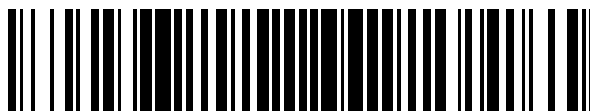


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 898**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/22** (2006.01)

**A61K 6/00** (2006.01)

**A61K 6/033** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2001 E 01954858 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1305400**

54 Título: **Citoblastos de pulpa dental de seres humanos adultos in vitro e in vivo**

30 Prioridad:

**21.07.2000 US 219989 P**

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

**25.09.2013**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)**

**The National Institute of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325  
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**SHI, SONGTAO;  
GRONTHOS, STAN y  
ROBEY, PAMELA GEHRON**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 423 898 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

Citoblastos de pulpa dental de seres humanos adultos *in vitro* e *in vivo*

5 **Antecedentes de la invención****Campo técnico**

10 [0001] La presente invención se refiere al campo de la odontología restauradora en seres humanos. De forma específica, la presente invención se refiere a una población de células que se pueden diferenciar en dentina/pulpa y a un procedimiento para regenerar la dentina/pulpa.

**Antecedentes de la técnica**

15 [0002] Durante la formación del diente, las interacciones entre células epiteliales y dentales promueven la morfogénesis de los dientes estimulando una subpoblación de células mesenquimales que se diferencian en odontoblastos, que a la vez forman la dentina primaria. Morfológicamente, los odontoblastos son células columnares polarizadas con núcleos excéntricos y prolongados procesos celulares alineados en los bordes externos de la dentina (1). Tras la salida del diente, los odontoblastos forman la dentina secundaria en respuesta a la erosión o  
20 perturbación mecánica general, y a través de la degradación de la dentina producida por bacterias (2). Se piensa que estos odontoblastos surgen de la proliferación y diferenciación de una población precursora, que reside en algún sitio en el interior del tejido de la pulpa (3). A pesar del extenso conocimiento acerca del desarrollo de los dientes y de los diversos tipos celulares asociados con la especialización de los dientes, se sabe poco acerca de las características y propiedades de sus respectivas poblaciones de células precursoras en el organismo tras el  
25 nacimiento.

[0003] La reparación de la dentina en el organismo tras el nacimiento se produce debido a la actividad de células especializadas, los odontoblastos, que se cree que se mantienen por una población precursora todavía indefinida asociada con el tejido de la pulpa (1). Hasta la fecha, nunca se ha llevado a cabo la identificación y el aislamiento de  
30 una población progenitora odontogénica a partir del tejido de la pulpa dental de adulto. Se sabe que en determinadas condiciones, los cultivos de células de la pulpa derivados del desarrollo inicial del tejido de la raíz del diente y del tejido de la pulpa pueden desarrollar una apariencia similar a la de odontoblastos con capacidad de formar nódulos mineralizados *in vitro* (4) un rasgo normalmente atribuido a los cultivos de células de la médula ósea o de los huesos (5, 6). Se sabe más acerca de las características de las células estromales multipotentes de la  
35 médula ósea (BMSC) y su potencial para desarrollarse en osteoblastos, condriocitos, adipocitos, estroma fibroso mielosoportador, y quizás incluso en tejidos musculares y neurales (7-12). Se caracterizan por su elevada capacidad hiperproliferativa *ex vivo*, manteniendo a la vez su capacidad para diferenciarse en múltiples linajes celulares estromales.

40 [0004] Puesto que la técnica anterior no proporciona la regeneración del tejido de la dentina/pulpa ni la producción de dientes en un ser humano a fines restauradores, existe una gran necesidad de encontrar un medio para producir tejido se pueda diferenciar en un diente funcional. En este estudio, se aisló una proliferación clonogénica, rápidamente proliferativa de células procedentes de pulpa dental humana. Estos citoblastos de pulpa dental (DPSC) se compararon a continuación con células estromales de la médula ósea humana (BMSC), precursores conocidos  
45 de los osteoblastos. Aunque comparten un inmunotipo similar *in vitro*, los estudios funcionales demostraron que los DPSC solo produjeron nódulos esporádicos, pero densamente calcificados, y no formaron adipocitos, mientras que los BMSC se calcificaron de forma rutinaria a través de la capa de células adherentes con agrupaciones de adipocitos cargados con lípidos. Cuando los DPSC se trasplantaron en ratones inmunocomprometidos, se generó una estructura de tipo dentina revestida con células similares a odontoblastos humanos rodeadas con tejido  
50 intersticial de tipo pulpa. En contraste, los BMSC formaron hueso lamelar que contenía osteocitos y osteoblastos que revestían la superficie, rodeando un tejido vascular fibroso con hematopoyesis activa y adipocitos. Este estudio es el primero que aísla citoblastos de la pulpa dental en un momento posterior al nacimiento que tienen la capacidad de formar un complejo de dentina/pulpa.

55 [0005] La presente invención supera las limitaciones y carencias anteriores de la técnica proporcionando citoblastos de pulpa dental de adulto humano (DPSC) que se pueden diferenciar en tejido de dentina/pulpa y un procedimiento para regenerar la dentina/pulpa y para producir un diente humano.

**Descripción resumida de la invención**

60

[0006] La presente invención proporciona un cultivo de citoblastos de pulpa dental de adulto humano.

**[0007]** La presente invención proporciona también un procedimiento para usar en la regeneración o en la producción de un tejido de dentina/pulpa, poniendo en contacto una célula procedente de un cultivo de citoblastos aislados de pulpa dental de adulto humano con hidroxapatita/fosfato tricálcico. Las células se pueden utilizar para trasplante en un mamífero.

### **Breve descripción de los dibujos**

**[0008]** Figuras 1A-1E. Eficacia formadora de colonias y proliferación celular *in vitro*. Colonias representativas de alta (A) y baja (B) densidad tras 14 días. La morfología es típica de células de tipo fibroblasto (C). La incidencia de células formadoras de colonias procedentes de tejido de pulpa dental y de médula ósea en diversas densidades de plaquéo indica que existen más células clonogénicas en la pulpa dental que en la médula ósea (D). El número de células BrdU positivas se expresó como un porcentaje del número total de células contadas como DPSC y BMSC (E). Se determinó la significancia estadística (\*) utilizando el test de la t de student ( $p \geq 0,05$ )

Figuras 2A-2L. Inmunofenotipo de DPSC cultivados. Se llevaron a cabo estudios basados en la reactividad de la inmunoperoxidasa en cultivos de DPSC de primer pase. Se muestran modelos de tinción representativos de: integrina  $\beta 1$ , (A); CD44, (B), colágeno tipo I, (C) colágeno tipo III, (D) FGF-2 (E); osteonectina, (F); osteocalcina, (G), MUC-18, (H);  $\alpha$ -actina del músculo liso, (I), osteopontina, (J); VCAM-1, (K). Se muestra la actividad endógena de la fosfatasa alcalina en (L).

Figuras 3A-3D. Potencial desarrollo *in vitro*. Se muestran las capas adherentes de DPSC cultivados (A y B), y BMSC (C y D), con colorante rojo de alizarina como una medida de la acumulación del calcio tras 6 semanas de inducción con L-ascorbato-2-fosfato y dexametasona con fosfato inorgánico (A y C). Tras 6 semanas en el mismo medio pero sin fosfato inorgánico, se señaló la acumulación de lípidos en BMSC (D), pero no en DPSC (B).

Figuras 4A-4F. Desarrollo potencial *in vivo*. Las secciones transversales son representativas de trasplantes de DPSC, (A, C, D) y trasplantes de BMSC (B, E, F) 6 semanas después del trasplante y se tiñeron con hematoxilina y eosina. En los trasplantes de DPSC, las superficies portadoras de HA/TCP (c) se revisten con una matriz de tipo dentina (d), que rodea un tejido de tipo pulpa con vasos sanguíneos (bv) y una capa de interfase de células de tipo odontoblastos (od). Una vista ampliada de la matriz de dentina (d) destaca la capa de tipo odontoblasto (od) y los procesos odontoblásticos (flecha) (C). La luz polarizada demuestra una alineación perpendicular (líneas punteadas) de las fibras de colágeno en la superficie formadora (D). En los trasplantes de BMSC, se forma hueso lamelar (b) sobre las superficies de HA/TCP (c) y rodea un órgano medular vascular hematopoyético (hp) con adipocitos acumulados (a) (B). Una vista ampliada muestra que el nuevo hueso contiene osteocitos (oc), inmersos en la matriz calcificada, y osteoblastos (ob) revistiendo las superficies óseas (E). Con luz polarizada, se observa que las fibrillas de colágeno se depositan en paralelo con la superficie formadora (líneas rayadas) (F).

Figuras 5A-5B. Hibridación *in situ* de la secuencia de ADN humano específica de alu. Las células positivas para alu en el tejido de la pulpa (flecha grande) y capa de tipo odontoblasto (flecha pequeña) adyacente a la matriz de dentina (d) se reconocen fácilmente en trasplantes de DPSC de 6 semanas (A). Los osteocitos incluidos en la nueva matriz ósea (flecha pequeña) y los osteoblastos que revisten las superficies óseas (b) flecha grande muestran reactividad positiva con la sonda alu en los trasplantes de BMSC (B). Los elementos hematopoyéticos (hp) en el órgano de tipo médula no consiguen mostrar reactividad con la sonda alu.

Figuras 6A-6C. Expresión de la sialofosfoproteína humana específica de dentina (DSPP), osteocalcina (OC), ARNm de sialoproteína de hueso (BSP) en trasplantes de DPSC. Se detectaron transcritos de DSPP, BSP, OC y GAPDH mediante RT-PCR utilizando ARN total aislado de trasplantes de DPSC de 6 semanas de edad (A). Se encontraron también células positivas para DSPP en el tejido de la pulpa y la capa de odontoblastos (flecha) adyacente a la matriz de dentina (d) mediante hibridación *in situ* (B). Se verificó la especificidad de la sonda mediante hibridación en la capa de odontoblastos (flecha) del tejido de la pulpa dental humana (p) (C). No se detectó reactividad de la sonda específica de DSPP en hueso humano, médula ósea y tejido muscular.

Figuras 7A-7D. Tinción inmunohistoquímica de DSPP humano. Los elementos asociados al hueso y a la médula fueron negativos para la tinción del anticuerpo dirigido contra DSPP en trasplantes de BMSC (A). La dentina recientemente formada fue positiva para la tinción del anticuerpo dirigido contra DSPP en trasplantes de DPSC (flecha, B). La dentina humana normal y los odontoblastos de la pulpa humana fueron positivos para DSPP (C y D, respectivamente).

Figuras 8A-8B. Formación de dentina en trasplantes de DPSC. Tinción tricrómica (azul) de la dentina (flecha) en trasplantes de DPSC humanos de ocho semanas de edad (A). Sección transversal de un diente normal que representa la tinción tricrómica (flecha) de la dentina *in situ* (B).

## 5 Descripción detallada de la invención

**[0009]** Tal como se usa en la presente memoria, “un”, “uno” o “el” pueden significar uno o más. Por ejemplo, “una” célula puede significar una o más células. Además, “la” célula puede significar una o más de una célula.

10 **[0010]** La presente invención proporciona un cultivo de citoblastos aislados de pulpa dental de adulto humano de acuerdo con la reivindicación 1. Los citoblastos de pulpa dental de adulto humano pueden aislarse de cualquier diente permanente humano. De forma alternativa, los citoblastos de pulpa dental de la invención se pueden aislar de un sujeto humano de al menos aproximadamente 18 años de edad. “Aislado”, tal como se usa en la presente memoria significa que la célula de la presente invención está suficientemente exenta de contaminantes u otros tipos de células con los cuales la célula de la presente invención se encuentra de forma natural. Además, la célula aislada de la presente invención está presente en una concentración tal que es la única célula significativa en la muestra. “Aislado” no requiere que la preparación sea técnicamente pura (homogénea), pero es lo suficientemente pura para proporcionar la célula en una forma en la que se puede utilizar terapéuticamente o para investigación.

20 **[0011]** Un “citoblasto” es una célula que es multipotencial, clonogénica, muy proliferativa y capaz de regenerar el tejido. De esta manera, un citoblasto tiene la capacidad tanto de afectar otras células de su microentorno para que se diferencien en una línea celular específica o bien ella misma se puede diferenciar en otro tipo de célula que tiene una función específica. De esta manera, un citoblasto de pulpa dental de adulto humano de la presente invención es una célula obtenida de la pulpa del tejido de un diente procedente de un ser humano adulto. El citoblasto de la presente invención puede diferenciarse a una célula más madura y funcional, por ejemplo, un odontoblasto. Un odontoblasto es una célula que se encuentra en la cavidad oral de un mamífero que produce dentina, un tejido que comprende y envuelve una pulpa fibrovascular y está cubierta por una capa de esmalte exterior de un diente completamente formado. El citoblasto de pulpa dental de la presente invención puede producir una estructura de tejido de dentina/pulpa *in vivo* e *in vitro*. Esta estructura se ilustra en la Figura 1.

30 **[0012]** La presente invención proporciona un citoblasto que no es adipogénico. De esta manera, el DPSC de la presente invención no se diferencia en un adipocito. Además, el citoblasto de la presente invención no produce sialoproteína ósea. De esta manera, el citoblasto de la presente invención no es un citoblasto de médula ósea, una célula que puede diferenciarse en un adipocito y produce sialoproteína ósea. Sin embargo, el citoblasto de la presente invención produce sialoproteína de dentina específica de odontoblastos y fosfoproteína de dentina, codificada cada proteína por el gen específico de odontoblasto se conoce como sialofosfoproteína de dentina (DSPP).

40 **[0013]** La presente invención proporciona un procedimiento definido en la reivindicación 11. El procedimiento se usa para regenerar o producir tejido de dentina/pulpa humano, poniendo en contacto una célula procedente de un cultivo de DPSC aislado adulto de humano con una fuente mineral y se utiliza para trasplantar la célula a un mamífero. El citoblasto del presente procedimiento se mezcla con una fuente mineral, por ejemplo, hidroxapatita/fosfato tricálcico. Esta célula/composición mineral puede a continuación trasplantarse a un mamífero mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia. El citoblasto/composición mineral se puede trasplantar a un mamífero inmunocomprometido, por ejemplo, un ratón, en el cual el tejido trasplantado puede producir tejido de dentina/pulpa humano que se puede cosechar para el trasplante a un ser humano. El mamífero puede ser un ratón, oveja, vaca, o cualquier mamífero utilizado para estudios de trasplante y que conoce un experto en la materia, incluyendo un ser humano. Además, un receptor humano del citoblasto/composición mineral puede ser un hospedador intermediario a partir del cual se puede cosechar el tejido de dentina/pulpa para el trasplante adicional a otro paciente dental humano. De forma alternativa, el receptor humano del citoblasto/composición mineral puede a la vez el donante y el único receptor del tejido trasplantado.

55 **[0014]** Un experto en la materia puede trasplantar el citoblasto/composición mineral en diversos sitios de un mamífero que incluyen el tejido subcutáneo y el tejido oral. Se contempla que un experto en la materia pueda trasplantar el citoblasto/composición mineral en un alveolo dental y, por tanto, producir un tejido de dentina/pulpa en un paciente humano.

60 **[0015]** Además, el citoblasto/composición mineral trasplantado puede trasplantarse con o ponerse en contacto *in vitro* con ameloblastos, células que producen esmalte, para producir un diente funcional completamente formado, que comprende tejido de dentina/pulpa cubierto por esmalte. De forma similar, coronas artificiales preparadas de materiales biocompatibles que imitan la capa de esmalte duro del diente se pueden producir y utilizarse como molde.

El citoblasto/composición mineral trasplantado puede trasplantarse directamente a la cavidad de una corona artificial en la que las células pueden diferenciarse en tejido de dentina/pulpa *in vivo*, formando de este modo un diente funcional.

- 5 **[0016]** Los siguientes ejemplos se formulan de tal manera que proporcionan a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo las composiciones y/o procedimientos reivindicados en la presente memoria se preparan y evalúan, y se pretende que sean únicamente a modo de ejemplo de la invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la fiabilidad con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones. La presente invención se describe de forma más particular en los siguientes ejemplos, que se pretende que sean únicamente ilustrativos debido a que serán evidentes numerosas modificaciones y variaciones a los expertos en la técnica.

### Ejemplos

- 15 **Sujetos y cultivo celular**

**[0017]** Se recogieron los terceros molares afectados procedentes de adultos humanos normales (12-29 años de edad) en la clínica dental del National Institute of Dental & Craniofacial Research según las directrices homologadas establecidas por la NIH Office of Human Subjects Research. Las superficies de los dientes se limpiaron y cortaron alrededor de la unión de cemento-esmalte utilizando fresas esterilizadas para fisura dental para revelar la cámara de la pulpa. El tejido de la pulpa se separó suavemente de la corona y la raíz y a continuación se digirió en una disolución de 3 mg/ml de colagenasa de tipo I (Worthington Biochem, Freehold, NJ) y 4 mg/ml de dispasa (Boehringer Mannheim, GMBH, Alemania) durante una hora a 37° C. Se obtuvieron suspensiones celulares individuales pasando las células a través de un tamiz de 70 µm (Falcon, BD Labware, Franklin Lakes, NJ). Células de la médula ósea, procesadas procedentes de aspirados de médula de voluntarios adultos humanos normales (25-35 años de edad), se adquirieron de Poietic Technologies, Gaithersburg, Maryland, y a continuación se lavaron en un medio de crecimiento. Suspensiones celulares individuales (0,01 a 1 x 10<sup>5</sup>/pocillo) de pulpa dental y médula ósea, se sembraron en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) con medio Eagle con modificación α (GIBCOBRL, Grand Island, NY) suplementado con suero de ternera fetal (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX), 100 µM de ácido 2-fosfato L-ascórbico (WAKO, Tokio, Japón), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (Biofluids Inc, Rockville, MD), a continuación se incubaron a 37° C en CO<sub>2</sub>. Para evaluar la eficacia formadora de colonias, se fijaron los cultivos del día 14 con formalina al 4% y a continuación se tiñeron con azul de toluidina al 0,1%. Los agregados de ≥50 células se clasificaron como colonias. Las condiciones para la inducción de la deposición de la matriz ósea calcificada *in vitro* han sido las indicadas anteriormente (6). Se evaluó la velocidad de proliferación de los cultivos subconfluentes (primer pase) de los DPSC y BMSC mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 24 horas, utilizando un Kit de tinción Zymed Laboratories BrdU (Vector Laboratories, Burlingame CA).

- 40 **Inmunohistoquímica**

**[0018]** Se subcultivaron DPSC y BMSC primarios en portas de 8 cámaras (2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) (NUNC Inc. Naperville, IL). Se fijaron las células en formalina al 4%, y a continuación se hicieron reaccionar con niveles de saturación de anticuerpos primarios y los correspondientes anticuerpos del control utilizando un kit Zymed de inmunoperoxidasa de amplio espectro (Vector Laboratories). Los anticuerpos usados fueron (IgG) control dirigido contra IgG de ratón (Caltag, Burlingame, CA. (Ig) control dirigido contra Ig de conejo, TUK4 (anticuerpo dirigido contra CD-14), QBEND 10 (anticuerpo dirigido contra CD34), 2B11/PD7 (anticuerpo dirigido contra CD45), M318 (anticuerpo dirigido contra MyoD), 1A4 (anticuerpo dirigido contra α actina del músculo liso), 2F11 (antineurofilamento), (Dako, Carpintería, CA); H9H11 (anticuerpo dirigido contra CD44), 6G10 (anticuerpo dirigido contra VCAM-1) (Dr. P.J. Simmons, HCCR, Adelaide, South Australia); CC9 (anticuerpo dirigido contra MUC-18) (Dr. S. Gronthos NIDCR/NIH, doctor en medicina); MAB1343 (anticuerpo dirigido contra COLIII), MAB1959 (anticuerpo dirigido contra β1) (Chemicon, Temecula, CA); LF67 (anticuerpo dirigido contra COL I), LF32 (anticuerpo dirigido contra OC), BON-1 (anticuerpo dirigido contra ON); LF100 (anticuerpo dirigido contra BSP), LF123 (anticuerpo dirigido contra OP) (Dr. L. Fisher, NIDCR/NIH, doctor en medicina); MAB 1104 (anticuerpo dirigido contra COL II) (RDI, Flanders, NJ); E-8 (anticuerpo dirigido contra PPAR<sub>γ</sub>), 147 (anticuerpo dirigido contra FGF-2), (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). Se utilizaron diluciones de trabajo de suero de conejo (1/500, sobrenadantes monoclonales (1/4) y anticuerpos purificados (10 µg/ml)

### Histoquímica

- 60 **[0019]** Cultivos de DPSC y BMSC secundarios se lavaron en PBS y a continuación se fijaron con formalina al 4%.

Se evaluó la actividad de la fosfatasa alcalina utilizando un kit de sustrato de fosfatasa alcalina *in vitro* de Sigma (85L-2). Se detectaron depósitos de calcio mediante el tratamiento con rojo de alizarina S al 2% (pH 4,2).

#### Trasplante

5

**[0020]** Se mezclaron aproximadamente  $5,0 \times 10^6$  de DPSC y BMSC (tercer pase) con 40 mg de polvo cerámico hidroxiapatito/fosfato tricálcico (HA/TCP) (Zimmer Inc, Varsovia), y a continuación se trasplantaron por vía subcutánea en la superficie dorsal de ratones de color beige inmunocrompetidos de 10 semanas de edad (NIH-bg-un-xid, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) tal como se ha descrito anteriormente (9). Estos procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las especificaciones de un protocolo homologado para animales pequeños (NIDCR nº 97-024). Los trasplantes se recuperaron a las 6 semanas después del trasplante, se fijaron con formalina al 4%, se descalcificaron con EDTA al 10% tamponado (pH 8,0) y a continuación se sumergieron en parafina. Se desparafinaron secciones (5 m) y se tiñeron con H&E.

#### 15 RT-PCR

**[0021]** Se preparó ARN total a partir de suspensiones celulares digeridas con colagenasa/dispasa de trasplantes de DPSC de seis semanas de edad, utilizando ARN STAT-60 (TEL-TEST Inc. Friendswood, TX). Se llevó a cabo la síntesis de la primera hebra de ADNc utilizando un kit de síntesis de la primera hebra de ADNc (GIBCO BRL, Life Technologies) usando un cebador oligo-dT. La primera hebra de ADNc (2 µl) se diluyó en 50 µl de fluido de reacción de la PCR de tampón de reacción 1x PCR: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 mM de cada DNTP, 0,2 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer Inc, Norwalk, CT) y 10 pMol de cada conjunto de cebadores específicos humanos: BSP (sentido directo (SEC DE ID Nº: 1) 5'-CTATGGAGAGGACGCCACGCCTGG-3' (S(de sentido contrario, (SEC DE ID Nº: 2) 5'-CATAGCCATCGTAGCCTTGTCT-3'), OC (de sentido directo, (SEC DE ID Nº: 3) 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3'; de sentido contrario, (SEC DE ID Nº: 4) 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3'), DSPP (de sentido directo (SEC DE ID Nº: 5) 5'-GGCAGTGACTCAAAGGAGC-3'; de sentido contrario, 5'-(SEC ID Nº: 6) TGCTGTCACTGTCACTGCTG-3'), GAPDH (de sentido directo, (SEC DE ID Nº: 7) 5'-AGCCGCATCTTCTTTTGCCTC-3'; de sentido contrario (SEC DE ID Nº: 8) 5'-TCATATTTGGCAGGTTTTTCT-3'). Las reacciones se incubaron en un ciclador térmico PCR Express Hybaid (Hybaid, Franklin, MA) a 94° C durante 2 minutos durante 1 ciclo, a continuación a 94° C/(45 s), 56° C/(45 s), 72° C (60 s) durante 35 ciclos, con una extensión final de 10 minutos a 72° C. tras la amplificación, se analizaron 10 µl de cada reacción mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

#### Hibridación in situ

35

**[0022]** Se preparó mediante la PCR una sonda marcada con digoxigenina para la secuencia repetitiva de alu específica humana usando los cebadores de alu tal como se ha descrito anteriormente (13). De forma similar, se preparó también una sonda marcada con digoxigenina específica de ARNm de DSPP humano utilizando los cebadores de DSPP en las mismas condiciones de la PCR que se han descrito anteriormente. Se verificó la especificidad de ambas sondas mediante la secuenciación del ADN. Se desparafinaron secciones sin teñir y se hibridaron tanto con sonda alu marcada con digoxigenina (9) como con la sonda de DSPP utilizando el Kit mRNAlocator-Hyb (nº de cat. 1800; Ambion, Inc., Austin TX). Tras la hibridación, se detectó la presencia de ARNm tanto de alu como de DSPP en secciones de tejido mediante inmunorreactividad con fosfatasa alcalina dirigida contra digoxigenina conjugada con fragmentos Fab (Boehringer Mannheim).

45

#### Aislamiento de poblaciones clonogénicas de DPSC.

**[0023]** Se pueden aislar osteoprogenitores de aspirados de médula ósea por su capacidad de adherirse a un sustrato plástico y, con un estímulo adecuado, comenzar a proliferar (13-15). Cada colonia se origina de una única célula progenitora (unidad formadora de colonias-fibroblasto. UFC-F) y muestra una amplia variación en la morfología celular y el potencial de crecimiento (13-18). En la presente memoria, se demuestra por primera vez la presencia de una población celular clonogénica en el tejido de la pulpa dental (Fig 1A y B). Se han caracterizado las células en cada colonia por una morfología de tipo fibroblasto típico (Fig 1C) análoga a la progenie de la médula ósea humana UFC-F (19). La frecuencia de las células formadoras de colonias derivadas del tejido de la pulpa dental (intervalo de 22 a 70 colonias por  $10^4$  células plaqueadas) fue significativamente superior en comparación con la incidencia de UFC-F de médula ósea (intervalo de 2,4 a 3,1 colonias por  $10^4$  células plaqueadas) para densidades de plaqueo similares (0,1 a  $2,5 \times 10^4$  células plaqueadas) (Fig 1D). Además, el número de células proliferantes en cultivos de DPSC fue también significativamente mayor (promedio 72% células positivas para BrdU  $\pm$  3,48 SEM, n=3) cuando se compara con los cultivos de BMSC (46% células positivas para BrdU  $\pm$  1,96 SEM, n=3) utilizando el procedimiento de captación de BrdU (test de la t  $p \leq 0,05$ ) (Fig. 1E).

60

Caracterización del Inmunofenotipo de DPSC *in vitro*.

**[0024]** Se han llevado a cabo estudios inmunohistoquímicos para caracterizar la progenie de las poblaciones clonogénicas de DPSC y BMSC, utilizando un importante panel de anticuerpos específicos de antígenos conocidos asociados con diferentes fenotipos. En la Tabla 1 se muestran los perfiles de inmunoreactividad típicos de ambas poblaciones celulares. Los cultivos primarios de DPSC y BMSC no consiguieron reaccionar con los marcadores hematopoyéticos CD14 (monocito/macrófago), CD45 (antígeno común de leucocitos), CD34 (hemocitoblastos/células progenitoras/endotelio) y otros marcadores tales como MyoD (músculo liso), neurofilamento (nervio), colágeno de tipo II (cartilago) y PPAR $\gamma$  (grasa). En general, DPSC y BMSC presentaron un modelo de expresión similar para una variedad de marcadores asociados con el endotelio (VCAM-1 y MUC-18), músculo liso (actina  $\alpha$  del músculo liso), hueso (fosfatasa alcalina, colágeno de tipo I, osteonectina, osteopontina, osteocalcina) y fibroblastos (colágeno de tipo III, FGF-2). La proteína de la matriz ósea, la sialoproteína ósea, estuvo ausente en los cultivos de DPSC, pero presente a bajos niveles en cultivos de BMSC. En la (Fig. 2) se muestran modelos de inmunoreactividad representativos de DPSC. Muchos de los marcadores no se han expresado de forma uniforme aunque se encuentran en subconjuntos de células, indicando que la población de DPSC es heterogénea, tal como se ha mostrado para la población de BMSC.

Diferenciación potencial de DPSC *in vitro*.

**[0025]** Cultivos a largo plazo (5 a 6 semanas) de DPSC que crecen en presencia de L-ascorbato-2-fosfato, el glucocorticoide, dexametasona y fosfato inorgánico, demostraron la capacidad de formar nódulos condensados positivos para el rojo de alizarina, con elevados niveles de calcio (Fig. 3A). Los depósitos se dispersaron escasamente por la capa adherente como zonas mineralizadas individuales. En contraste, los cultivos de BMSC produjeron extensas láminas de depósitos calcificados sobre la totalidad de la capa adherente después de 3 a 4 semanas de inducción (Fig. 3C). Tras 6 semanas de estimulación con dexametasona, no hubo evidencias de adipogénesis en cultivos de DPSC primarios (Fig. 3C) en los que se detectaron como agrupaciones de adipocitos que contenían lípidos en cultivos primarios de BMSC incluso a las dos semanas (Fig. 3D).

**[0026]** Los DPSC expandidos *ex vivo* pueden generar una estructura de dentina/pulpa *in vivo*. Debido a que el potencial de desarrollo completo y la formación de una estructura histológica adecuada pueden no realizarse de forma completa *in vitro*, se trasplantaron los DPSC junto con polvo de hidroxapatito/fosfato tricálcico (HA/TCP) en ratones inmunocomprometidos. Tras 6 semanas después del trasplante, los DPSC generaron una estructura de tipo dentina que revestía las superficies de las partículas de HA/TCP, comprendidas por una matriz de colágeno muy ordenada depositada perpendicularmente a la capa de tipo odontoblasto, cuando se observaron mediante luz polarizada (Fig. 4A, C, D). Los estudios inmunológicos han demostrado que la matriz estaba predominantemente compuesta de colágeno de tipo I. Las células de tipo odontoblastos extendieron los procesos citoplásmicos a la matriz de dentina, cuya interfase con un tejido intersticial de tipo pulpa estaba infiltrada con vasos sanguíneos. Se encontró que la pulpa y las células de tipo odontoblasto eran de origen donante basándose en su reactividad a la sonda específica de alu humana (Fig. 5A). Además, los trasplantes de DPSC expresaron transcritos específicos humanos para los componentes de la matriz de dentina, que incluían la sialoproteína ósea, la osteocalcina y la sialofosfoproteína de dentina (DSPP), mediante RT-PCR e hibridación *in situ* (Fig. 6). Los correspondientes trasplantes de BMSC formaron distintas lamelas de hueso sobre la superficie de HA/TCP en la que las fibras de colágeno se alineaban paralelas a los osteoblastos de las superficies formadoras de huesos (Fig. 4B, E, F). También se ha encontrado que los osteocitos, enterrados en la matriz ósea, y los osteoblastos eran de origen donante (Fig. 5B). Los huesos de formación reciente rodeaban un tejido intersticial que estaba infiltrado una red sinusoide que asemejaba un órgano de tipo médula con extensas zonas de hematopoyesis activa y acumulación de adipocitos. De forma interesante, los trasplantes de DPSC fracasaron en apoyar cualquier hematopoyesis o en iniciar la formación de adipocitos incluso 4 meses después del trasplante.

## Tinción inmunohistoquímica de DSPP humana

**[0027]** Se llevó a cabo el trasplante de DPSC y BMSC tal como se ha descrito anteriormente. Los trasplantes se recuperaron 8 semanas después del trasplante y se fijaron durante 24 horas con paraformaldehído al 4% preparado de forma reciente, y se descalcificó durante 7 días con EDTA al 10% (pH 8,0). A continuación se transfirieron los trasplantes a etanol al 70% y se incluyeron en un bloque de parafina. El anticuerpo de DSPP era del Dr. Larry Fisher (MDCR/NIH). Tras la desparafinización, la rehidratación, y la eliminación de la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario de DSPP a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se utilizaron kits Histotain SP para los anticuerpos secundarios y la incubación del conjugado de la enzima de acuerdo con las instrucciones (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA, EE:UU). Se utilizaron tejidos de pulpa humana y dentina desmineralizada como controles positivos. Este procedimiento mostró que la dentina formada recientemente en trasplantes de DPSC es positiva para el anticuerpo de DSPP específico de dentina (Fig. 7). Es una

evidencia adicional que los DPSC humanos se diferencian en odontoblastos para regenerar la dentina humana *in vivo*.

Tinción tricrómica de formación de dentina en trasplantes de DPSC.

5

**[0028]** El trasplante de DPSC y BMSAC se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Trasplantes de DPSC humanos de ocho semanas de edad se fijaron durante 24 horas con paraformaldehído al 4% preparado recientemente, y se transfirieron a etanol al 70% y se incluyeron en plástico. El kit de tinción tricrómica (GOMOR) (Sigma, nº HT10516) se utilizó para la tinción de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se utilizaron secciones de  
10 dientes normales incluidas en plástico como controles positivos. Esta tinción mostró que los DPSC que regeneran la dentina comprenden estructuras de colágeno mineralizadas similares a las de la dentina humana normal (Fig. 8).

**[0029]** Los datos presentados en la presente memoria demuestran por primera vez que la pulpa dental posterior al nacimiento contiene células que son clonogénicas, muy proliferativas y capaces de regenerar un tejido, propiedades  
15 que las definen efectivamente como citoblastos. Aunque el músculo, el tejido nervioso, y el tejido asociado a la dentina no se remodelan durante la vida posterior al nacimiento, todos contienen citoblastos que tienen la capacidad de diferenciarse en respuesta a una lesión. El trasplante de DPSC humanos en ratones inmunocomprometidos proporciona un nuevo modelo que caracteriza adicionalmente estos citoblastos. Además, la cantidad de dentina y de  
20 tejido de tipo pulpa formado en estos trasplantes excede de lejos la cantidad que se generaría *in situ* durante el tiempo de vida de un organismo. Por consiguiente, el presente aislamiento de un gran número de DPSC a partir de un único diente permite la reparación de la dentina de varios dientes. Además, mediante el uso de vehículos con una forma y composición adecuadas junto con DPSC expandidos *ex vivo*, se proporciona la fabricación de un implante dental viable.

25 Referencias

**[0030]**

- 30 1. Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J. V. & Lesot, H. (1995) *Int J Dev Biol* 39, 273-80.
2. Kitamura, C., Kimura, K., Nakayama, T. y Terashita, M. (1999) *J Dent Res* 78, 673-80.
3. Ruch, J. V. (1998) *Biochem Cell Biol* 76, 923-38.
4. Couble, M. L., Farges, J. C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M. y Magloire, H. (2000) *Calcif Tissue Int* 66, 129-38.
- 35 5. Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F. y Avioli, L. V. (1994) *Endocrinology* 134, 277-86. 6. Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S. y Simmons, P. J. (1994) *Blood* 84, 4164-73.
7. Friedenstein, A. J., Ivanov-Smolenski, A. A., Chajlakjan, R. K., Gorskaya, U. F., Kuralesova, A. I., Latzinik, N. W. y Gerasimow, U. W. (1978) *Exp Hematol* 6, 440-4.
8. Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T. y Owen, M. E. (1991) *J Cell Sci* 99, 131-9.
- 40 9. Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D. y Robey, P. G. (1997) *J Bone Miner Res* 12, 1335-47.
10. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stomaiuolo, A., Cossu, G. y Mavilio, F. (1998) *Science* 279, 1528-30.
11. Azizi, S. A. y col. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3908-13.
- 45 12. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. y Marshak, D. R. (1999) *Science* 284, 143-7.
13. Bianco, P. y Robey, P. G. (2000) *J. Clin. Invest.* 105.
14. Robey, P. G. (2000) *J Clin Invest* 105, 1489-91.
15. Nakashima, M., Nagasawa, H., Yamada, Y. y Reddi, A. H. (1994) *Dev Biol* 162, 18-28.
- 50 16. Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H. y Kato, Y. (1998) *J Cell Physiol* 174, 194-205.
17. Onishi, T., Kinoshita, S., Shintani, S., Sobue, S. y Ooshima, T. (1999) *Arch Oral Biol* 44, 361-71.
18. Kettunen, P., Karavanova, I. y Thesleff, I. (1998) *Dev Genet* 22, 374-85.
19. Kuo, M. Y., Lan, W. H., Lin, S. K., Tsai, K. S. y Hahn, L. J. (1992) *Arch Oral Biol* 37, 945-52.
- 55 20. Tsukamoto, Y., Fukutani, S., Shin-Ike, T., Kubota, T., Sato, S., Suzuki, Y. y Mori, M. (1992) *Arch Oral Biol* 37, 1045-55.
21. Buurma, B., Gu, K. y Rutherford, R. B. (1999) *Eur J Oral Sci* 107, 282-9.
22. Ritchie, H. H., Hou, H., Veis, A. y Butler, W. T. (1994) *J Biol Chem* 269, 3698-702.
23. Gorter de Vries, I., Quartier, E., Van Steirteghem, A., Boute, P., Coomans, D. y Wisse, E. (1986) *Arch Oral Biol* 31, 57-66.
- 60 24. MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X., Nydegger, J., Feng, J. y Gu, T. T. (1997) *J Biol Chem* 272, 835-



42.  
 25. Feng, J. Q., Luan, X., Wallace, J., Jing, D., Ohshima, T., Kulkarni, A. B., D'Souza, R. N., Kozak, C. A. y MacDougall, M. (1998) *J Biol Chem* 273, 9457-64. 26. Owen, M. E. (1998) (Cambridge University Press, Cambridge), pp. 1-9.  
 5 27. Friedenstein, A. J. (1980) in *Immunology of Bone Marrow Transplantation* (Springer-Verlag, Berlin), pp. 19-29.  
 28. Bianco, P. y Cossu, G. (1999) *Exp Cell Res* 251, 257-63.  
 29. Bianco, P. y Riminucci, M. (1998) en *Marrow stromal cell culture*, eds. Owen, M. A. y Beresford, J. N. (Cambridge University Press, Cambridge Reino Unido), pp. 10-25.  
 10 30. Doherty, M. J., Ashton, B. A., Walsh, S., Beresford, J. N., Grant, M. E. y Canfield, A. E. (1998) *J Bone Miner Res* 13, 828-38.  
 31. Shiba, H., Nakamura, S., Shirakawa, M., Nakanishi, K., Okamoto, H., Satakeda, H., Noshiro, M., Kamihagi, K., Katayama, M. y Kato, Y. (1995) *Dev Biol* 170, 457-66.  
 15 32. Majors, A. K., Boehm, C. A., Nitto, H., Midura, R. J. y Muschler, G. F. (1997) *J Orthop Res.* 15, 546-57. 33. Ishizeki, K., Nawa, T. y Sugawara, M. (1990) *Anat Rec* 226, 279-87.  
 34. Holtgrave, E. A. y Donath, K. (1995) *Biomaterials* 16, 155-9.  
 35. Lyaruu, D. M., van Croonenburg, E. J., van Duin, M. A., Bervoets, T. J., Woltgens, J. H. y de Blicck-Hogervorst, J. M. (1999) *J Oral Pathol Med* 28, 293-6.  
 20 36. Prime, S. S., Sim, F. R. y Reade, P. C. (1982) *Transplantation* 33, 561-2.  
 37. Schultz, E. y McCormick, K. M. (1994) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123, 213-257.  
 38. Johansson, C. B., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A. M. y Frisen, J. (1999) *Exp Cell Res* 253, 733-6.  
 39. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. (1999) *Cell* 97, 703-16.

25 **Tabla 1. Análisis inmunohistoquímico de los DPSC y BMSC humanos *in vitro*.**

Marcador	DPSC-1	DPSC-2	BMSC
CD14	-	-	-
CD34	-	-	-
CD44	++	++	++
CD45	-	-	-
Integrina $\beta$ 1	++/+	++/+	++
VCAM-1	+	+	++
MyoD	-	-	-
Actina $\alpha$ -SM	++/-	++/-	++/+/-
Neurofilamento	-	-	-
MUC-18	++/-	++/+/-	++/+/-
Colágeno-I	+	++	++/+
Colágeno-II	-	-	-
Colágeno-III	++/+	++/+	++/+
Osteocalcina	++/+	++/+	+/-
Osteonectina	++/+	++	++/+
BSP	-	-	+/-
Osteopontina	+/-	+/-	+/-
Fosfatasa alcalina	++/+/-	++/+/-	++/+/-
PPAR $\gamma$	-	-	-
FGF-2	++/+	++	++/+

(++) Tinción fuerte, (+) Tinción débil.  
 (-) Negativo, (/) Subpoblación

LISTADO DE SECUENCIAS

30 [0031]

<110> Songtao Shi  
 Stan Gronthos  
 Pamela Gehron Robey

35

<120> CITOBLASTOS DE PULPA DENTAL DE SERES HUMANOS ADULTOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

<130> 14014.0379P1

<150> 60/219.989  
 <151> 21-07-2000

5 <160> 8

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

10 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

<400> 1

ctatggagag gacgccacgc ctgg 24

20

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

<400> 2

30

catagccatc gtagccttgt cct 23

<210> 3

<211> 16

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

40

<400> 3

catgagagcc ctcaca 16

45 <210> 4

<211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

<400> 4

55 agagcgacac cctagac 17

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 423 898 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

<400> 5

5

ggcagtgact caaaaggagc 20

<210> 6

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

15

<400> 6

tgctgtcact gtcactgctg 20

20 <210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

<400> 7

30 agccgcatct tctttgctg c 21

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

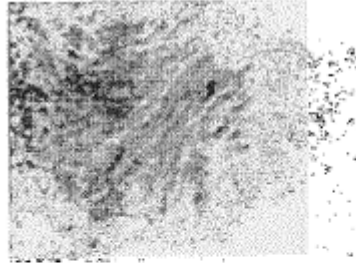
<223> Descripción de la Secuencia Artificial; Nota = construcción sintética

40 <400> 8

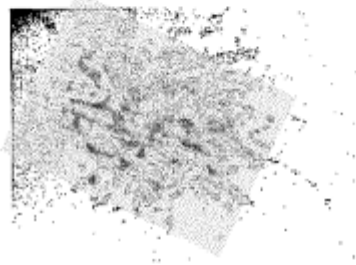
tcatatttgg caggttttc t 21

**REIVINDICACIONES**

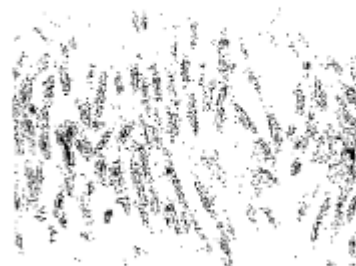
1. Un cultivo de citoblastos de pulpa dental de adulto humano que está suficientemente exento de contaminantes u  
5 otros tipos de células con los que las células se encuentran de forma natural, y presentes en una concentración tal que es la única célula significativa en la muestra.
2. El cultivo de la reivindicación 1, en el cual los citoblastos pueden diferenciarse en odontoblastos.
- 10 3. El cultivo de la reivindicación 1, en el cual los citoblastos pueden regenerar una estructura de dentina/pulpa in vivo.
4. El cultivo de la reivindicación 1, en el cual los citoblastos no son adipogénicos.
- 15 5. El cultivo de la reivindicación 1, en el cual las células no producen sialoproteína ósea.
6. Uso de un citoblasto de pulpa dental humana que está suficientemente exento de contaminantes u otros tipos celulares con los que las células se encuentran naturalmente, y presentes en dicha concentración tal que es la única célula significativa en la muestra, y una fuente mineral para la preparación de una composición para regenerar la  
20 dentina humana o la pulpa de tejido.
7. El uso de la reivindicación 6, en el cual el citoblasto de la pulpa dental humana es un citoblasto de pulpa dental humana que se ha obtenido de un diente humano adulto.
- 25 8. El uso de la reivindicación 7, en el cual el citoblasto de la pulpa dental humana es un citoblasto de pulpa dental humana que produce una sialoproteína de dentina específica de odontoblasto.
9. El uso de la reivindicación 7, en el cual el citoblasto de la pulpa dental humana es un citoblasto de pulpa dental humana que produce fosfoproteína de dentina.
- 30 10. Una corona artificial que comprende células de pulpa dental de adulto humano de la reivindicación 1.
11. Un procedimiento para cultivar células, que comprende poner en contacto el cultivo de la reivindicación 1 con una fuente mineral *in vitro*, en el cual las células están previstas para usar en la regeneración o producción de tejido  
35 de dentina/pulpa humana y para el uso en el trasplante de las células a un mamífero.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el cual la fuente mineral es hidroxiapatito/fosfato tricálcico.



**FIG. 1A**



**FIG. 1B**



**FIG. 1C**

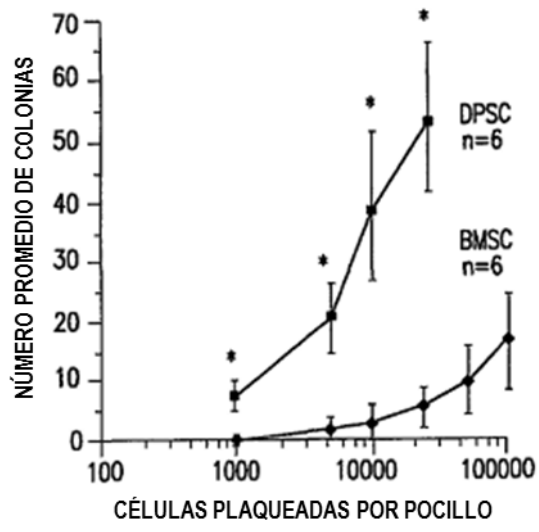


FIG.1D

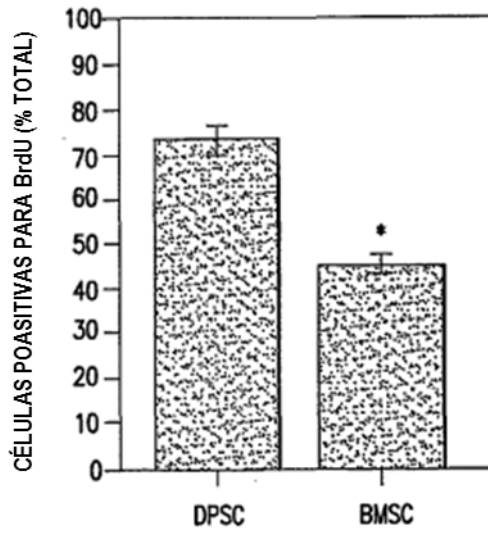


FIG.1E



FIG.2A

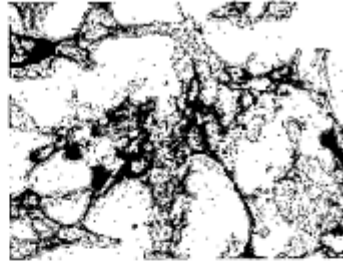


FIG.2B

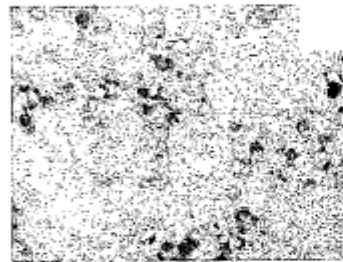


FIG.2C

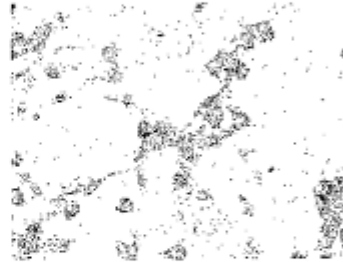


FIG.2D

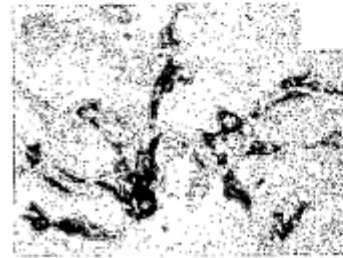


FIG.2E

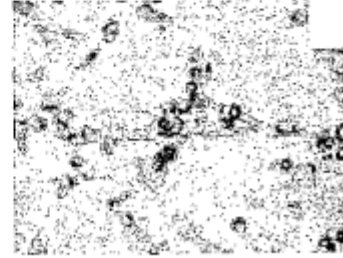
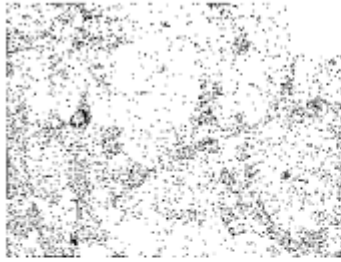


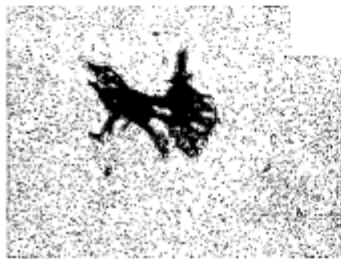
FIG.2F



**FIG. 2G**



**FIG. 2H**



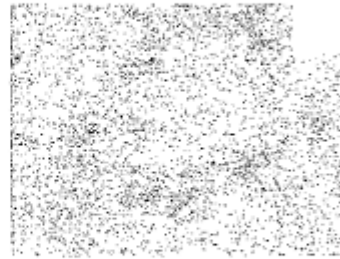
**FIG. 2I**



**FIG. 2J**

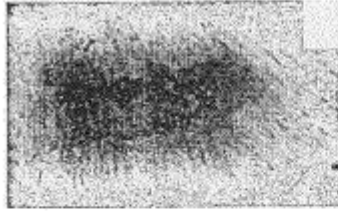


**FIG. 2K**

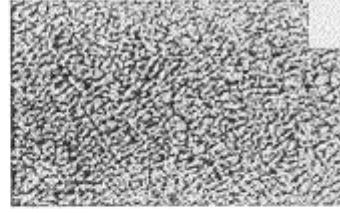


**FIG. 2L**

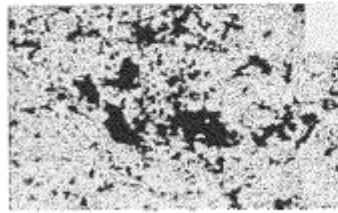




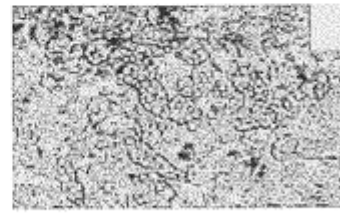
**FIG.3A**



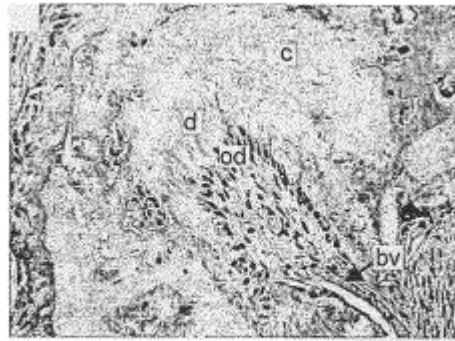
**FIG.3B**



**FIG.3C**



**FIG.3D**



**FIG.4A**



**FIG.4B**

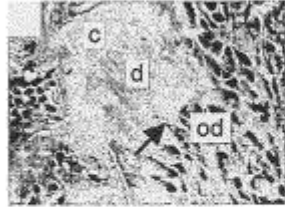


FIG.4C

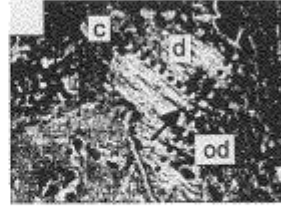


FIG.4D



FIG.4E

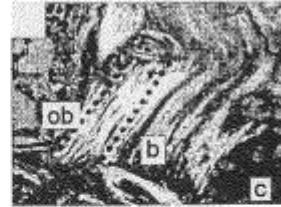


FIG.4F

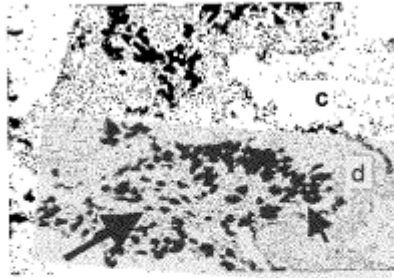


FIG. 5A

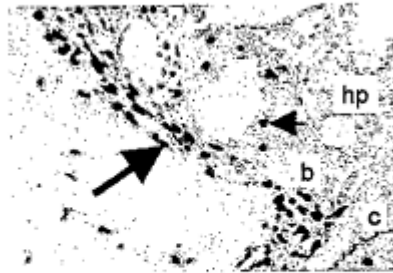


FIG. 5B

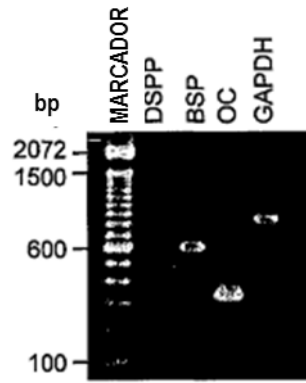


FIG.6A



FIG.6B



FIG.6C

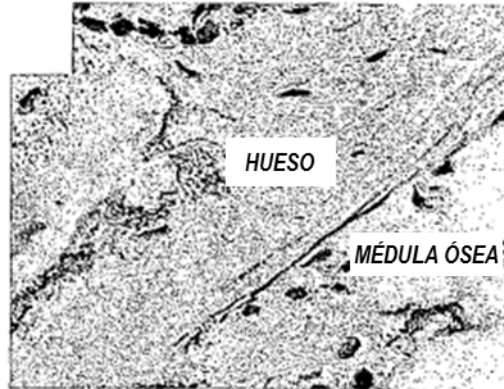


FIG.7A

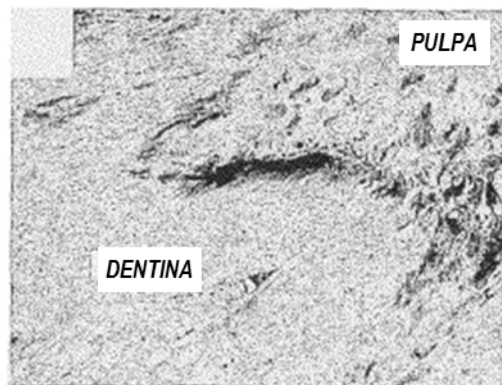


FIG.7B

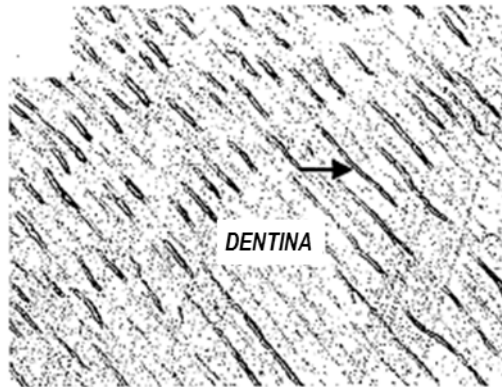


FIG.7C

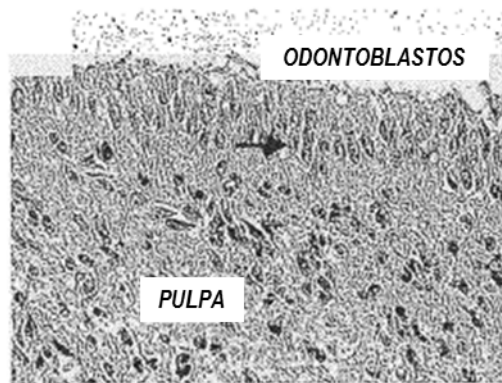


FIG.7D

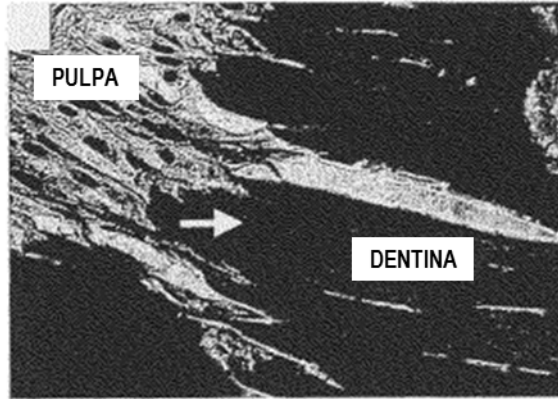


FIG.8A

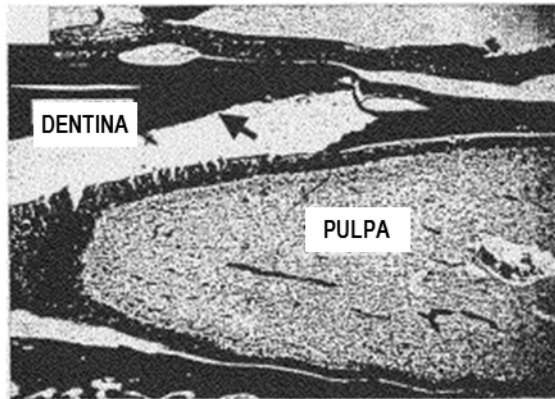


FIG.8B