający 80% wagowych tego hydroksyapatytu. Dokonano tego poprzez rozpuszczenie polilaktydu w znanym rozpuszczalniku, wymieszanie otrzymanego roztworu z hydroksyapatytem, odparowanie rozpuszczalnika i rozdrobnienie pozostałości. Dwa gramy takiego granulatu kompozytowego poddano formowaniu hydrostatycznemu w sposób opisany w przykładzie drugim, czyli w temperaturze 165°C . Otrzymano w ten sposób walcową kształtkę o wysokości 15 mm i średnicy 8 mm, zawierającą 20% wagowo polilaktydu i 80% hydroksyapatytu, o mikrostrukturze zarejestrowanej przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i przedstawionej na fig. 5. Gęstość materiału tej kształtki wynosiła $2,32 \text{ g/cm}^3$, a porowatość 2%, przy czym średni rozmiar porów nie przekraczał $50 \text{ }\mu\text{m}$. Wytrzymałość na ściskanie tego materiału wynosiła 400 MPa, a wytrzymałość na zginanie – 40 MPa.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kompozytowych implantów kostnych, zawierający etap tworzenia mieszaniny hydroksyapatytu z polilaktydem oraz etap formowania implantu z utworzonej mieszaniny, **znamienny tym**, że w etapie tworzenia mieszaniny miesza się wysuszony syntetyczny hydroksyapatyt o wielkości cząstek nie przekraczającej 50 nm z rozdrobnionym polilaktydem o wielkości drobin nie przekraczającej $0,5 \text{ mm}$, przy czym udział hydroksyapatytu w mieszaninie wynosi od 60% do 90% wagowo, po czym uzyskaną mieszaninę rozdrabnia się kriogenicznie w temperaturze nie wyższej niż -150°C i uzyskany granulaty suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C , natomiast w etapie formowania implantu wysuszony granulaty umieszcza się w szczelnie zamykanych elastycznych formach i poddaje prasowaniu pod ciśnieniem nie mniejszym niż 25 MPa i nie większym niż 200 MPa.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do prasowania stosuje się ciśnienie hydrostatyczne.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że stosuje się hydroksyapatyt o zawartości wody z zakresu od 1,5% do 5% określonej metodą termogravimetryczną w temperaturze 200°C .
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2, albo 3, **znamienny tym**, że stosuje się hydroksyapatyt o stosunku molowym wapnia do fosforu z zakresu od 1,57 do 1,61.
5. Sposób według zastrz. 1 albo 2, albo 3, **znamienny tym**, że rozdrabnianie kriogeniczne trwa od 4 do 12 minut.
6. Sposób według zastrz. 2 albo 3, albo 4, albo 5, **znamienny tym**, że prasowanie prowadzi się w temperaturze z zakresu od 50°C do 200°C .
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że w etapie formowania implantu stosuje formę kauczukową i medium hydrostatyczne w postaci oleju metylosilikonowego.
8. Sposób wytwarzania granulatu na kompozytowe implanty kostne zawierające hydroksyapatyt, **znamienny tym**, że wysuszony syntetyczny hydroksyapatyt o wielkości cząstek nie przekraczającej 50 nm miesza się z rozdrobnionym polilaktydem o wielkości drobin nie przekraczającej $0,5 \text{ mm}$, przy czym udział hydroksyapatytu w mieszaninie wynosi od 60% do 90% wagowo, po czym uzyskaną mieszaninę rozdrabnia się kriogenicznie w temperaturze nie wyższej niż -150°C i uzyskany granulaty suszy w temperaturze nie wyższej niż 100°C .
9. Kompozytowy implant kostny z zasadniczo jednolitą mieszaniną polilaktydu z hydroksyapatytem, zawierający od 60% do 90% wagowo hydroksyapatytu, **znamienny tym**, że rozmiar cząstek hydroksyapatytu nie przekracza 50 nm , a stosunek molowy wapnia do fosforu w tych

cząstkach wynosi od 1,57 do 1,62, porowatość implantu jest równomierna w całej objętości i mieści się w zakresie od 1 do 30%, przy czym rozmiar porów mieści się w zakresie od 10 μm do 250 μm .

10. Implant według zastrz. 9, **znamienny tym**, że średnia wielkość porów mieści się w zakresie od 13 do 43 μm , przy czym rozmiar ponad 60% porów jest większy niż 100 μm .

Rysunki

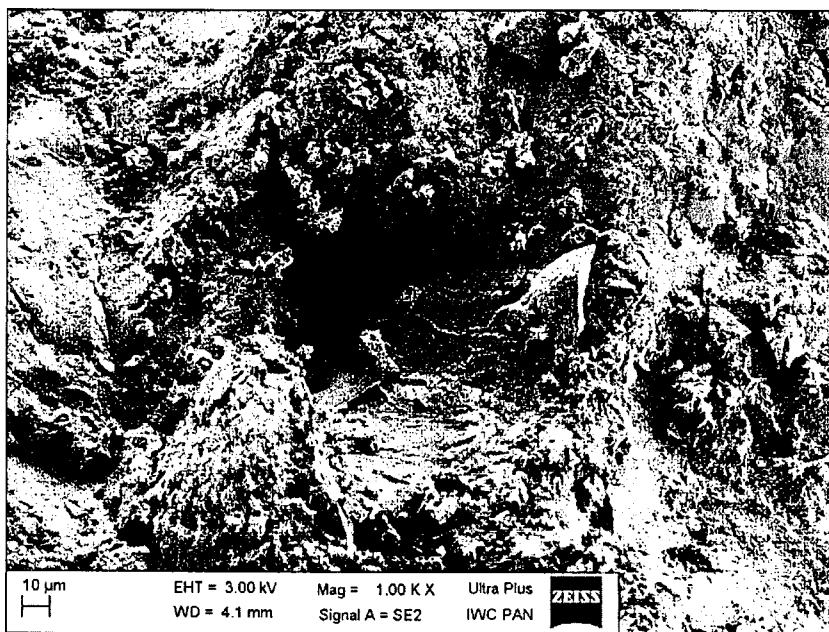


Fig.1

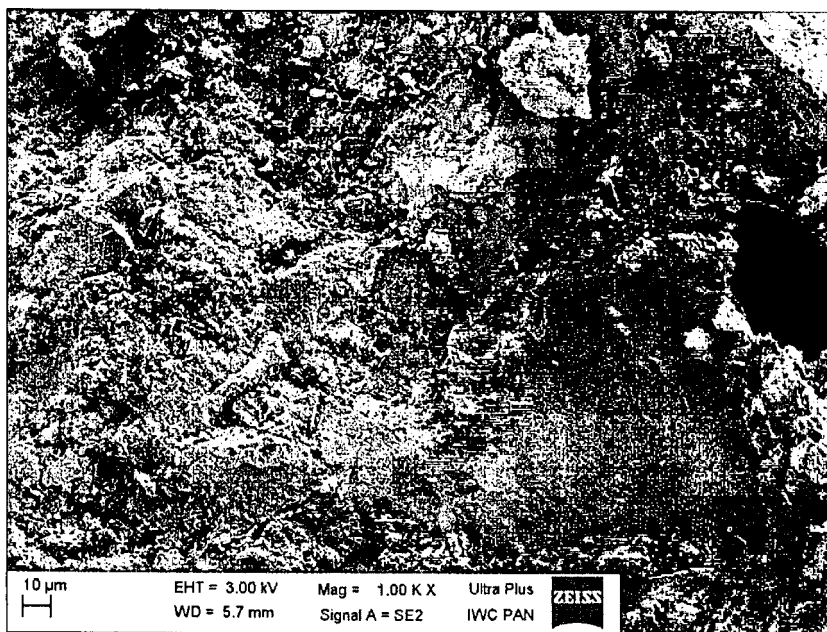


Fig.2

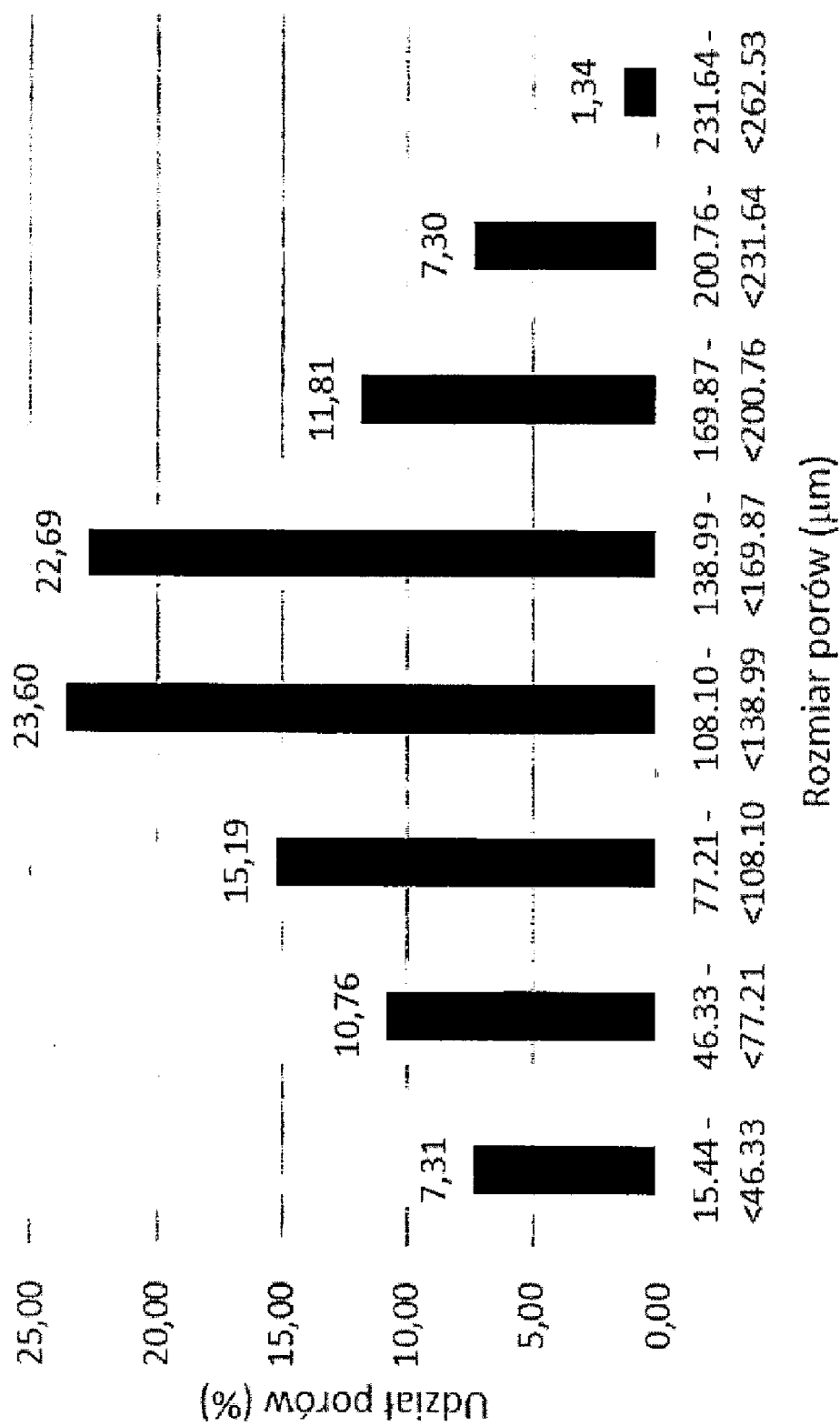


Fig.3

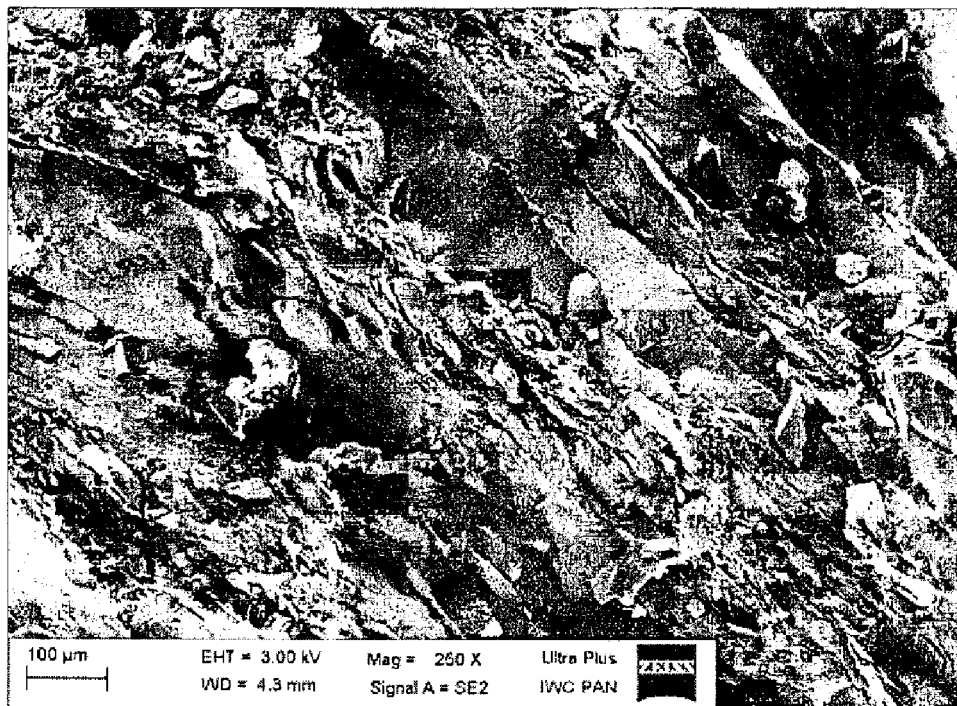


Fig.4

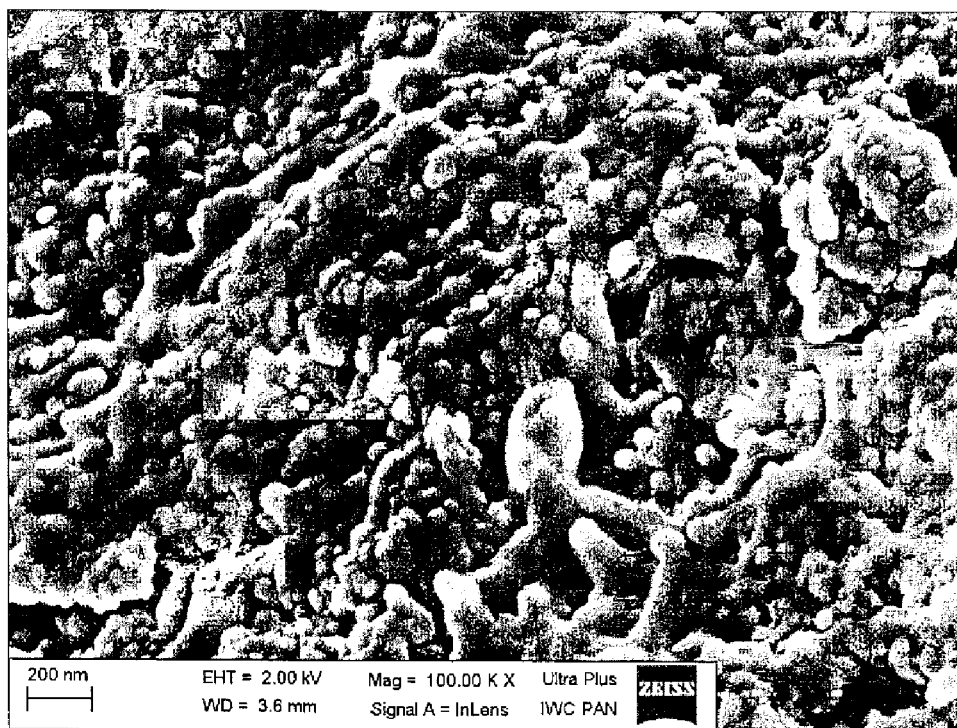


Fig.5