

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 354**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

A61F 9/00 (2006.01)

A61F 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2003 E 03719390 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 1489992**

54 Título: **Recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido y dispositivos que facilitan la sujeción de las membranas**

30 Prioridad:

14.03.2002 US 365356 P

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

17.07.2015

73 Titular/es:

**TISSUETECH, INC. (100.0%)
7000 S.W. 97TH AVENUE, SUITE 213
MIAMI, FLORIDA 33173, US**

72 Inventor/es:

**TSENG, SCHEFFER, C. G.;
SANDOVAL, HELGA y
LEE, WILLIAM, G.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 541 354 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

Recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido y dispositivos que facilitan la sujeción de las membranas

5

Antecedentes de la invención

Las composiciones amnióticas, tales como la membrana amniótica y los extractos de la membrana amniótica, obtenidas a partir del tejido amniótico procedente de mamíferos, tales como seres humanos, cerdos o caballos, incluyen factores de crecimiento biológico. La membrana amniótica es una membrana biológica que recubre la superficie interna de la cavidad amniótica y comprende un epitelio simple, cuboidal, una membrana basal densa, y una capa mesenquimal avascular que contiene ácido hialurónico. Las composiciones amnióticas se conocen por reducir la inflamación, el crecimiento fibrovascular hacia adentro, y por facilitar la epitelización en modelos animales. Se cree que la membrana amniótica desempeña una función en el proceso curativo de heridas sin dejar cicatrices en un feto (Tseng, S.-C.-G., y otros, "Suppression of Transforming Growth Factor-Beta Isoforms, TGF- β Receptor Type II, and Myofibroblast Differentiation in Cultured Human Corneal and Limbal Fibroblasts by Amniotic Membrane Matrix", J. Cell. Physiol., 179: 325-335 (1999)).

La membrana fetal, que incluye el amnios (membrana amniótica) y el corion, se ha usado en cirugías, documentado ya en 1910 con su uso por Davis en la piel quemada y ulcerada (Davis, J.W., "Skin Transplantation With a Review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital", Johns Hopkins Med. J., 15: 307 (1910). A comienzos de 1973, Trelford y colaboradores reportaron otros usos del amnios, que incluían, por ejemplo, un uso para reemplazar el peritoneo pélvico, un uso en las heridas de la piel de espesor completo, un uso para recubrir las superficies profundas expuestas en los procedimientos de injerto de pedículo, un uso como un injerto sobre el defecto quirúrgico de la glosectomía total, y en la prevención de las adhesiones meningocerebrales después de una lesión en la cabeza (Véase Trelford and Trelford-Sauder, "The Amnion in Surgery, Past and Present", Am. J. Obstet. Gynecol., 134: 833 (1979)).

Las composiciones amnióticas se han usado para el tratamiento del tejido corneal lesionado. Por ejemplo, el trasplante de membrana amniótica se ha usado para la reconstrucción de la superficie ocular para las quemaduras químicas y térmicas agudas (Kim, J.-C., Y Tseng, S.-C.-G., "A Transplantation of Preserved Human Amniotic Membrane for Surface Reconstruction in Severely Damaged Rabbit Corneas", Cornea 14(5): 473-484 (1995)). La técnica quirúrgica de sutura se usa para asegurar la membrana amniótica trasplantada a una superficie de tejido, ya sea interna o externamente (*Id.* en 475). Por ejemplo, en el caso de un tejido corneal lesionado, ya sea si la membrana amniótica se usa como un injerto permanente o como un parche temporal, las suturas se usan para asegurar la membrana en el ojo de un paciente en un quirófano principal.

En este contexto, la patente de los Estados Unidos núm. 5,932,205 describe los métodos para tratar el tejido corneal fotoextirpado, que incluye poner en contacto dicho tejido con una lente de contacto que incluye una composición amniótica.

40

Aunque, por ejemplo, la membrana amniótica puede suturarse a una superficie ocular, puede que no sea posible llevar a los pacientes bajo cuidados críticos al quirófano para la necesaria cirugía del ojo. Por lo tanto, existe una necesidad de un dispositivo para facilitar el uso de la membrana amniótica para el tratamiento de un tejido lesionado o enfermo, tal como, por ejemplo, el tejido corneal quemado químicamente o térmicamente, sin el requerimiento de suturar la membrana en el lugar.

45

La sutura se ha usado además para sujetar la membrana amniótica a un inserto de cultivo, tal como un anillo de silicona, para su uso en el cultivo de células. La fabricación de insertos de cultivo mediante el método de la sutura, sin embargo, consume mucho tiempo. Por lo tanto existe una necesidad de un método eficiente para fabricar insertos de cultivo.

50

Resumen de la invención

En consecuencia, la presente invención proporciona un recubrimiento de la superficie de tejido como se expone en las reivindicaciones 1 a 14. El recubrimiento de la superficie de tejido puede usarse como un parche temporal para reducir la inflamación y la cicatrización, facilitando así la curación de las heridas y restaurando la comodidad y la visión.

55

En la presente se describe un método de sujeción de una membrana entre un primer anillo con broche a presión y un segundo anillo con broche a presión, el primer anillo con broche a presión que incluye una superficie que comprende una pluralidad de columnas sujetadoras separadas, y el segundo anillo con broche a presión que incluye una superficie que define una pluralidad de aberturas de las columnas sujetadoras separadas, el método que incluye las etapas de poner en contacto la membrana a sujetar con la superficie del primer anillo; posicionar la membrana sobre el primer anillo, de manera que se recubra completamente el primer anillo con la membrana; posicionar el segundo anillo sobre el

60

primer anillo para la alineación de al menos una de las columnas sujetadoras separadas con al menos una de las aberturas de las columnas sujetadoras separadas; y acoplar con bloqueo el primer anillo con el segundo anillo, mediante la inserción de al menos una de las columnas en una abertura de la columna sujetadora, de manera que se sujete la membrana entre el primer anillo y el segundo anillo.

5

En consecuencia, un compuesto de la invención es un inserto de cultivo que incluye un primer anillo con broche a presión que tiene una primera superficie; una pluralidad de columnas sujetadoras separadas localizadas sobre la primera superficie; un segundo anillo con broche a presión que tiene una segunda superficie que define una pluralidad de aberturas de las columnas sujetadoras separadas sobre la misma, en donde al menos una de las aberturas se separa para alinearse con una posición de al menos una de las columnas cuando los dos anillos se acoplan durante el montaje; y una membrana que se sujeta entre los dos anillos con broche a presión.

10

En la presente se describe un método para preparar un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido que incluye las etapas de poner en contacto una membrana de biopolímero con la superficie de un primer anillo que tiene un borde anular externo y un diámetro exterior dimensionado para el ajuste con broche a presión dentro del diámetro interior de un segundo anillo que tiene un borde anular interno; posicionar la membrana sobre el primer anillo, de manera que se recubra completamente el primer anillo con la membrana y se envuelva la membrana sobre el borde anular externo del primer anillo; posicionar el segundo anillo sobre el primer anillo para la alineación coaxial con él; y acoplar con bloqueo el primer anillo con el segundo anillo, de manera que se sujete la membrana entre el primer anillo y el segundo anillo, y se fabrique un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido.

15

20

En consecuencia, un compuesto de la invención es un recubrimiento de la superficie de tejido que incluye un primer anillo que tiene un borde anular externo y un diámetro exterior; una membrana que recubre completamente el primer anillo, la membrana que se envuelve sobre el borde anular externo del primer anillo; y un segundo anillo que tiene un borde anular interno y un diámetro interior, el diámetro interior del segundo anillo que se dimensiona para el ajuste con broche a presión sobre el diámetro exterior del primer anillo, y que se posiciona sobre el primer anillo para la alineación coaxial con él; la membrana que se sujeta entre el primer anillo y el segundo anillo mediante un acoplamiento de bloqueo del primer anillo con el segundo anillo durante el montaje del recubrimiento de la superficie de tejido.

25

Un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido de acuerdo con una modalidad de la invención puede componerse de un soporte que es flexible o que se moldea para ajustarse al contorno de una superficie de tejido dada. Por ejemplo, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido puede moldearse para ajustarse al contorno de la superficie ocular, y para recubrir una porción de la superficie ocular o toda la superficie ocular, para formar un vendaje para el ojo.

30

35

Después de la cirugía del ojo o la lesión del ojo, en lugar de vendar el párpado superior cerrado sobre el ojo, o suturar los párpados superior e inferior juntos sobre el ojo, o suturar la membrana amniótica a la superficie ocular, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido ocular de acuerdo con una modalidad de la invención puede colocarse entre los párpados y la córnea para funcionar como una lente de contacto de vendaje. El recubrimiento de membrana amniótica puede proteger la córnea, favorecer la curación, eliminar la necesidad de inmovilizar los párpados, eliminar la necesidad de suturar, puede extraerse o reemplazarse fácilmente, y puede servir como un vehículo de suministro de fármacos de liberación controlada.

40

De acuerdo con una modalidad de la invención, un recubrimiento para una superficie de tejido incluye un soporte. El uso de un soporte no sólo facilita la inserción o la colocación del recubrimiento sobre una superficie de tejido y la extracción del recubrimiento de la superficie de tejido, sino que también reduce la posibilidad de desgarrar una membrana frágil unida al mismo.

45

Un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido puede moldearse para ajustarse al contorno de una superficie de tejido dentro del cuerpo, y puede implantarse en un sitio de tejido deseado. El recubrimiento para una superficie de tejido puede moldearse además para interactuar con una combinación de un tejido implantado y el propio tejido corporal del receptor, para facilitar la aceptación del tejido implantado por el sistema inmune del receptor mediante el blindaje o aislamiento del tejido trasplantado de las células inmunes del receptor.

50

El trasplante de la membrana amniótica, tanto por medio de un injerto permanente, para que las células huéspedes crezcan sobre o en la membrana; como por medio de un parche, apósito, o vendaje temporal, es útil para una variedad de indicaciones oftálmicas, y es efectivo en la facilitación de la curación de heridas epiteliales, y en la reducción de la inflamación estromal, la cicatrización y la formación de nuevos vasos sanguíneos no deseados.

55

Así, la invención puede usarse como un soporte con una membrana amniótica unida al mismo, para su uso como un parche temporal aplicado a una superficie ocular infligida con cualquiera de varias enfermedades y accidentes. Estos incluyen quemaduras químicas agudas de la superficie ocular (10;11;18;26;27), que siguen siendo una de las emergencias oftálmicas más devastadoras y desafiantes. Las quemaduras químicas, especialmente alcalinas, provocan

60

una inflamación severa, que frecuentemente se vuelve incesante y crónica. Como resultado, los tejidos de granulación mezclados con la necrosis conducen invariablemente a la cicatrización prominente. La cicatrización en la superficie corneal reducirá la visión, en la conjuntiva provocará la restricción de la motilidad, y en los párpados provocará la exposición, el microtrauma mecánico (debido a las pestañas mal dirigidas y la queratinización), o la sequedad.

5

Los pacientes con lesiones con peligro de muerte frecuentemente no pueden someterse a una cirugía de emergencia, por ejemplo el trasplante de un injerto de membrana amniótica, para tratar quemaduras químicas o térmicas del ojo. El uso de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular, como un parche temporal, que es una "lente de contacto" de apósito o de vendaje, puede usarse como un tratamiento de emergencia. Debido a que el recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular es "sin sutura", facilitará la comodidad del cuidado del paciente (por ejemplo, aplicable en las unidades de cuidados intensivos o de quemados para pacientes que no pueden llevarse al quirófano para la cirugía necesaria), y nos permitirá explorar otras aplicaciones clínicas en el futuro. Además, puede usarse en las prácticas de consultorio para eliminar instalaciones quirúrgicas engorrosas y costosas.

10

Las terapias convencionales con varios tratamientos médicos para suprimir la inflamación y estimular la curación de las heridas tienen un éxito limitado. La mayoría de los pacientes con quemaduras químicas, peores que las de gravedad de grado I, enfrentan eventualmente un daño severo de la superficie ocular en la etapa posterior. Recientemente se ha demostrado que el trasplante de membrana amniótica como un parche temporal reduce la inflamación y la cicatrización, facilitando así la curación de las heridas y restaurando la comodidad y la visión (26).

20

La membrana amniótica como un parche temporal también se ha usado con éxito para suprimir la inflamación, favorecer la curación, y prevenir la cicatrización en pacientes que sufren el síndrome de Stevens Johnson o necrólisis epidérmica tóxica en la fase aguda (36). Los pacientes que sufren el síndrome de Stevens Johnson, si no son fatales durante el cuidado ya sea en la unidad de cuidados intensivos o la unidad de quemados, frecuentemente se infligen con una enfermedad causante de ceguera debido al pobre manejo de la complicación de la superficie ocular. Esto se debe a que la ruptura de la superficie no se trata oportunamente en la fase aguda, mientras el paciente se encuentra bajo cuidados intensivos.

25

Un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido de acuerdo con una modalidad de la invención puede usarse además para reducir el dolor ocular y la neblina corneal en los pacientes que reciben cirugías con láser excimer, y para mejorar el éxito de la implantación de la queratoprótesis.

30

La membrana amniótica adecuada para su uso en una modalidad de la invención puede adquirirse, procesarse y prepararse de acuerdo con las enseñanzas de las patentes de los Estados Unidos núm. 6,152,142 y 6,326,019.

35

Las membranas amnióticas adecuadas para su uso en una modalidad de la invención están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial de AmnioGraft™, distribuidas por Bio-Tissue (Miami, Florida).

La membrana amniótica preservada carece de células alogénicas viables pero conserva sus efectos antiinflamatorios y anticicatrizantes. Este novedoso método de preparación se ha probado por otros para desvitalizar todas las células alogénicas (6), eliminando así el potencial efecto secundario del rechazo al aloinjerto, pero conservando las propiedades de la membrana amniótica, es decir, la facilitación de la epitelización, y la reducción de la inflamación estromal, la cicatrización y la formación de vasos sanguíneos no deseados que están inherentemente presentes *in utero* (2-5).

40

Breve descripción de las figuras

45

La Fig. 1A es una vista en elevación transeccional parcial de un aparato (30) para acoplar por fricción una banda radialmente elástica (24), que muestra un aparato (30) y una banda (24) posicionada sobre el ápice de un expansor de forma cónica (20), y la base del expansor (20) en contacto con un anillo que tiene una ranura anular periférica para recibir a una banda (24) (no de la invención).

50

Las Fig. 1B-1D representan el uso de un aparato (30) para impulsar a una banda (24) en una dirección desde el ápice de un expansor (20) hacia la base de un expansor (20), y hacia dentro de la ranura anular periférica en el anillo (no de la invención).

55

La Fig. 2 es una vista en elevación transeccional parcial de un expansor cónico (20) (no de la invención).

La Fig. 3A es una vista en elevación transeccional parcial de un aparato (30) usado para impulsar a una banda (24) sobre la superficie externa del expansor (no de la invención).

60

La Fig. 3B es una vista en sección transversal de un aparato (30) (no de la invención).

La Fig. 4A representa una vista en elevación de una junta tórica (24) (no de la invención).

- La Fig. 4B es una vista en elevación de un anillo (22) que tiene una ranura anular periférica (23) (no de la invención).
- La Fig. 4C representa un anillo (22) envuelto con una membrana amniótica (35) (no de la invención).
- 5 La Fig. 4D representa un inserto de cultivo que incluye una membrana (35) que recubre un anillo (22), la membrana se asegura por una junta tórica (24) insertada en la ranura anular interna de un anillo (22), con el inserto de cultivo colocado en una placa de cultivo (no de la invención).
- 10 La Fig. 5A representa una junta tórica (25) (no de la invención).
- Las Fig. 5B y 5C representan una junta tórica (25) envuelta con una membrana (35) (no de la invención).
- La Fig. 5D representa una junta tórica (25) envuelta insertada en la ranura anular interna (21) de un anillo (22) para formar un inserto de cultivo, el inserto se muestra colocado en una placa de cultivo (no de la invención).
- 15 Las Fig. 6A y 6B son vistas en perspectiva de unas secciones de dos anillos con broche a presión.
- La Fig. 6C es una vista en perspectiva de los anillos de las Fig. 6A y 6B en acoplamiento de bloqueo entre sí.
- 20 La Fig. 6D es una vista en perspectiva transeccional parcial de los anillos de las Fig. 6A y 6B con una membrana (35) sujeta entre los anillos.
- La Fig. 6E es una ampliación de una sección de la Fig. 6D para mostrar mejor una membrana (35).
- 25 La Fig. 6F es una vista superior en planta de una membrana (35) sujeta entre los anillos de las Fig. 6A y 6B.
- La Fig. 6G es una vista en elevación transeccional parcial de dos anillos con broche a presión, el anillo interno (37) que tiene unas rebabas en la superficie periférica externa del mismo.
- 30 La Fig. 6H es una vista en sección de un anillo interior 37, que tiene unas rebabas en el borde externo del mismo.
- La Fig. 7A es una vista en perspectiva de un anillo con broche a presión (41), que incluye unos agujeros (42) en el mismo para ajustarse sobre unas columnas sujetadoras (40) en un segundo anillo (39) mostrado en la Fig. 7C.
- 35 La Fig. 7B es una vista en perspectiva de un anillo (41) con una membrana (35) envuelta en el mismo.
- La Fig. 7C es una vista pictórica de un anillo con broche a presión (39) que incluye unas columnas sujetadoras separadas (40) en el mismo.
- 40 La Fig. 8A representa una membrana (35) posicionada sobre un anillo (46) con una hendidura cortada (45), la membrana (35) que se empuja hacia la hendidura (45) en la superficie periférica de un anillo (46) (no de la invención).
- La Fig. 8B representa un anillo (46) con una membrana ligeramente adherente (35) empujada o insertada en una hendidura 45, el anillo (46) que se saca de un molde (44) mediante una pinza, (no de la invención).
- 45 La Fig. 8C representa un anillo (46) con una membrana ligeramente adherente (35) que se empuja o inserta en una hendidura 45 (no de la invención).
- La Fig. 8D representa un anillo (46) con una membrana ligeramente adherente (35), un anillo (46) que se rota para envolver el anillo en una membrana amniótica (no de la invención).
- 50 La Fig. 8E representa un anillo (46) envuelto con una membrana (35) (no de la invención).
- La Fig. 9A es una vista en perspectiva de un anillo (48) con unas hendiduras cortadas (50) en la superficie superior del mismo. (no de la invención).
- 55 La Fig. 9B es una vista en sección transversal de una porción de un anillo (48) que muestra una membrana (35) en una hendidura (50) (no de la invención).
- 60 La Fig. 9C es una vista en sección de una porción de un anillo (48) (no de la invención).
- La Fig. 9D es una vista superior en planta de un anillo (48), que muestra una membrana (35) que recubre una porción de un anillo (48), el borde de la membrana (35) que se inserta en las hendiduras (50) (no de la invención).

- La Fig. 10A es una vista transeccional parcial de un anillo con broche a presión externo.
- La Fig. 10B es una vista transeccional parcial de un anillo con broche a presión interno que tiene un borde de agarre (56).
- 5 La Fig. 10C es una vista transeccional parcial de los anillos con broche a presión de las Fig. 10A-10B acoplados con bloqueo.
- La Fig. 10D es una vista superior en planta de un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido con una membrana (35) sujeta entre los anillos con broche a presión de las Fig. 10A y 10B, que muestra cómo la membrana puede posicionarse en la parte superior del recubrimiento.
- 10 La Fig. 11A es una vista pictórica de un soporte (72) con un pegamento (84) añadido a una superficie del mismo (no de la invención).
- 15 La Fig. 11B es una vista pictórica de un soporte (72) con un pegamento (84) en contacto con una membrana (35) posicionada sobre el soporte (72) (no de la invención).
- La Fig. 11C es una vista pictórica de una membrana (35) envuelta sobre un soporte (72) para formar un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido (78) (no de la invención).
- 20 La Fig. 12A es una vista pictórica de un soporte (72) colocado en contacto con una membrana (35) a la que se ha añadido un pegamento (84) (no de la invención).
- 25 La Fig. 12B es una vista pictórica de la membrana (35) que se ha envuelto sobre un soporte (72) para formar un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido (no de la invención).
- La Fig. 13 es una vista en sección de dos porciones de una membrana (35) dobladas sobre un soporte para formar un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie de tejido (90) (no de la invención).
- 30 La Fig. 14A es una vista pictórica de un soporte (96) en contacto con una porción central de un lado estromal (94) de una membrana amniótica (35) (no de la invención).
- La Fig. 14B es una vista en perspectiva de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido (100), que muestra una membrana (35) doblada sobre un soporte (96) de manera que una porción del lado estromal (94) de la membrana (35) se adhiere a otra porción del lado (94), manteniendo así el soporte en su lugar (no de la invención).
- 35 La Fig. 14C es una vista pictórica de un recubrimiento (100), con una junta tórica flexible (102) que se inserta bajo el soporte recubierto (no de la invención).
- 40 La Fig. 14D es una vista en perspectiva de una membrana amniótica (35) posicionada sobre un soporte (96) (no de la invención).
- La Fig. 15A es una vista en perspectiva de una membrana amniótica (35) que se envuelve alrededor de un soporte (no de la invención).
- 45 La Fig. 15B es una vista en perspectiva del soporte envuelto mostrado en la Fig. 15A (no de la invención).
- La Fig. 15C es una vista en perspectiva de una junta tórica flexible (102) que se inserta dentro del soporte del recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido de la Fig. 15B (no de la invención).
- 50 La Fig. 15D es una vista pictórica del recubrimiento para una superficie de tejido que muestra la junta tórica (102) asentada dentro del soporte (no de la invención).
- 55 La Fig. 16A es una vista pictórica de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido que muestra una membrana (35) asegurada sobre un soporte de anillo ranurado (96) con un hilo de sutura (106) (no de la invención).
- La Fig. 16B es una vista pictórica de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido que representa una membrana (35) asegurada sobre un soporte de anillo ranurado (96) con un anillo de fijación (112) y unas suturas (106) (no de la invención).
- 60 La Fig. 17A es una vista en sección parcial de un anillo de soporte hueco (114) que tiene una superficie que define una hendidura (117) (no de la invención).

La Fig. 17B es una vista en perspectiva de un anillo (114), recubierto ligeramente por una membrana (35), con porciones de la membrana (35) presionadas hacia dentro de la hendidura (117) (no de la invención).

La Fig. 17C es una vista pictórica de una grapa (no de la invención).

La Fig. 17D es una vista en perspectiva de un inserto de cultivo que muestra una membrana (35) asegurada sobre un soporte de anillo (114) con unas grapas (118) (no de la invención).

La Fig. 17E es una vista en sección parcial de un anillo (114) recubierto por una membrana (35) asegurada al anillo (114) con una tachuela (120) (no de la invención).

La Fig. 18A es una vista pictórica de un empaque sellado para una membrana congelada en seco (128), el empaque que tiene una solución rehidratante en un compartimiento (126) y la membrana (128) en otro compartimiento (124) (no de la invención).

La Fig. 18B es una vista pictórica del empaque de la Fig. 18A con el sello roto y la membrana 128 posicionada en la solución rehidratante (no de la invención).

La Fig. 19A es una vista pictórica de un soporte (134) moldeado para ajustarse sobre una superficie ocular, el soporte que tiene una composición adhesiva (84), como se describió anteriormente, en contacto con una porción de la superficie periférica externa de un soporte (134), y una membrana (35) posicionada sobre la superficie interna del soporte (134), la membrana (35) que se posiciona para doblarse hacia arriba y sobre la superficie periférica externa del soporte (134), de manera que la membrana (35) está en contacto con el pegamento (84) y se mantiene en su lugar mediante el pegamento (84) (no de la invención).

La Fig. 19B es una vista en elevación del recubrimiento para una superficie ocular mostrado en la Fig. 19A (no de la invención).

La Fig. 20A es una vista superior en planta de otra modalidad de un soporte para un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular, el soporte que tiene una ranura anular, biselada, interior (140), y una superficie (134), y un borde redondeado, exterior (135) en la periferia de la misma (no de la invención).

La Fig. 20B es una vista lateral en elevación transeccional parcial que representa el perfil del soporte mostrado en la Fig. 20A, el soporte que tiene una superficie anular interior inclinada (134) que se acopla con bloqueo a la ranura anular (150) en las Fig. 21A y 21B (no de la invención).

La Fig. 21A es una vista superior en planta de un soporte para un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular, el soporte que tiene una superficie interna cóncava inclinada (146); un borde anular redondeado (148); y una ranura anular (150) que se acopla con bloqueo dentro de la superficie anular inclinada (134) en las Fig. 20A y 20B (no de la invención).

La Fig. 21B es una vista lateral en elevación transeccional parcial que representa el perfil (148) de un soporte para un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular mostrado en la Fig. 21A, y que incorpora una ranura anular (150) en la pared vertical inferior interior (no de la invención).

Descripción detallada de la invención

A continuación se proporciona una descripción de las modalidades preferidas de la invención. Se debe entender que las modalidades particulares de la invención se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. En primer lugar, la invención se describe en sus aspectos generales más amplios, siguiendo con una descripción más detallada. Las características y otros detalles de las composiciones y métodos de la invención se indicarán más adelante en las reivindicaciones.

La presente invención se dirige a un aparato y unos métodos para sujetar una membrana amniótica a un soporte; insertos de cultivo; y recubrimientos para una superficie de tejido.

Una membrana amniótica, como el término se usa en la presente, es una membrana biológica que recubre la superficie interna de la cavidad amniótica y comprende un epitelio simple, cuboidal, una membrana basal densa, y una capa mesenquimal avascular que contiene ácido hialurónico. Generalmente, una membrana adecuada para su uso en una modalidad tiene un espesor de entre aproximadamente 0.001 mm y aproximadamente 1 mm.

Como el término se usa en la presente, un "soporte" es un material sólido en contacto con una membrana o película. Un soporte usado en una modalidad es generalmente inerte. El soporte ayuda a moldear a una membrana o película en

una forma deseada, o ayuda en la retención por la membrana o película de una forma particular. Como el término se usa en la presente, un "inserto de cultivo" es una lámina o membrana a la que se ha añadido al menos una célula o al menos una porción de tejido, la lámina o membrana que se inserta o se coloca en un medio de cultivo.

5 Un "cultivo", como el término se usa en la presente, se refiere al cultivo o al crecimiento de células, por ejemplo, las células de tejido, en o sobre un medio nutritivo. Como es bien conocido para los expertos en la técnica de cultivo de células o tejido, un cultivo de células se inicia generalmente al extraer las células o el tejido de un humano u otro animal, disociar las células mediante su tratamiento con una enzima, y extender una suspensión de las células resultantes en una superficie plana, como la parte inferior de una placa Petri. Allí las células forman generalmente una fina capa de células llamada "monocapa" al producir un material similar a la glicoproteína que provoca que las células se adhieran al plástico o al vidrio de la placa Petri. Una capa del medio de cultivo, que contiene los nutrientes adecuados para el crecimiento celular, se coloca entonces en la parte superior de la monocapa, y el cultivo se incuba para estimular el crecimiento de las células.

15 Cualquiera de varios tipos de células puede expandirse sobre en un inserto de cultivo. Por ejemplo, las células expandidas sobre un inserto de cultivo, que puede usarse después para fabricar un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido de acuerdo con la invención, pueden ser un tipo de célula usado para generar una acción de la terapia génica.

20 La membrana amniótica, preparada de acuerdo con la patente de los Estados Unidos núm. 6,452,142 de Tseng, es un excelente sustrato para la expansión de las células madres epiteliales. Adicionalmente, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido puede incluir células de al menos un tipo que se han expandido sobre la porción de membrana amniótica del recubrimiento. Un método para la expansión de las células madres epiteliales, las células madres limbares y las células epiteliales limbares, extraídas de un ojo sano, se describe en la solicitud del PCT publicada núm. WO 01/80760.

WO 01/80760 enseña el uso de la membrana amniótica (Bio Tissue, Miami, FL), procesada y conservada de acuerdo con el método descrito en la patente de los Estados Unidos núm. 6,452,142 de Tseng, para la expansión de células.

30 En una modalidad de la invención, un soporte sólido con una membrana amniótica sujeta con o sin crioconservación adicional puede usarse como un sustrato, con la superficie de la membrana basal orientada hacia arriba para cultivar un explante limbar con células madres epiteliales que se colocarán en el centro de la membrana con una gota de FBS (suero fetal bovino) durante la noche para permitir una adhesión adecuada, y luego puede cultivarse como se describe en detalle más adelante en un medio adecuado.

35 Las células madres epiteliales, las células madres limbares y las células epiteliales limbares, extraídas de un ojo sano y expandidas sobre una membrana amniótica de un inserto de cultivo de acuerdo con la invención, pueden usarse como agentes terapéuticos en contacto con un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido puesta en contacto con una superficie ocular, y pueden usarse para tratar una enfermedad en la que haya una deficiencia de células madres o de células epiteliales limbares. Por ejemplo, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular puede incluir células madres epiteliales limbares cultivadas y puede usarse como un injerto corneal.

40 En una modalidad de la invención, un soporte sólido con una membrana amniótica sujeta con o sin crioconservación adicional puede usarse como un sustrato, con la superficie de la membrana basal orientada hacia arriba para cultivar células epiteliales pigmentarias de la retina (células RPE), como se enseña en la solicitud provisional de los Estados Unidos con núm. de serie 60/415,986.

45 Las células RPE expandidas y que han crecido sobre un inserto de cultivo de acuerdo con la invención pueden trasplantarse al espacio subretinal de acuerdo con un método enseñado en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/415,986.

Las células RPE expandidas sobre una membrana amniótica pueden usarse para fabricar un recubrimiento biomolecular para una superficie de tejido.

55 En vez de una monocapa, pueden cultivarse las porciones de órganos u órganos enteros. En algunos casos, las porciones de tejido o células extraídas de un animal se colocan en una lámina o membrana, que puede estirarse como la cabeza de un tambor. Después, la lámina o membrana, referida como un "inserto de cultivo", se coloca en un recipiente, tal como una placa Petri, recubierta con un medio de cultivo, y se incuba. Las células cultivadas de esta manera tienden a crecer sobre la lámina o membrana, en lugar de en la parte inferior del recipiente. Los usos de las células cultivadas y la membrana incluyen la ingeniería de tejidos para injertos.

60 En una modalidad la membrana sujeta al soporte es un recubrimiento de tejido. Como se usa en la presente, los términos "recubrimiento de tejido", "recubrimiento para una superficie de tejido", y "recubrimiento" tienen el mismo

significado e incluyen, por ejemplo, un apósito, un vendaje, un paño tal como una lente de contacto de vendaje, una composición o recubrimiento para proteger el tejido, un recubrimiento para evitar adhesiones, para excluir bacterias, para inhibir la actividad bacteriana, o para estimular la curación o el crecimiento del tejido. Como el término se usa en la presente, "tejido" puede incluir cualquier colección de células o grupo integrado de células con una estructura y función comunes, por ejemplo, las células de la piel, el tejido conjuntival, las células epiteliales corneales, el tejido óseo, el tejido del hígado, o el tejido pancreático.

Método y dispositivo para sujetar una membrana a un soporte usando un expansor cónico

Una membrana puede posicionarse sobre un soporte, por ejemplo, un primer anillo, de manera que se recubra completamente el primer anillo con la membrana. Como se representa en las Fig. 1A-1D y la Fig. 2, una banda radialmente elástica (24) se coloca sobre el ápice de un expansor de forma cónica (20) que tiene un ápice (27), una base (28), y una superficie externa de diámetro creciente desde el ápice hacia la base del mismo, la base que tiene un soporte (26). Un expansor de forma cónica adecuado para uso en una modalidad se muestra en las Fig. 1A-1D, y la Fig. 2. La base (28) del expansor se coloca en contacto con un segundo anillo que tiene una ranura anular periférica para recibir a la banda. Véase, por ejemplo, las Fig. 4C y 4D, que muestran un anillo de soporte (22) que tiene una ranura anular periférica (23). La banda (24) se presiona entonces en una dirección desde el ápice (27) del expansor sobre la superficie externa del expansor hacia el soporte (26) de la base (28) del expansor, provocando de esta manera que la banda se estire y forme un estado expandido radialmente. La banda se presiona adicionalmente sobre el soporte (26) del expansor y hacia la ranura anular periférica en el segundo anillo, de manera que la banda se libera de forma controlable desde el expansor y la banda se une al segundo anillo. El segundo anillo que tiene la banda unida al mismo se pone entonces en contacto con la membrana sobre el primer anillo; y la banda se libera de forma controlable desde el segundo anillo de manera que la banda se transfiere desde el segundo anillo hacia el primer anillo, de manera que se sujeta la banda sobre la membrana y se sujeta la membrana al primer anillo.

En una modalidad de la invención, la membrana comprende una membrana amniótica. Los métodos de preparación de membrana amniótica adecuados para su uso en una modalidad de la invención son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo en las patentes de los Estados Unidos números 6,326,019 B1 y 6,152,142 de Tseng. Los métodos de preservación de membrana amniótica se describen además en WO 01/08716 A1.

La membrana amniótica adecuada para su uso en una modalidad de la invención se obtiene a partir de la placenta de mamíferos, especialmente de la placenta humana, de la que se ha separado el corion. La membrana amniótica usada en una modalidad también puede proceder, por ejemplo, de una fuente equina, bovina, o alpaca. La membrana amniótica adecuada para su uso en una modalidad de la invención incluye generalmente una capa epitelial, una membrana basal, y una estroma, la combinación de las tres capas que tiene preferentemente un espesor total de entre aproximadamente 0.05 mm a aproximadamente 0.5 mm. Las láminas de la membrana amniótica pueden cortarse a la medida, montarse sobre un papel de filtro, y almacenarse en una solución de almacenamiento. La solución de almacenamiento comprende un medio de cultivo y un agente hiperosmótico, en donde se mantiene la hidratación de la membrana amniótica. La membrana puede impregnarse con agentes terapéuticos, antes de su almacenamiento o antes de su uso.

En otra modalidad, la membrana es una membrana de biopolímero tal como un derivado de ácido hialurónico o un derivado de colágeno, en donde un extracto bioquímico de la membrana amniótica u otra composición amniótica se une a la superficie de la membrana de biopolímero, o queda atrapado dentro de la membrana de biopolímero.

El anillo que tiene una ranura anular periférica puede componerse de un material polimérico, tal como silicona o espuma de silicona. El anillo puede componerse de metacrilato de polimetilo, politetrafluoroetileno, o poliuretano. El anillo puede también componerse de un material que es un vidrio o una cerámica.

Las Fig. 1A-1D, y la Fig. 2 muestran la impulsión de la banda sobre la superficie externa del expansor que se lleva a cabo mediante las etapas de poner en contacto la banda colocada sobre el ápice (27) del expansor (20) con un aparato mostrado en las Fig. 1A-1D, y en las Fig. 3A y B. El aparato, mostrado en detalle en las Fig. 3A y 3B, de acuerdo con una modalidad incluye una cánula que se extiende longitudinalmente (34) que tiene una porción de extremo proximal y una porción de extremo distal (33), la cánula que define un orificio que se extiende longitudinalmente a través de la misma desde la porción de extremo proximal hasta a la porción de extremo distal, y la cánula que se ajusta coaxialmente sobre el ápice (27) del expansor (20) y que es radialmente expandible en la porción de extremo distal (33). De acuerdo con una modalidad, la banda colocada sobre el expansor (20) se acopla por fricción con la porción de extremo distal (33) de la cánula, y se presiona sobre la superficie externa del expansor (20) al hacer avanzar la cánula hacia la base (28) del expansor (20).

El expansor (20) define un espacio receptor de varilla (29) que tiene un primer diámetro y que se extiende longitudinalmente desde el ápice (27) del expansor al menos parcialmente a través de la base (28) del expansor (Véase la Fig. 2.). Las Fig. 1A y 3A muestran el aparato (30) en una configuración no tensada. La cánula (34) del aparato de la

invención comprende además una varilla (32) que se extiende a través del orificio de la cánula, la varilla que tiene un segundo diámetro que es menor que el primer diámetro, la varilla que se ajusta coaxialmente en el espacio receptor de varilla (29) del expansor para acoplarse por fricción al expansor y actuar como un tope para controlar el movimiento de la cánula cuando la cánula se ajusta coaxialmente sobre el ápice del expansor y se hace avanzar hacia la base del expansor.

La cánula tiene una primera forma, como se muestra en las Fig. 1A y 3A, que es sustancialmente cilíndrica cuando no se somete a una tensión mecánica, y una segunda forma en la que la porción de extremo distal (33) es sustancialmente un reborde radial (como se muestra en las Fig. 1C y 1D) cuando se somete a una tensión mecánica en una dirección perpendicular al eje de la cánula. La segunda forma de la cánula, en la que la porción distal (33) forma una reborde radial, le permite a la cánula avanzar sobre el expansor, y ponerse en contacto de agarre o fricción con una banda elástica (24) colocada sobre el ápice del expansor.

Para lograr la forma de reborde radial, un aparato de acuerdo con una modalidad puede componerse de un material flexible. Un material flexible, como el término se usa en la presente, es una material que puede doblarse o deformarse y es capaz de volver a su forma original en un mayor grado que un material no flexible.

Las Fig. 1A-1D y 3A y B muestran la porción de extremo distal (33) de la cánula del aparato que incluye una pluralidad de segmentos definidos por una pluralidad de hendiduras cortadas longitudinalmente (31) en su interior, los segmentos que tienen una porción de cuerpo y una porción de extremo, y en donde a medida que la cánula se hace avanzar sobre la superficie de dicho expansor hacia la base de dicho expansor los segmentos del mismo se extienden hacia fuera en una dirección radial (como se muestra en las Fig. 1B-D, formando de esta manera el reborde radial, y en donde la porción de extremo de los segmentos es capaz de acoplarse por fricción a la banda radialmente elástica colocada sobre el ápice del expansor.

La expansión de la banda elástica se logra al aplicar una fuerza a una banda que se ha colocado sobre el ápice (27) de un expansor cónico (20), y al presionar la banda sobre la superficie exterior del expansor (20) desde el ápice (27) o extremo de pequeño diámetro hacia la base (28) o extremo de mayor diámetro, la base (28) que tiene un soporte (26), expandiendo de esta manera la banda. La banda se presiona adicionalmente sobre el soporte (26) y hacia una ranura anular periférica en un anillo colocado en contacto con la base (28) del expansor (22). En una modalidad, la banda se empuja manualmente al poner en contacto la banda con una mano, por ejemplo, y al empujar la banda sobre el soporte y hacia la ranura.

En la presente se describe un anillo (22), por ejemplo, el anillo de la Fig. 4B, que tiene una ranura anular periférica (23) y en contacto con la base (28) del expansor (20) se coloca un dispositivo de retención que tiene un borde anular, el borde que es curvado para facilitar una liberación controlada de la banda. En una modalidad, el anillo o dispositivo de retención está equipado con un medio accionador, por ejemplo, un brazo de palanca que puede empujarse hacia arriba contra la banda desde abajo de la banda, proporcionando un espacio entre la banda y el borde del dispositivo de retención. De acuerdo con una modalidad, la banda expandida se mueve entonces a través del espacio de una manera controlada por medio de su propia fuerza elástica almacenada desde el dispositivo de retención hasta un soporte, tal como un inserto de cultivo. Cuando la banda se libera del dispositivo de retención, la banda se transfiere desde el dispositivo de retención hacia el soporte, y una membrana se sujeta al soporte.

Método y dispositivo para sujetar una membrana entre un anillo ranurado y una junta tórica

Las Fig. 4A-Fig. 4D muestran un dispositivo y un método para preparar el dispositivo que comprende sujetar una membrana a un anillo (22) que tiene una superficie interna que define un agujero y que tiene al menos una ranura anular (23) dimensionada para recibir a una junta tórica. El dispositivo se forma mediante un método que incluye las etapas de poner en contacto la membrana a sujetar con el anillo (22); posicionar la membrana (35) sobre el anillo (22), de manera que se recubra completamente el anillo (22) con la membrana; e insertar la junta tórica (24) en la ranura anular, de manera que se sujete la membrana al anillo. En consecuencia, un compuesto de la invención es un inserto de cultivo que incluye un anillo (22) que tiene una superficie interna que define un agujero y que tiene al menos una ranura anular (23) dimensionada para recibir a una junta tórica (24); una membrana (35) montada en el anillo (22), la membrana (35) que recubre completamente el anillo (22); y la junta tórica (24) que se inserta en la ranura anular (23) para sujetar la membrana al anillo (22) durante el montaje.

En la presente se describe un método y un dispositivo mostrado en las Fig. 5A-Fig. 5D, una junta tórica (25) se recubre primeramente con la membrana (35). Como tal, otra modalidad de la invención es un método de sujeción de una membrana entre una junta tórica (25) que tiene una superficie anular periférica externa y un anillo (22) que tiene una superficie anular interna que define un agujero y que tiene al menos una ranura anular (21), el método que incluye las etapas de poner en contacto la membrana a sujetar con la junta tórica (25); posicionar la membrana (35) sobre la junta tórica (25), de manera que se recubra completamente la junta tórica (25) con la membrana (35); envolver la membrana (Véase la Fig. 5B) sobre la superficie anular periférica externa de la junta tórica (25) para formar una junta tórica

envuelta (Véase la Fig 5C.); e insertar la junta tórica envuelta en la ranura anular (21) (véase la Fig. 5D.), de manera que se fije la membrana (35) entre la junta tórica (25) y el anillo (22). El dispositivo formado de acuerdo con una modalidad de la invención es un inserto de cultivo, y puede colocarse en una placa de cultivo, como se muestra en la Fig. 5D.

La membrana puede comprender una membrana amniótica. En otra modalidad, la membrana es un derivado de ácido hialurónico, colágeno o un derivado de colágeno, o un material formado a partir de policarbonato, tereftalato de polietileno, poliéster o estireno-acrilonitrilo. Una membrana y un soporte usados en una modalidad comprenden uno o más materiales biocompatibles. "Biocompatible", como se usa el término en la presente, se refiere a un material que no tiene efectos tóxicos o perjudiciales médicamente inaceptables sobre una función biológica.

La Fig. 4B muestra que la ranura anular (23) se localiza en la periferia del anillo. Como se muestra en la Fig. 5D la ranura anular (21) se localiza en la superficie anular interna del anillo. Pueden haber dos ranuras anulares.

En aún otra modalidad (que se muestra en las Fig. 6A-6F) la membrana (35) puede unirse a un soporte al colocar la membrana (35) sobre un anillo de soporte inferior mostrado en la Fig. 6B y, después, comprimir o intercalar la membrana (35) entre el anillo de la Fig. 6B y el anillo de la Fig. 6A, presionando juntos los anillos, los anillos que tienen un ajuste con broche a presión, como se muestra en las Fig. 6C - 6F. Como el término se usa en la presente, un "ajuste con broche a presión" se refiere al ajuste de un primer anillo (Fig. 6B) con un segundo anillo concéntrico (6A), en donde los dos anillos pueden unirse entre sí por medio de un borde anular periférico del primer anillo (Fig. 6B) que se acopla con bloqueo a un borde anular interno del segundo anillo (Fig. 6A), como se representa en 6C. Tal como se usa en la presente, el término "anillos con broche a presión" se refiere a dos anillos concéntricos que tienen un ajuste con broche a presión. Por ejemplo, la Fig. 6D es una vista en sección en perspectiva de dos anillos con broche a presión que comprenden un soporte para una modalidad de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido tal como una superficie ocular. El recubrimiento, una membrana amniótica (35) sujeta entre dos anillos con broche a presión, se muestra como la vista superior en planta de la Fig. 6F, y puede usarse como un vendaje o apósito para las quemaduras químicas o térmicas en el ojo. La Fig. 6D, una vista de sección completa del recubrimiento, muestra la membrana amniótica (35) sujeta entre los anillos con broche a presión de las Fig. 6A-6C.

La Fig. 6G es una vista lateral en sección transversal parcial de dos anillos con broche a presión, en donde el anillo interior (37) tiene unas rebabas (38) en los bordes externos del mismo. Las rebabas (38) y la costura (40) pueden usarse para ayudar a mantener a la membrana en su lugar entre el anillo interior (37) y el anillo exterior (43). La Fig. 6H es una vista en perspectiva en sección del anillo con broche a presión interior de la Fig. 6G, que muestra las rebabas (38) a lo largo del borde exterior del mismo.

Uso de miembros soporte que tienen columnas sujetadoras y aberturas de las columnas sujetadoras

En la presente se describe un dispositivo y un método que usa un sistema de sujeción que permite la unión de una membrana a dos miembros de soporte, por ejemplo, dos anillos, sin la necesidad de implementos o pegamento. Los sujetadores, que pueden ser continuos con el cuerpo de los miembros de soporte, comprenden dos miembros, una columna sujetadora, que también se refiere como un " pasador macho con broche a presión", y una abertura de la columna sujetadora, que sirve como un receptor para la columna sujetadora. La abertura de la columna sujetadora se refiere además como un "agujero hembra con broche a presión". Las columnas sujetadoras definen puntas o zonas salientes sobre la superficie de una de las piezas de soporte o los anillos con broche a presión. Las aberturas de las columnas sujetadoras sobre la superficie de una de las piezas de soporte se separan y configuran para corresponderse o acoplarse con bloqueo con las columnas sujetadoras. De acuerdo con una modalidad ilustrada en las Fig. 7A-7C, una membrana se sujeta entre un primer anillo con broche a presión (39) (Fig. 7C) y un segundo anillo con broche a presión (41) (Fig. 7A). De acuerdo con una modalidad, el primer anillo con broche a presión (39) incluye una superficie que comprende una pluralidad de columnas sujetadoras separadas (40), y el segundo anillo con broche a presión (41) incluye una superficie que define una pluralidad de aberturas de las columnas sujetadoras separadas (42). En otra modalidad, cada uno del primer y segundo anillos con broche a presión comprende una superficie que incluye unas columnas sujetadoras separadas entre unas aberturas de las columnas sujetadoras.

El montaje de un inserto de cultivo o de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie de tejido usando una membrana amniótica y dos soportes o anillos de acuerdo con una modalidad se logra fácilmente, y la membrana amniótica y los soportes requeridos para fabricar un inserto de cultivo o un recubrimiento para una superficie de tejido suministrarse como componentes de un estuche de acuerdo con una modalidad. El acoplamiento de interbloqueo de los soportes que tienen columnas sujetadoras acopladas con las aberturas de las columnas sujetadoras es seguro, ya que se requiere una fuerza considerable para separar las columnas sujetadoras de las aberturas de las columnas sujetadoras.

Los soportes o anillos pueden fabricarse, de acuerdo con una modalidad particular, a partir de un material flexible. Un material flexible, como el término se usa en la presente, es un material que puede doblarse o deformarse y capaz de

volver a su forma original en un mayor grado que un material no flexible. Una modalidad incluye, por ejemplo, un soporte compuesto por un polímero tal como polietileno, vinilo, un plástico y un material Silastic.

5 El método incluye las etapas de poner en contacto la membrana (35) a sujetar con la superficie del primer anillo (39);
 10 posicionar la membrana sobre el primer anillo (39), de manera que se recubra completamente el primer anillo (39) con la
 membrana, como se representa en la Fig. 7B; posicionar el segundo anillo (41) sobre el primer anillo (39) para la
 alineación de al menos una de las columnas sujetadoras separadas (40) con al menos una de las aberturas de las
 15 columnas sujetadoras separadas (42); y acoplar con bloqueo el primer anillo (39) con el segundo anillo (41), mediante la
 inserción de al menos una de las columnas (40) en una abertura de la columna sujetadora (42), de manera que se
 sujete la membrana entre el primer anillo (39) y el segundo anillo (41). De acuerdo con una modalidad, la membrana
 amniótica recubre la parte exterior de uno o ambos lados de los anillos con broche a presión. La membrana también se
 envuelve alrededor de los anillos con broche a presión de manera que quedará sujeta entre los dos anillos y sobre los
 bordes de los anillos. En una modalidad particular, la membrana amniótica (35), tiene unos agujeros separados para
 ajustarse sobre las columnas sujetadoras en el anillo (39).

20 En consecuencia, un compuesto de la invención es un inserto de cultivo o un recubrimiento de membrana amniótica
 para una superficie de tejido que incluye un primer anillo con broche a presión que tiene una primera superficie; una
 pluralidad de columnas sujetadoras separadas localizadas sobre la primera superficie; un segundo anillo con broche a
 presión que tiene una segunda superficie que define una pluralidad de aberturas de las columnas sujetadoras
 separadas sobre la misma, en donde al menos una de las aberturas se separa para alinearse con una posición de al
 menos una de las columnas cuando los dos anillos se acoplan durante el montaje; y una membrana que se sujeta entre
 los dos anillos con broche a presión.

25 Uso de un soporte que tiene una hendidura cortada

30 En la presente se describe y se ilustra en las Fig. 8A-8E, y en las Fig. 9A-9D, un dispositivo y un método para preparar
 el dispositivo que comprende la sujeción de una membrana a un anillo (46) que tiene una superficie anular periférica,
 una superficie anular interna, una superficie superior y una superficie inferior, con al menos una superficie que define al
 menos una hendidura cortada (45) sobre la misma. Como se representa en la Fig. 8A, el método incluye las etapas de
 poner en contacto la membrana a sujetar con el anillo (46); posicionar la membrana (35) sobre la superficie superior o la
 superficie inferior del anillo (46), de manera que se recubra el anillo (46) con la membrana (35); e insertar la membrana
 (35) en las hendiduras cortadas (45), de manera que se sujete la membrana (35) al anillo (46). De acuerdo con una
 modalidad particular, la membrana se inserta en al menos una hendidura cortada sobre la superficie superior o la
 superficie inferior. En otra modalidad, la membrana se inserta en una hendidura cortada sobre la superficie anular
 35 periférica.

40 La Fig. 8B muestra el anillo (46) con la membrana ligeramente adherente (35) que se saca del molde (44) mediante el
 uso de una pinza. La Fig. 8C muestra el anillo (46), con una membrana ligeramente adherente, que se rota con el fin de
 envolver la membrana (35) alrededor del anillo (46) y recubrir el anillo (46). Alternativamente, la etapa ilustrada en la Fig.
 8D puede llevarse a cabo al colocar el anillo con la membrana recubriéndolo sobre una placa, empujando los lados
 opuestos del anillo con una sonda para rotar el anillo. El anillo se volteará y se recubrirá con la membrana, como se
 muestra en la Fig. 8E.

45 El dispositivo fabricado mediante la inserción de una membrana amniótica en una hendidura sobre un soporte puede ser
 un inserto de cultivo. El dispositivo así fabricado puede ser también un recubrimiento para una superficie de tejido.

50 Las Fig. 9A-9D muestran un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido en el que una membrana
 amniótica (35) se inserta en las hendiduras (50) sobre la superficie superior o inferior de uno de los anillos (48). La Fig.
 9D muestra que la membrana (35) se estira sobre el anillo (48). Si se usa una porción suficientemente grande de la
 membrana, el anillo (48) se envuelve completamente con la membrana (35) al rotar el anillo (48).

Envoltura de un anillo con una membrana y ajuste con broche a presión del anillo envuelto dentro de un segundo anillo

55 De acuerdo con la invención un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido, fabricado mediante las
 etapas de poner en contacto una membrana amniótica con la superficie de un primer anillo que tiene un borde anular
 externo y un diámetro exterior dimensionado para el ajuste con broche a presión dentro del diámetro interior de un
 segundo anillo que tiene un borde anular interno; posicionar la membrana sobre el primer anillo, de manera que se
 recubra completamente el primer anillo con la membrana y que se envuelva la membrana sobre el borde anular externo
 60 del primer anillo; posicionar el segundo anillo sobre el primer anillo para la alineación coaxial con él; y acoplar con
 bloqueo el primer anillo con el segundo anillo, de manera que se sujete la membrana entre el primer anillo y el segundo
 anillo, y se fabrique un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido o un inserto de cultivo.

Membrana amniótica que Incluye células unidas a la misma

5 En una modalidad de la invención, una membrana amniótica sujeta entre el primer anillo y el segundo anillo es un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido. Como los términos se usan en la presente, un "recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido", un "recubrimiento de biopolímero", o un "recubrimiento" incluyen, por ejemplo, un apósito, un vendaje, un paño tal como una lente de contacto de vendaje, una composición o recubrimiento para proteger el tejido, un recubrimiento para evitar adhesiones, para excluir bacterias, para inhibir la actividad bacteriana, o para estimular la curación o el crecimiento del tejido.

10 Una membrana amniótica sujeta entre el primer anillo y el segundo anillo puede ser un inserto de cultivo. Una membrana de biopolímero de un recubrimiento para una superficie de tejido, una membrana de biopolímero de un inserto de cultivo, o de cualquier otro dispositivo, puede incluir una o más células. Las células pueden crecer sobre la membrana o unirse a la membrana antes de que la membrana se ponga en contacto con, o se una a, la superficie del primer anillo. Las células también pueden crecer sobre, o unirse a, la membrana después de que la membrana se sujeta entre el primer y el segundo anillos.

Las células que han crecido sobre la membrana pueden ser cualquier tipo de células, por ejemplo, células madres epiteliales, células epiteliales pigmentarias de la retina, células madres limbares, y células epiteliales limbares.

20 Un recubrimiento puede ser utilizado como un andamio o matriz para la ingeniería de tejidos *in vitro* o *in vivo*. Los métodos de cultivo de células *in vitro* son bien conocidos para los expertos en la técnica de cultivo de tejidos. Por ejemplo, una membrana amniótica sujeta a un inserto de cultivo o a un anillo de silicona puede usarse primeramente en un cultivo para el crecimiento de células o la ingeniería de tejidos, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Después, la membrana amniótica con una o más células unidas a la misma puede usarse para fabricar un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido. La fuente de las células unidas a la membrana amniótica puede ser un tejido de una biopsia tomada de un sitio sano correspondiente biológicamente e histocompatible con el sitio receptor.

25 Como se describió anteriormente, las composiciones amnióticas se conocen por estimular la curación, reducir la inflamación y el crecimiento fibrovascular hacia adentro, y por facilitar la epitelización en modelos animales. Como tal, el recubrimiento que contiene la membrana amniótica, cuando se coloca sobre una superficie de tejido dañado y se le permite permanecer hasta que ocurre una mejora notable, puede ayudar a curar o hacer crecer un tejido nuevo.

30 En otra modalidad, el recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido incluye una o más células, modificadas para la terapia génica, unidas a la membrana. En una modalidad, la membrana incluye células que incorporan un material genético tal como, por ejemplo, genes o antisentido. De acuerdo con una modalidad, el recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido con una o más células unidas a la membrana puede usarse como un injerto e implantarse en un sitio de tejido objetivo. El injerto o implante que incorpora el material genético puede usarse por lo tanto para la terapia génica.

40 Recubrimientos de biopolímero que se ajustan a los contornos de una superficie de tejido del cuerpo

45 El recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido puede modificarse para estirar la membrana amniótica o para hacer que los anillos de soporte se ajusten a los contornos de una superficie de tejido del cuerpo. Por ejemplo, el primer anillo y el segundo anillo se dimensionan y contornean para su colocación sobre una superficie externa de un ojo.

50 Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 19A, un soporte puede ser un anillo conformador con una superficie contorneada a la superficie ocular. Similarmente, la Fig. 20A representa un anillo conformador que tiene una superficie inclinada (140) que abrocha a presión con la ranura (150) del anillo conformador mostrado en la Fig. 21A, asegurando entre los anillos una membrana que se coloca previamente sobre la superficie (146) del anillo de la Fig. 21A. La manera en que los dos anillos se ajustan firmemente entre sí se entiende mejor a partir de una comparación de la Fig. 20B con la Fig. 21B. Cada uno de los anillos puede, independientemente, ser de forma circular o elíptica. Los anillos en las Fig. 20A y 21A son flexibles y pueden estirarse para llevar a cabo el bloqueo entre sí, incluso si ambos anillos no tienen la misma forma. El soporte representado en 21A puede moldearse como un conformador tal como, por ejemplo, el soporte mostrado en la Fig. 19A.

55 En otra modalidad, la membrana de biopolímero, el primer anillo, y el segundo anillo se dimensionan para su colocación sobre una superficie de tejido que es un tejido dérmico, un tejido del tracto gastrointestinal, un tejido del tracto respiratorio, un tejido del sistema genital, un tejido del sistema urinario, un tejido del sistema circulatorio, o un tejido óseo.

Soporte biodegradable y liberación controlada de fármaco

De acuerdo con una modalidad, el primer anillo y el segundo anillo son biodegradables. De acuerdo con otra modalidad, ya sea el primer anillo o el segundo anillo es biodegradable. Una "sustancia biodegradable", como ese término se usa en la presente, es una que es capaz de descomponerse mediante procesos biológicos naturales. En una modalidad particular de la invención, si el soporte en un recubrimiento de biopolímero es biodegradable, y si el recubrimiento se usa como un implante quirúrgico, el soporte se desintegraría y disolvería o se absorbería, eliminando la necesidad de extraer quirúrgicamente el implante.

En una modalidad, al menos uno de los soportes o anillos en un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido incluye una molécula bioactiva, que puede ser una sustancia farmacéuticamente activa o terapéutica tal como un fármaco. Como el término se usa en la presente, "molécula bioactiva" incluye las sustancias que son capaces de provocar efectos específicos o reacciones en el tejido objetivo o en los organismos. Si el soporte es biodegradable, la molécula farmacéuticamente activa o fármaco se libera lentamente a medida que el soporte se desintegra. La velocidad de degradación de un soporte dado, y la velocidad de la liberación concomitante de una sustancia terapéutica incluida en el soporte, es predecible cuando un soporte fabricado de un material con una velocidad de degradación conocida, adecuada, se usa en una modalidad de un recubrimiento para una superficie de tejido. Por lo tanto, un recubrimiento de biopolímero para una superficie de tejido de acuerdo con esta modalidad es un vehículo de suministro de liberación controlada para una sustancia terapéutica.

Cualquier sustancia que tiene actividad biológica o farmacéutica y que normalmente se considera un fármaco puede usarse como el componente farmacéutico en una modalidad de la invención. Las sustancias farmacéuticamente activas adecuadas para el uso en una modalidad incluyen, pero sin limitarse a, células, analitos, factores de crecimiento, enzimas, fármacos terapéuticos, biopolímeros, antimicrobianos, y agentes desodorantes.

Un "fármaco terapéutico," "agente terapéutico," o "sustancia terapéutica," como se usan en la presente esos términos, incluyen, por ejemplo: compuestos y composiciones reconocidos en la Farmacopea oficial de los Estados Unidos, la Farmacopea Homeopática oficial de los Estados Unidos, o el Formulario Nacional oficial, o cualquier complemento de cualquiera de ellos; compuestos y composiciones destinadas para el uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de enfermedades en el hombre u otros animales; y compuestos y composiciones (distintas a alimentos) destinadas a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre u otros animales.

Los ejemplos de clases de fármacos terapéuticos incluyen fármacos antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales, hormonas y cualquier análogo sintético y fragmentos farmacéuticamente activos de estos. Los fármacos terapéuticos que son adecuados para el uso en modalidades de la invención pueden ser solubles en grasas, solubles en agua, aniónicos o catiónicos, siempre y cuando puedan dispersarse dentro de o sobre la membrana o el soporte, o interactúen con un grupo sobre la membrana o el soporte para formar enlaces covalentes o iónicos o interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas.

El sistema de suministro de la invención es muy adecuado para administrar factores de crecimiento (por ejemplo, interleucinas, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y citocinas), agentes anticonceptivos esteroidales y no esteroidales, antibióticos, analgésicos, sedantes, barbitúricos, aminoalquilbencenos, catecolaminas, narcóticos, antagonistas de narcóticos, agentes antineoplásicos y anticoagulantes.

Un vehículo de suministro de fármaco de liberación controlada, tal como, por ejemplo, un recubrimiento para una superficie tisular de acuerdo con una modalidad de la invención, que incluye una membrana o un soporte biodegradable que incluye, además, un agente terapéutico, puede proporcionar el nivel adecuado de biodisponibilidad de un agente terapéutico en la zona afectada para lograr un resultado clínico deseado. La biodisponibilidad de un fármaco depende de la naturaleza del fármaco, el vehículo de suministro de fármaco usado, y la vía de suministro, por ejemplo, oral, tópica, transdérmica, mucosal, administración por inyección, administración por inhalación, o administración mediante una combinación de dos o más de estas vías. La biodisponibilidad puede ser baja como resultado de, por ejemplo, la degradación del fármaco por el ácido estomacal, la eliminación del tracto gastrointestinal, o la alta solubilidad en agua del fármaco. Como resultado, puede requerirse la administración frecuente, y la cantidad de fármaco suministrado con cada administración puede ser alta, lo que conduce a un aumento en la aparición de efectos secundarios perjudiciales. Un vehículo de suministro de fármaco de liberación controlada puede aliviar algunos de los problemas mencionados anteriormente.

Por ejemplo, en una modalidad de la invención, un fármaco tal como ciclosporina A, que tiene efectos sistémicos perjudiciales severos, si se toma internamente, puede administrarse al incorporarse en la membrana amniótica o el anillo biodegradable de un recubrimiento de biopolímero para una superficie ocular, y suministrarse en forma tópica, lo que minimiza de ese modo la absorción por el cuerpo y los perjuicios resultantes a los órganos internos.

Anillos de Cierre a Presión que Tienen Superficies de Agarre de Acuerdo con Otra Modalidad

Además de una modalidad de la invención que incluye un anillo de soporte que tiene una zona que define postes de fijación y aberturas para postes de fijación, como se describió anteriormente, otros tipos de superficies de agarre en las dos piezas de soporte se usan en otras modalidades. Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 10A-10C, una modalidad de la invención es un dispositivo útil como un recubrimiento de biopolímero para una superficie tisular o como un inserto de cultivo. El dispositivo, mostrado en la Figura 10D con membrana (35) intercalada entre los anillos de cierre a presión, incluye anillos de cierre a presión (54, 58), en donde el borde anular externo (56) del anillo interno (54) incluye una primera superficie de agarre (56) y el borde anular interno (60) del anillo externo (58) incluye una segunda superficie de agarre (60). Como se muestra en una vista superior en planta del recubrimiento en la Figura 10D, una membrana tal como una membrana amniótica (35) se asegura al sujetarse entre las dos superficies de agarre de los anillos 54 y 58. En una modalidad particular, de la que se muestra una vista en perspectiva en sección parcial en las Figuras 10A-10C, un ajuste seguro de cierre a presión del anillo externo y el anillo interno se logra al estrechar o doblar el borde anular interno (66) del anillo (64) a, por ejemplo, 90° o más, y el borde (70) del anillo (68) a 90° o menos, de manera que los bordes (66 y 70) que se ponen en contacto entre sí, se agarran, y se acoplan por bloqueo entre sí. En otra modalidad de la invención, las superficies de agarre incluyen un dispositivo de agarre que es una fresa.

Uso de Adhesivo para Fijar Membrana Amniótica a un Soporte

En la presente se describen un método y una composición, como se muestra en las Figuras 11-12, por ejemplo, donde una membrana se pega a un soporte. De acuerdo con una modalidad mostrada en la Figura 11A, a al menos una superficie de un anillo de soporte (72) que tiene bordes lisos se le añade una composición adhesiva (84). A continuación, como se muestra en la Figura 11B, la composición adhesiva (84) en la superficie de soporte (72) se pone en contacto con una membrana amniótica (35), membrana (35) que tiene una superficie con un diámetro mayor que el diámetro exterior del soporte (72). El soporte (72) se coloca sobre la membrana (35) de tal manera que la membrana (76) puede plegarse hacia dentro sobre el soporte (72). Después la membrana (35) se pliega sobre el soporte (72), como se muestra en la Figura 11C, de tal manera que la membrana (35) cubre el soporte (72) y este se adhiere a la membrana (35) por medio de la composición adhesiva (84), lo que de esta manera produce un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular (78). En una modalidad del recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular el soporte es un anillo. El soporte puede ser un disco. El soporte puede ser un conformador, tal como (134) en la Figura 19A. Un recubrimiento de dos capas puede formarse al repetir las etapas descritas anteriormente, colocar una segunda pieza de membrana amniótica debajo de un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular y plegarla sobre el recubrimiento.

La composición adhesiva puede comprender un sellador de fibrina (conocido también como "pegamento de fibrina") que incluye fibrinógeno.

La composición adhesiva puede comprender sinoacralato, conocido químicamente como ácido 2-ciano-3t-(2) furil-acrílico. Un "sellador de fibrina," como se usa el término en la presente, es un adhesivo de tejidos usado durante procedimientos quirúrgicos para controlar la hemorragia y sellar tejidos. Un sellador de fibrina contiene dos factores de coagulación de la sangre, fibrinógeno y trombina, de plasma humano. Un sellador de fibrina inactivado de forma viral adecuado para el uso en una modalidad de la invención se vende bajo el nombre comercial TISSEEL® (Immuno, Aktiengesellschaft für Chemischmedizinische Produkte Corporation, Austria), disponible de Baxter Healthcare Corporation (Glendale, CA). Otro sellador de fibrina inactivado de forma viral adecuado para el uso en una modalidad está disponible de Vitex Technologies, Inc. (Nueva York, NY).

En la presente se describen una composición y un método para preparar la composición, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular en donde la membrana se fija al soporte por medio de una composición adhesiva, se muestra en las Figuras 12A y 12B. De acuerdo con una modalidad del método, un soporte de anillo (72) se coloca en una porción central de membrana amniótica (35), que tiene una superficie con un diámetro mayor que el diámetro exterior del soporte (72). Una composición adhesiva (84) tal como un sellador de fibrina descrito anteriormente se añade a una porción de una superficie de membrana (35) que se extiende más allá del diámetro exterior del soporte (72). Después la porción del borde externo de la membrana (35) que tiene adhesivo (84) sobre ella se pliega hacia dentro sobre el soporte (72), como se muestra en la Figura 12B, de tal manera que la membrana (35) cubre el soporte (72), y la porción de una superficie de la membrana que tiene composición adhesiva sobre ella se pega a otra porción de la membrana, lo que de esta manera produce un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular. En una modalidad el soporte es un anillo; en otra modalidad el soporte es un disco. En una modalidad la composición adhesiva es un sellador de fibrina o sinoacralato.

En la presente se describe un método para preparar un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular en donde la membrana se fija al soporte por medio de una composición adhesiva como se describió anteriormente, que incluye etapas adicionales para fabricar un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie tisular (90), como se muestra en la vista en perspectiva en sección de la Figura 13. La primera pieza de membrana amniótica (35) que cubre el anillo (80) es visible en la vista en sección. En esta modalidad, una segunda

pieza de membrana amniótica (86) se pliega sobre un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular para formar una cavidad (92) que puede contener una sustancia terapéutica. El método incluye las etapas adicionales de colocar el recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular en una porción central de una segunda membrana amniótica (86) que tiene una superficie con un diámetro mayor que el diámetro exterior del recubrimiento de membrana amniótica; aplicar una composición adhesiva a una porción de la superficie de la segunda membrana amniótica (86) que se extiende más allá del diámetro exterior del recubrimiento de membrana amniótica; y plegar la segunda membrana amniótica (86) hacia dentro sobre el recubrimiento de membrana amniótica de tal manera que la segunda membrana amniótica (86) cubra al recubrimiento de membrana amniótica, lo que de esta manera produce un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie tisular (90).

De acuerdo con una modalidad, la membrana amniótica puede unirse a cada uno de los dos anillos de soporte que tienen un ajuste de cierre a presión, lo que de esta manera produce un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie tisular. Por ejemplo, la membrana amniótica puede unirse a cada uno de los anillos de soporte mostrados en las Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, y 12 y al soporte mostrado en la Figura 20A, lo que de esta manera produce un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie tisular. De acuerdo con una modalidad, un recubrimiento de membrana amniótica con o sin una cavidad puede tener una perforación para permitir que el aire atrapado escape cuando el recubrimiento se aplica a una superficie tisular. Una modalidad de un recubrimiento de membrana amniótica de dos capas para una superficie tisular incluye uno o más agentes terapéuticos en el espacio o cavidad formada entre las dos capas de membrana.

Uso del Lado Estromal "Pegajoso" de la Membrana Amniótica para Asegurar la Membrana en un Soporte

Como se describió anteriormente, la membrana amniótica tiene dos lados: una membrana basal gruesa y un estroma avascular. El lado estromal de la membrana amniótica puede distinguirse del lado de la membrana basal al tocarlo con una esponja, tal como una esponja WECK-CEL® (Edward Weck, Incorporated, Princeton, NJ). El lado estromal es pegajoso y se adherirá a la esponja. La naturaleza adhesiva del lado estromal de la membrana amniótica puede emplearse para producir un compuesto de acuerdo con otra modalidad de la invención, como se muestra en las Figuras 14A y B. En esta modalidad, un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular (100) incluye un soporte (96) que tiene un diámetro exterior; una membrana amniótica (35) que tiene una superficie con un diámetro mayor que el diámetro exterior del soporte (96), y que tiene un lado estromal (94); el soporte (96) se coloca en una porción central del lado estromal (94) de la membrana (35), la membrana (35) se pliega hacia dentro sobre el soporte (96) durante el ensamble de tal manera que la membrana (35) cubra el soporte (96), y una porción del lado estromal (94) de la membrana plegada se adhiere a otra porción del lado estromal (94) de la membrana (35), debido a la adhesividad del estroma, que de esta manera sostiene el soporte (96) en su lugar y produce un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular. En la Figura 14B, el lado no estromal (98) es visible cuando la membrana amniótica se pliega hacia arriba sobre el soporte (96). De acuerdo con una modalidad el soporte es un anillo o un disco o un conformador.

Como se muestra en la Figura 14C, de acuerdo con otra modalidad, un segundo soporte (102) se inserta sobre el soporte recubierto, y el segundo soporte (102) se coloca para ponerse en contacto al menos con una porción de la membrana amniótica que cubre el soporte, lo que de esta manera asegura la membrana amniótica entre el soporte recubierto y el segundo soporte (102).

Las Figuras 15A-B y 15C-D son representaciones alternativas de la modalidad mostrada en la Figura 14.

Uso de un Anillo de Sujeción para Asegurar una Membrana

Las Figuras 16A-16B representan un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular o un inserto de cultivo. La Figura 16A muestra una membrana amniótica (35) colocada sobre el anillo de soporte (96) que incluye una ranura anular, periférica; una hebra de sutura (106) colocada en la ranura, y atada con un nudo (108) alrededor de la membrana (35) para asegurar la membrana (35) al soporte (96). El anillo de soporte no tiene una ranura anular, periférica. La membrana se sutura directamente al soporte.

La Figura 16B muestra un anillo de sujeción (112) colocado en la ranura del anillo de soporte (110) y sujetado en su lugar. Muchos tipos de anillos de sujeción son adecuados para el uso siempre y cuando tengan superficies lisas que no tiendan a rasgar la membrana. Una membrana amniótica (35) que tiene un diámetro mayor que el diámetro exterior del anillo de soporte (96) se coloca después sobre el anillo de sujeción (112). Después la membrana (35) se estira entre las mordazas (112) en el anillo (96) con una hebra de sutura (106), lo que de esta manera asegura la membrana (35) al anillo de soporte (110). La hebra de sutura (106) puede atarse en su lugar, y puede retirarse al tirar de un extremo de la hebra. En una modalidad alternativa, la membrana amniótica (35) se coloca sobre el anillo de soporte (96) antes de unir el anillo de sujeción (112). Después se coloca el anillo de sujeción (112) sobre la membrana (35) y en la ranura del anillo de soporte (96) y se sujeta en su lugar, lo que de esta manera asegura la membrana (35) al anillo de soporte (96).

Uso de Hendiduras en el Soporte, Presillas, o Tachuelas para Asegurar una Membrana

5 Las Figuras 17A y B muestran la superficie de un anillo de soporte (114) que se pone en contacto con una membrana amniótica (35) que define una hendidura (117) o cavidad. La Figura 17A es una vista en perspectiva en sección de una porción del anillo (114). La membrana amniótica (35) se coloca sobre el anillo (114), y se usa un vacío para estirar la membrana (35) hacia la hendidura (117). Alternativamente, la membrana (35) se empuja hacia la hendidura (117).

10 Como se muestra en la Figura 17D, se usa una presilla (118) para asegurar la membrana (116) al anillo de soporte (114). La presilla (118) puede ser ondulada para sostener la membrana (116) de forma más segura sobre el anillo de soporte (114). Las presillas (118) se fabrican de materiales biocompatibles tales como, por ejemplo, plástico, acero inoxidable, platino, u oro.

15 La Figura 17E muestra una tachuela (120) con una punta de rebabas, la punta fabricada de un material biocompatible, se usa para perforar la membrana (35) y el anillo de soporte (114), lo que asegura la membrana (35) al anillo de soporte (114).

Uso de un Recubrimiento de Biopolímero para una Superficie Tisular para Tratar un Tejido Objetivo

20 Un recubrimiento de biopolímero para una superficie tisular, tal como un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular de acuerdo con una modalidad de la invención puede colocarse sobre un tejido objetivo para el tratamiento terapéutico del tejido. El recubrimiento de acuerdo con una modalidad se deja permanecer en su lugar sobre el tejido durante un período de tiempo suficiente para producir una mejoría notable en la afección del tejido. La invención proporciona un compuesto y un método para tratar tejido, y aliviar el dolor, reducir la inflamación, la hinchazón, y la formación de cicatrices, acelerar la curación de las quemaduras y heridas, y de cualquier otra manera tratar tejido enfermo o lesionado, al aplicar a la superficie del tejido afectado un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular.

30 El estroma de la membrana amniótica contiene factores de crecimiento, proteínas antiangiogénicas y antiinflamatorias, así como también inhibidores naturales de varias proteasas. Estos factores difunden fuera de la membrana amniótica colocada en contacto con una superficie tisular, y parecen acelerar el proceso de curación. La córnea, por ejemplo, se considera que está "curada" al menos parcialmente cuando se ha reepitelizado. Por lo tanto, una modalidad de un recubrimiento tisular de la invención puede usarse como un apósito sobre heridas de la piel, para la reconstrucción de la superficie ocular, para tratar un defecto del epitelio de la córnea o una úlcera estromal, y puede implantarse en el sitio de un tejido objetivo para evitar la adhesión en cirugías o para reconstruir tejidos blandos.

35 Un recubrimiento tisular puede impregnarse con células cultivadas sobre el mismo o unidas a él, y usarse como un andamio para la reconstrucción de tejido *in vivo* o para la terapia génica. Las sustancias terapéuticas, como se describió anteriormente, pueden incluirse en la membrana o en el soporte, en particular un soporte biodegradable, y el recubrimiento tisular puede usarse como un vehículo de suministro de fármaco de liberación controlada o sostenida.

40 La membrana y el soporte de cualquier recubrimiento de superficie tisular de acuerdo con una modalidad de la invención pueden dimensionarse cada uno para su colocación sobre una superficie del ojo o sobre una superficie de tejido que incluye tejido dérmico, tejido del tracto gastrointestinal, tejido del tracto respiratorio, tejido del sistema genital, tejido del sistema urinario, tejido del sistema circulatorio, y tejido óseo. Como tal, el soporte de un recubrimiento de superficie tisular de una modalidad de la invención tiene un radio de curvatura que corresponde a una curva base medida de un tejido corporal, por ejemplo, una córnea, que se pondrá en contacto con el recubrimiento de superficie tisular.

45 En una modalidad de un recubrimiento de superficie tisular de la invención que comprende un soporte y una membrana, el soporte es compatible con el tejido objetivo. Como se usa en la presente, los términos "compatible," "compatibilidad," y las variaciones gramaticales de estos, se refieren, por ejemplo, a la capacidad del soporte de coincidir estrechamente con las propiedades mecánicas y fisiológicas del tejido objetivo.

Estuches:

55 Un estuche puede comprender cualquier combinación de composiciones o dispositivos de la invención tales como, por ejemplo, membranas, películas, bandas elásticas, soportes, anillos, selladores de tejido, hebras de sutura, anillos de sujeción, presillas, tachuelas, expansores de forma cónica, y aparatos para acoplar por fricción una banda radialmente elástica colocada sobre el ápice de un expansor.

60 En la presente se describe un empaque sellado que contiene un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular. Un ejemplo de este es un empaque sellado que tiene dos compartimientos sellados, como se muestra antes de romper el sello, en la Figura 18A. Un compartimiento (124) contiene un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular (128) liofilizado, para usar como lente de contacto terapéutico. El otro compartimiento (126)

contiene un medio para hidratar el lente de contacto terapéutico (128). La Figura 18B muestra el empaque después de romper el sello, y el lente de contacto terapéutico (128) que se hidrata en el compartimiento (126).

La Figura 19A es una vista en perspectiva de un soporte (134) formado para ajustarse sobre una superficie ocular, el soporte que tiene una composición adhesiva (84) como se describió anteriormente sobre una porción de la superficie periférica externa, y la membrana amniótica (35) colocada sobre la superficie interna o el lado cóncavo del soporte (134). Como se representa en la Figura 19B, la membrana (35) se coloca sobre la superficie interna del soporte (134) y se pliega hacia arriba y sobre la superficie periférica externa, de tal manera que la membrana (35) se pone en contacto con la composición adhesiva (84) y la membrana (35) se sostiene en su lugar mediante la composición (84).

En otro estuche el soporte (134) tiene una ranura periférica (no mostrada) sobre la superficie externa; la membrana (35) se coloca sobre la superficie interna del soporte (134), y se pliega hacia arriba para cubrir el borde periférico externo del soporte (134) y la ranura periférica. Para sostener la membrana (35) contra la superficie interna del soporte (134), un segundo soporte anular, concéntrico con el soporte (134) y que tiene un borde diseñado para bloquear por cierre a presión en la ranura periférica del soporte (134) se coloca sobre el soporte (134) y se bloquea por cierre a presión en su lugar con el soporte (134), lo que de esta manera fija la membrana (35) al soporte.

Como se describió anteriormente, la membrana amniótica y los soportes requeridos para fabricar un inserto de cultivo o un recubrimiento para una superficie tisular pueden suministrarse, además, como componentes de un estuche. Además, el estuche incluye muestras de una o más composiciones antibacterianas y sustancias terapéuticas a añadir a la membrana amniótica o administrar con el uso del recubrimiento de membrana amniótica para una superficie tisular.

El soporte sólido usado en los tres prototipos descritos más abajo puede modificarse con respecto a los materiales, la dimensión, y la forma a fin de satisfacer varios propósitos.

Los tres prototipos descritos más abajo pueden usarse para cultivar células *in vitro*. Además, pueden incorporarse genes terapéuticos en células cultivadas durante el crecimiento *in vitro* de manera que estos prototipos pueden usarse después como instrumentos para suministrar las células cultivadas que sobreexpresan un gen de interés para una terapia génica potencial en el futuro.

Los prototipos pueden modificarse como se describió anteriormente, sin más que la experimentación de rutina, de manera que la forma se ajuste bien sobre la superficie ocular.

Los prototipos pueden usarse para suministrar células cultivadas *ex vivo*, las células expandidas por una razón terapéutica.

Ejemplificación:

Prototipo 1: Fijación de Membrana Amniótica a un Inserto de Cultivo

El Prototipo 1 consiste en un conjunto de dispositivos mostrados en las Figuras 1A-1D y las Figuras 2, 3A y 3B. Los dispositivos incluyen un expansor de forma cónica, como se muestra en las Figuras 1A-1D (20) y la Figura 2; un aparato (30) para acoplar la banda elástica (24), y un anillo para la transferencia de la banda elástica al inserto (mostrado en las Figuras 1A-1D) en la base del expansor (20). El propósito original de estos dispositivos es facilitar la fijación de la membrana amniótica sobre un inserto de cultivo de manera que las células puedan cultivarse en el sustrato de membrana amniótica. Por lo tanto, el prototipo 1 ilustra cómo se fijó la membrana amniótica sobre un soporte sólido, es decir, el inserto de cultivo, mediante una banda elástica. La operación de estos dispositivos para crear el prototipo 1 involucró las siguientes etapas representadas en las Figuras 1A-1D.

Etapas 1: Una banda elástica (24) se colocó sobre el ápice de un expansor de forma cónica (20), mientras que la base del expansor estaba en contacto con un anillo que tiene una ranura anual periférica para recibir la banda (Figura 1A).

Etapas 2: Se usó un aparato (30) para acoplar por fricción la banda elástica mientras se aplica sobre el ápice del expansor (Figura 1A).

Etapas 3: El aparato (20) se usó para empujar la banda en una dirección desde el ápice del expansor hacia la base del expansor, y hacia la ranura anual periférica en el anillo (Figura 1B-1D).

Etapas 4: Una membrana amniótica se colocó sobre la superficie de un inserto.

Etapas 5: Después el anillo se levantó para aplicarse sobre la membrana en el inserto.

Etapas 6: La banda se translocó del anillo al inserto (Ver Figura 4D).

Prototipo 2: Fijación de Membrana Amniótica entre Dos Anillos con Uno que es un Anillo Tórico (ejemplo comparativo)

El prototipo 2 se representa en las Figuras 4A-4D y en las Figuras 5A-5D. El prototipo comprende dos conjuntos de anillos, con uno que es un soporte sólido, mientras que el otro es un anillo tórico elástico (Figuras 4A y 5A). En este prototipo, se fijó una membrana amniótica (35) a un soporte sólido (22), un anillo sólido, que tiene una ranura anular (21 o 23) en la superficie interior o exterior del anillo (22), de manera que puede dimensionarse para recibir un anillo tórico elástico (24 o 25). La operación involucró las siguientes etapas representadas en las Figuras 4 y 5.

Etapas 1: La membrana amniótica (35) se colocó sobre el anillo sólido (22) con una ranura (24) en la Figura 4D, o (21) en la Figura 5D.

Etapas 2: El anillo tórico elástico (24 o 25) se transfirió al soporte de anillo sólido (22) para asegurar la membrana (35) al insertarla dentro de la ranura exterior (23) del anillo (Figura 4D), o de la ranura interior (21) del anillo (Figura 5D).

Prototipo 3: Fijación de Membrana Amniótica entre dos Anillos Sólidos mediante un Mecanismo de Cierre a Presión

El prototipo 3 se ilustra en las Figuras 8A-8D y las Figuras 9A-9D. El prototipo incluye la fabricación de un anillo de polímero, que tiene una hendidura de corte (45) en la Figura 8 y (50) en la Figura 9. La operación involucró las 4 etapas siguientes representadas en las Figuras 8A-8E.

Etapas 1: La membrana amniótica (35) se aplicó sobre la superficie del anillo (Figuras 8A-8C), y se empujó hacia las hendiduras a lo largo del borde externo del anillo. Esta operación se realizó mientras que el anillo estaba en un molde (44) de manera que la membrana pudiera caer o colgar hacia abajo en el centro. Después el anillo (46) con membrana ligeramente adherente se levantó del molde con unas pinzas (Figura 8B). Se aplicó una presión sobre un tablero de soporte sólido, para torcer el anillo mediante rotación interna o externa de manera que la membrana cubrió completamente al anillo (Figura 8D). Esta acción permitió la fijación de la membrana amniótica al anillo (Figura 8E).

Diseño Experimental y Métodos

Objetivo 1: Desarrollar un recubrimiento de membrana amniótica para una superficie ocular, o "lente de contacto terapéutico" al modificar los prototipos existentes basado en la forma de un conformador a ajustar para cubrir la superficie corneal y toda la superficie ocular, respectivamente. 1) Fundamento:

Los estudios preliminares han demostrado que puede fijarse membrana amniótica sobre varios tipos de soportes sólidos. Por lo tanto, se cree que es factible desarrollar, además, un "lente de contacto terapéutico" sin sutura al modificar el soporte sólido basado en el diseño experimental propuesto más abajo de manera que pueda aplicarse para cubrir la superficie corneal o toda la superficie ocular.

2) Diseño Experimental:

El diseño del lente de contacto terapéutico de la invención requerirá resolver las tres cuestiones fundamentales siguientes.

La primera cuestión es el tamaño del "lente." Basado en la patología de la superficie ocular a tratar, el lente de contacto terapéutico tendrá que cubrir toda la superficie corneal para tratar enfermedades de la córnea o toda la superficie ocular para tratar enfermedades difusas de la superficie ocular que involucran la córnea y la conjuntiva. Por lo tanto, se diseñarán al menos dos lentes de contacto terapéuticos para su uso en la córnea (por ejemplo, 15 mm) o para su uso en toda la superficie ocular (por ejemplo, hasta los fondos de saco conjuntivales).

Se adoptará la forma (o contorno) de un conformador. Un conformador es una cubierta plástica para ajustar en el espacio entre los párpados y la superficie ocular. Diferentes tamaños de conformadores están disponibles comercialmente. Los conformadores (conocidos también como anillos SYMBLEPHARON) se obtuvieron de Jardon Eye Prosthetics, Southfield, MI, y se fabrican de resina acrílica conocida como LUCITE® (polimetilmetacrilato, PMMA) (Dupont de Nemours) que se usa, además, para fabricar lentes de contacto duros. El diseño actual de los conformadores y lentes de contacto no provoca ningún problema de borde en los pacientes que los usan.

Los cirujanos oculoplásticos usan con frecuencia un conformador al final de la cirugía reconstructiva para evitar la formación postoperatoria de simbléfaron, es decir, la adhesión fibrótica entre la conjuntiva tarsal del párpado y la conjuntiva bulbar del globo.

La segunda cuestión es el material usado para fabricar el soporte sólido para fijar la membrana amniótica. Se probará acrílico, elastómero de silicona, o una combinación de ambos para fabricar el soporte.

5 La tercera cuestión es probar, además, el mecanismo para fijar la membrana amniótica al soporte sólido de silicona, que incluye el uso ya sea de acrílico y elastómero de silicona de acuerdo con el mecanismo del Prototipo 2 o de un soporte de caucho de silicona flexible (polidimetilsiloxano, terminado en trimetilo) donde se harán hendiduras en el aspecto interno del soporte de anillo tórico, mediante el uso del mecanismo del Prototipo 3.

10 El soporte de anillo tórico se fabricará de caucho de silicona (Material de dureza Shore A 50 ± 5 o 75 ± 5 , transparente, material base certificable a USPCL VI, el resto de los ingredientes dentro de las directrices de la FDA). La longitud, la profundidad, y el ancho de cada hendidura, en y a través de la circunferencia del faldón, se variará para proporcionar la mejor fijación de la membrana amniótica al faldón.

Al considerar las tres cuestiones mencionadas anteriormente, se propone desarrollar el lente de contacto terapéutico de la invención para el uso en la superficie corneal u ocular de las siguientes maneras.

15 En primer lugar, basado en el mecanismo del Prototipo 3, se obtendrán anillos tóricos de diferentes tamaños, es decir, 13, 15, 17 y 19 mm fabricados de silicona (DA/PRO RUBBER INC., Tulsa, OK). Bajo un microscopio, el anillo tórico se colocará en una etapa de rotación y se fijará en una ranura. Se usará una cuchilla para crear hendiduras a diferentes intervalos en toda la superficie interna del anillo tórico. Se probarán, además, varias profundidades y longitudes de las hendiduras para observar cuáles proporcionan la mejor fijación de la membrana amniótica.

20 En segundo lugar, basado en el mecanismo del Prototipo 3, se desarrollará una guía mecánica que extienda la abertura de la hendidura lo que permite la inserción del borde periférico de la membrana amniótica dentro de la hendidura. El mecanismo será similar a una aguja de vacío de borde liso.

25 En tercer lugar, se usará un anillo tórico que tiene el contorno de la superficie del ojo de conejo, similar al conformador humano para el uso en la superficie ocular en la prueba en conejos del Objetivo 3, mientras que se adoptará una configuración circular con el contorno que asemeja el de un lente de contacto para el uso en la córnea.

30 3) Resultados Esperados & Interpretación:

Los diseños experimentales mencionados anteriormente son muy factibles sin más que experimentación de rutina, basado en las experiencias descritas en los Estudios Preliminares. Se espera que la membrana amniótica se fije firmemente al soporte sólido para el uso tanto en la superficie corneal como en la ocular. Se espera, además, que la resistencia de la fijación sea lo suficientemente fuerte para soportar el estiramiento aplicado a la membrana. Para cuantificar dicha resistencia del lente de contacto terapéutico *in vitro*, se usará un dispositivo extensómetro que sostendrá un lente de contacto terapéutico fabricado de la invención por su borde de contorno externo e incluirá un accesorio para variar la presión aplicada sobre la membrana hasta que tiene lugar el desprendimiento de la membrana del anillo tórico. La relación esfuerzo-deformación se registrará en una PC y se determinará el punto de ruptura. Este dispositivo se usará para comparar la resistencia de cada lente de contacto terapéutico fabricado de acuerdo con las diferentes variables mencionadas anteriormente.

40 4) Problemas Potenciales & Soluciones:

45 Una vez colocado sobre el ojo, la presión de deflexión ejercida por el tejido es más bien pequeña, probablemente menor que 10 gramos. Si la fuerza de deflexión según la evaluación, como se describió anteriormente, separa prematuramente la membrana amniótica del anillo tórico de silicona, se cambiará en primer lugar el durómetro del anillo tórico de 50 a 75 para mejorar la unión entre el anillo tórico y el faldón.

50 Si hay una diferencia estadística en estos varios diseños, se elegirá el que proporcione el mayor punto de ruptura. Si, sin embargo, el que tiene el mayor punto de ruptura aún no es lo suficientemente fuerte, se cambiará la configuración de la sección transversal del anillo tórico de circular a oval y, de ser necesario, se cambiará el anillo de un lumen circular a uno oval de manera que el borde se vuelva más estrecho a medida que aumenta la cantidad de membrana insertada.

55 Si, sin embargo, después de cambiar la dureza durométrica del anillo tórico y de la alteración mencionada anteriormente en la dimensión y forma de la hendidura, aún no se logra una fijación satisfactoria, se cambiará el mecanismo de fijación al del Prototipo 3, y el material para fabricar el faldón se cambiará de silicona a PMMA y silicona. Es decir, la fijación se realizará mediante un anillo tórico que se ajusta en una ranura hecha en el borde interno o en el borde externo del faldón de PMMA. La presión en el punto de ruptura se medirá y se comparará para observar si la resistencia de fijación ha mejorado.

60 Si, sin embargo, el diseño basado en el Prototipo 2 no es satisfactorio para la fijación de la membrana amniótica a un faldón de PMMA, se abandonará el enfoque del anillo tórico en su conjunto, y se diseñará un molde inyectable de dos cavidades para crear las dos piezas del faldón que se cerrarán a presión. El molde será fabricado ya sea por Small

Parts Inc., Miami Lakes, Florida, o por Innovia Inc, Miami, Florida. Cuando se cierran a presión, estas dos piezas intercalan y fijan la membrana amniótica, lo que resulta en la forma y grosor originales del conformador mostrado en las Figuras 20A y B y 21A y B.

5 El mecanismo de cierre a presión será uno de los siguientes, todos descritos e ilustrados anteriormente en las figuras acompañantes: 1) ranura ajustada en el lado interno de una pieza y un saliente elevado en el lado externo de la otra pieza; 2) unión macho y hembra con postes creados en una pieza y agujeros creados en la otra pieza; o 3) superficie dentada en una pieza y superficies complementarias en la otra.

10 El borde de un lente de contacto terapéutico se forma de acuerdo con el diseño del conformador para evitar cualquier efecto secundario potencial a la superficie ocular que pueda crearse por fricción (rozaduras) durante el parpadeo. Si existe esta preocupación, se envolverá el exceso de membrana amniótica alrededor del borde externo del soporte sólido de manera que sólo la membrana amniótica esté en contacto con el tejido del ojo.

15 **Objetivo 2: Examinar la durabilidad y la estabilidad del lente de contacto terapéutico fabricado después de la crioconservación**

1) Fundamento:

20 Una vez que el lente de contacto terapéutico se fabrica con éxito para el uso tanto en la superficie corneal como en la ocular, será necesario examinar su durabilidad y estabilidad después de cierto período de crioconservación a la temperatura de - 80 °C y en el medio de conservación, que se describió en el método patentado (ver U.S.P.N. 6,152,142) para preparar AmnioGraft™, actualmente fabricado por Bio-Tissue. La potencia de los efectos antiinflamatorios y contra la formación de cicatrices de la membrana amniótica se mantienen en este método de conservación patentado cuando AmnioGraft™ se distribuye al usuario final, es decir, los cirujanos oftálmicos. Para el AmnioGraft™, se ha determinado que el período de crioconservación, es decir, el período de expiración, es de al menos un año. Por lo tanto, será necesario determinar si los faldones flexibles aún mantienen su integridad en dicha condición de almacenamiento. Si este fuera el caso, será necesario, además, determinar si la resistencia de fijación (según se midió por la presión en el punto de ruptura) se mantiene aún después de varios períodos de crioconservación. La crioconservación de la membrana amniótica fijada a un soporte es opcional. 2) Diseño:

35 Se probará si la integridad del anillo tórico elegido y el lente de contacto terapéutico fabricado (con una membrana amniótica fijada) se conservan aún después de una crioconservación prolongada. Se colocará una serie de anillos tóricos (de diferentes materiales) y fabricados con estos mismos anillos tóricos materiales en frascos de vidrio individuales que contienen el medio de almacenamiento usado normalmente para almacenar AmnioGrafts™. Estos frascos se almacenarán en un congelador a - 80 °C. Después de varios períodos de almacenamiento, se examinará la integridad de los dispositivos bajo un microscopio de disección para observar si hay alguna grieta o defecto, y las propiedades originales del material se evaluarán mediante el uso de la prueba de presión de ruptura y se compararán con la membrana sin congelar, respectivamente. La duración de la crioconservación será por un período de un año, pero los puntos de datos se tomarán semanalmente dentro de este período (mientras está en marcha el proceso de fabricación - Objetivo 1). 3) Resultados Esperados & Interpretación:

45 A partir de la prueba preliminar realizada, específicamente la prueba de la integridad de 3 tipos de anillos tóricos de caucho de silicona (PDMS pura, VITON, y fluorocaucho de silicona) a -80 °C, se espera que el soporte flexible del lente de contacto terapéutico sea estable durante el período de crioconservación de 1 año, y que la resistencia de fijación permanezca lo suficientemente fuerte. Se probará, además, la acción fisiológica de dicha membrana amniótica fijada después del almacenamiento al probar su capacidad de soportar el crecimiento epitelial en cultivo (ver Métodos), y se comparará con los controles antes de la crioconservación de AmnioGrafts™ después de la misma cantidad de tiempo en crioconservación. 4) Problemas Potenciales & Soluciones:

50 Si, sin embargo, se nota que la integridad del soporte flexible es amenazada por la crioconservación, se determinará en primer lugar si este efecto adverso es dependiente del tiempo, y se encontrará el tiempo más corto que aún puede mantener el ensamble intacto.

55 Si es necesario un tiempo de crioconservación más corto, se modificará el proceso de fabricación del lente de contacto terapéutico mediante el uso del mejor material pero se debe tener en mente el período de almacenamiento limitado. Si sin embargo, se descubre que la integridad y la resistencia de fijación del soporte flexible no son satisfactorias, se examinarán otros materiales elastoméricos.

60 Alternativamente, la membrana, que se ha criopreservado como AmnioGraft™, puede fijarse al soporte flexible inmediatamente antes de la distribución, lo que evita así problemas que podrían estar asociados con la crioconservación prolongada.

Objetivo 3: Examinar la seguridad del lente de contacto terapéutico cuando se aplica sobre ojos de conejo 1)
Fundamento:

5 Una vez que se obtiene un lente de contacto terapéutico satisfactorio para el uso tanto en la superficie corneal como en la ocular después de completar los Objetivos 1 y 2, se examinará después si dicho lente de contacto terapéutico puede usarse de forma segura sobre el ojo de conejo. El Objetivo 3 puede iniciarse en paralelo con el Objetivo 2 después de completar el Objetivo 1. 2) Diseño:

10 El protocolo se llevará a cabo en un total de 25 ojos de conejos NZW (se necesitarán 27 conejos con una tasa de deserción esperada de 10%) para probar la seguridad del lente de contacto terapéutico fabricado. Se usarán los lentes de contacto terapéuticos fabricados para ajustarse al uso en la superficie corneal y en la ocular de conejo. El diseño del lente de contacto terapéutico con respecto al tamaño, curvatura, y contorno se basará en el conocimiento de que los ojos de conejo aumentan de tamaño con la edad. Los conejos serán de 2-3 kg de peso corporal y de cualquier sexo.
15 Después de insertar el lente de contacto terapéutico de conejo sobre el ojo del conejo (el otro ojo sirve como control), cada ojo del conejo se examinará dos veces al día por inspección con luz manual y semanalmente por inspección con lámpara de hendidura durante un período de 3 semanas para observar si hay alguna reacción adversa al uso del lente. Específicamente, bajo la lámpara de hendidura se buscará inflamación, con respecto a hinchazón del tejido, rojez, y acumulación de moco de la superficie ocular y las estructuras anexas externas que incluyen los párpados y la piel.
20 Además, la integridad del epitelio de la córnea se monitoreará por tinción con fluoresceína, y de ser necesario por histología al final del estudio.

Además, se registrará la integridad del lente de contacto terapéutico insertado. Específicamente, se examinará la integridad de la membrana (si está despegada o disuelta), la estabilidad de la fijación de la membrana al soporte sólido,
25 y la posición del lente de contacto terapéutico sobre la superficie del ojo. Además se determinará la duración del uso seguro del lente de contacto terapéutico. El punto final del uso del lente se producirá cuando exista algún problema de ajuste con respecto al lente de contacto terapéutico, al tejido huésped, o una combinación de ambos. La estadística se realizará mediante un análisis de varianza seguido de pruebas post-hoc de la diferencia mínima significativa para evaluar las diferencias estadísticas entre los grupos con respecto a: inyección conjuntiva (escala 0-4), daño al epitelio de la córnea (tinción con fluoresceína) (escala 0-4), catarata (escala 0-4), y reflejo en las células de la cámara anterior (escala 0-4) mediante el uso la escala estándar: 0=ninguno, 1=bajo, 2=suave, 3=fuerte, 4=severo.
30

3) Resultados Esperados e Interpretación:

35 Se espera que el ojo del conejo use bien el lente de contacto terapéutico de conejo sin ninguna complicación, y que la integridad de la membrana dure al menos una semana, preferentemente hasta tres semanas, un intervalo de tiempo que se ha encontrado que es suficiente para tratar enfermedades de la superficie ocular humana mediante el uso de AmnioGrafts™ suturados convencionales. Durante este período de tiempo se espera que no exista ningún problema de ajuste en la integridad del lente de contacto terapéutico (para el uso tanto en la superficie corneal como en la ocular), o los tejidos de la superficie ocular del conejo y las estructuras anexas.
40

4) Problemas Potenciales & Soluciones:

45 Los ojos de conejo difieren de los ojos humanos en que tienen una velocidad de parpadeo más lenta, y en que tienen una membrana nictitante adicional en la conjuntiva bulbar nasal. Lo primero puede provocar un tiempo de exposición más prolongado de la superficie del ojo, lo que conduce a la sequedad de la membrana sobre el ojo del conejo. En pacientes humanos con un problema de exposición, se ha observado la disolución temprana del AmnioGraft™, es decir, en menos de una semana. Si dicho problema de exposición en conejos crea claramente un ambiente de prueba desfavorable, se verificará en primer lugar esta preocupación al medir la velocidad de parpadeo en conejos antes y después de la inserción de un lente de contacto terapéutico. Una vez confirmado, este problema se abordará al realizar una pequeña tarsorrafia suturada, es decir, el cierre de los párpados superior e inferior mediante suturas, para observar si esto reduce la disolución prematura no deseada de la membrana.
50

La existencia de una membrana nictitante en un ojo de conejo puede provocar fricción mecánica al lente de contacto terapéutico, especialmente al de uso en la superficie corneal con un diámetro más pequeño. Esta fricción mecánica y el movimiento generados por la membrana nictitante, que no está presente en los ojos humanos, pueden imposibilitar el uso del lente de contacto terapéutico. Si este fuera el caso, se extirpará la membrana nictitante más adelante en el tiempo antes de la inserción de un lente de contacto terapéutico.
55

60 Se ha informado que la membrana amniótica humana puede provocar en conejos reacciones inflamatorias a xenoinjertos mediadas por linfocitos, especialmente después de dos semanas después de trasplantarse a la superficie de la conjuntiva como un injerto con suturas (31 ;32). Si esto se vuelve una preocupación, se verificará por inspección

histológica de la membrana residual, y se pasará al uso de membrana amniótica de conejo cuando el lente de contacto terapéutico deba probarse por un período de uso más largo en conejos.

Métodos Fundamentales

5

1. Preparación de la membrana amniótica:

10

La membrana amniótica humana para el uso en investigaciones se adquirirá de acuerdo con un protocolo IRB (# 01/554A) aprobado por el Subcomité de Ciencias Médicas para la Protección de Sujetos Humanos en Investigación (Medical Science Subcommittee for the Protection of Human Subjects in Research) de la Escuela de Medicina de la Universidad de Miami el 1 de Febrero de 2002.), y se preparará de acuerdo con el procedimiento patentado (Ver U.S.P.N. 6,152,142) establecido por Bio-Tissue mediante el uso de su método patentado. La confidencialidad de la información del donante es mantenida por Bio-Tissue y no se divulga a ningún personal involucrado en esta propuesta de subvención y no se usará en ningún informe generado a partir de este estudio.

15

Como se expuso en Problemas Potenciales del Objetivo 3, si tiene que usarse membrana amniótica de conejo para la prueba, esta se adquirirá bajo un protocolo aprobado por IACUC (UM ACUC#00-127renewal03), y se preparará de manera idéntica a la descrita para la membrana amniótica humana. Tanto la membrana amniótica humana como la de conejo se procesarán y se prepararán para esta propuesta en el complejo de laboratorios en Bio-Tissue, Inc. 2. Cultivo de Explantes Limbares en Membrana Amniótica:

20

25

El método se usa para probar la acción fisiológica de la membrana amniótica cuando dicha prueba se vuelve necesaria, y se ha informado en publicaciones anteriores (33-35). En breve, se obtendrán explantes limbares a partir de la corneoescleral remanente de cada córnea del donante después de ser trepanada para el trasplante de córnea convencional. Explantes de 1 a 2 mm³ que incluyen 0.5 mm dentro del limbo y 0.5 mm más allá del limbo se prepararán y se colocarán en una placa de cultivo y se incubarán en Dispasa II (1.2 U/ml en solución salina equilibrada de Hank libre de Mg²⁺ - y Ca²⁺ - (HBSS)) durante 15 a 30 min a 37 °C en 5% de CO₂ humidificado y se enjuagará con DMEM que contiene 10% de FBS. El soporte sólido con membrana amniótica fijada con o sin crioconservación adicional se usará como sustrato con la superficie basal de la membrana orientada hacia arriba para cultivar el explante limbar, que se colocará en el centro de la membrana con una gota de FBS durante la noche para permitir una adhesión adecuada, y después se cultivará en un medio de igual volumen de DMEM amortiguado con HEPES que contiene bicarbonato y F12 de Ham complementado con 0.5% de sulfóxido de dimetilo, 2 ng/ml de EGF de ratón, 5 mg/ml de insulina, 5 mg/ml de transferrina, 5 ng/ml de selenio, 0.5 mg/ml de hidrocortisona, 30 ng/ml de la subunidad A de la toxina del cólera, 5% de FBS, 50 mg/ml de gentamicina, y 1.25 mg/ml de amfotericina B (en conjunto, denominados el medio SHEMA). Los cultivos se incubarán a 37 °C en 5% de CO₂ y 95% de aire y el medio se cambiará cada 2-3 días.

30

35

40

El tejido limbar humano se obtendrá del Banco de ojos Florida Lion's Eye Bank de cadáveres de donantes cuya identidad no puede identificarse. La membrana amniótica humana conservada se adquirirá de acuerdo con un protocolo aprobado por IRB (# 01/554A) y se procesará por Bio-Tissue, a la vez que la identidad del donante vivo no puede identificarse.

Animales Vertebrados

45

Este protocolo animal ha sido aprobado por la Universidad de Miami (Núm. 02-142 el 11 de julio de 2002). El principal animal a usar es el conejo. Este animal se elige debido a su tamaño y fácil manipulación de la inserción del lente. Una búsqueda extensiva en Medline, Agricola, y Altweb mostró referencias que coinciden con las siguientes palabras claves: membrana amniótica, lente de contacto, superficie ocular, y animales, pero no están relacionadas con la presente temática. Por lo tanto, los conejos son los mejores animales usados en las pruebas preclínicas de seguridad del lente de contacto terapéutico descritas en el Objetivo 3.

50

Se usarán un total de 25 conejos blancos de Nueva Zelanda (y 2 adicionales usados para la posible deserción), de cualquier sexo con peso corporal de 2-3 Kg. Se alojarán en jaulas cubiertas con filtro en condiciones de temperatura, humedad, y luz (ciclo de luz de 12h; las luces se encienden a las 7.00 AM) controladas, y se mantendrán *libremente* en comida y agua estándares.

55

60

Se usará un conejo para probar si la presencia de la membrana nictitante interfiere con el uso del lente para cada diseño de dos tipos de lente de contacto terapéutico, es decir, para el uso en las superficies corneal y ocular, respectivamente. De manera que se necesitarán un total de cuatro conejos. Un conejo se usará como control sin probar el uso del lente. 20 conejos adicionales se subdividirán en cuatro grupos con 5 cada uno para probar dos diseños diferentes de lente de contacto terapéutico para el uso en las superficies corneal y ocular, respectivamente. Este es un estudio de seguridad, y no se usará para comparar entre estos cuatro grupos diferentes.

La inserción del lente de contacto terapéutico será de la misma manera que la inserción del lente de contacto en

pacientes humanos. A esto seguirá la aplicación tópica de una gota de 0.5% de proparacaína (anestésico local usado en ojos humanos). La inspección diaria casual se realizará por luz manual o lámpara de hendidura sin anestesia. Sin embargo, si se determina que una inspección detallada de la hendidura es esencial para conocer la condición de uso del lente, cada conejo recibirá inyecciones intramusculares de mg/kg de ketamina, 5 mg/kg de xilazina, y 0.75 mg/kg de acepromazina.

Si hay reacción adversa al uso del lente de contacto terapéutico que justifique la eutanasia, esta se realizará por inyección intravenosa de una sobredosis de pentobarbital, un método consistente con la recomendación del Grupo sobre la Eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria bajo el protocolo aprobado, ACUC #_02-142. Se cumplirá con la política de PHS sobre Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio, revisada en septiembre de 1986.

La siguiente literatura puede ser útil como lectura de fondo para médicos e investigadores clínicos.

15 Literatura Citada

1. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:473-84.
2. Dua HS, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:748-52.
3. Kruse FE, Rohrschneider K, Voelcker HE. Transplantation von Amnio-membran zur rekonstruktion der hornhautoberfläche. *Ophthalmologie* 1999;96:673-8.
4. Sippel KC, Ma JJK, Foster CS. Amniotic membrane surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:269-81.
5. Tseng SCG, Tsubota K. Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. In: Holland EJ, Mannis MJ, eds. *Ocular Surface Disease*, 1ra. ed. NY, Berlín, Heidelberg: Springer, 2002; cap. 20.
6. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, y otros Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238 :68-75.
7. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:833-45.
8. de Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522-5.
9. Brown AL. Lime burns of the eye: Use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects. *Arch Ophthalmol* 1941;26:754-69.
10. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-45.
11. Sorsby A, Haythorne J, Reed H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1947;31:409-18.
12. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, y otros. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173-7.
13. Hao Y, Ma DH-K, Hwang DG, y otros Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-52.
14. Na BK, Hwang JH, Kim JC, y otros Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Trophoblast Res* 1999;13:459-66.
15. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy DC, y otros Suppression of interleukin-1a and interleukin-1b in the human corneal epithelial cells cultured on the amniotic membrane matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-9.
16. Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906-14.
17. Wang MX, Gray TB, Parks WC, y otros Corneal haze and apoptosis is reduced by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cat Refract Surg* 2001;27:310-9.
18. Kim JS, Kim JC, Na BK, y otros Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res* 1998;70:329-37.
19. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-13.
20. Heiligenhaus A, Meller D, Meller D, y otros Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1969-74.
21. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X. Suppression of Transforming Growth Factor isoforms, TGF-b receptor II, y myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-35.
22. Lee S-B, Li D-Q, Tan DTH, y otros Suppression of TGF-b signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:325-34.
23. Choi TH, Tseng SCG. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. *Cornea* 2001;20:197-204.
24. Choi YS, Kim JY, Wee WR, Lee JH. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17:389-95.
25. Woo H-M, Kim MS, Kweon O-K, y otros Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol* 2001;85:345-9.

26. Meller D, Pires RTF, Mack RJS, y otros Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980-90.
27. Sridhar MS, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol* 2000;130:134-7.
- 5 28. Kim JC. Use of temporary amniotic membrane graft for corneal diseases. Inaugural Scientific Meeting of Asia Pacific Society of Cornea and Refractive Surgery, 49. 1998.
29. Sridhar MS, Sangwan VS, Bansal AK, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2001;108:1218-22.
- 10 30. Shields CL, Shields JA, Armstrong T. Management of conjunctival and corneal melanoma with surgical excision, amniotic membrane allograft, and topical chemotherapy. *Am J Ophthalmol* 2001;132:576-8.
31. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1539-46.
32. Barton K, Budenz D, Khaw PT, Tseng SCG. Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1762-8.
- 15 33. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:63-71.
34. Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo conservation and expansion of human limbal epithelial progenitor cells by amniotic membrane. *Br J Ophthalmol* 2002;86:463-71.
- 20 35. Grueterich M, Tseng SCG. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:783-790.
36. JohnT, Foulks GN, John ME, Cheng K, Hu D. Amniotic membrane in the surgical management of acute toxic epidermal necrolysis. *Ophthalmology* 2002;109:351-60.

Reivindicaciones

1. Un recubrimiento de superficie tisular que comprende:
 - a) un primer anillo que tiene un borde anular externo y un diámetro exterior;
 - b) una membrana amniótica que cubre completamente el primer anillo, la membrana se envuelve sobre el borde anular externo del primer anillo; y
 - c) un segundo anillo que tiene un borde anular interno y un diámetro interior, en donde el diámetro interior del segundo anillo se dimensiona para ajustarse por cierre a presión al diámetro exterior del primer anillo, y se coloca sobre el primer anillo para su alineación coaxial; la membrana se fija entre el primer anillo y el segundo anillo por un acoplamiento de bloqueo del primer anillo con el segundo anillo durante el ensamble del recubrimiento de superficie tisular.
2. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde el borde anular externo del primer anillo incluye una primera superficie de agarre y el borde anular interno del segundo anillo incluye una segunda superficie de agarre.
3. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 2, en donde la primera y segunda superficies de agarre incluyen un dispositivo de agarre seleccionado del grupo que consiste en fresas, postes de fijación, y un zona que define aberturas para postes de fijación.
4. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 2, en donde la primera superficie de agarre incluye una zona que define aberturas para postes de fijación y la segunda superficie de agarre incluye postes de fijación alineados espacialmente con las aberturas para postes de fijación.
5. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 2, en donde la primera superficie de agarre incluye postes de fijación y la segunda superficie de agarre incluye una zona que define aberturas para postes de fijación alineadas espacialmente con los postes de fijación.
6. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 3, en donde la primera o la segunda superficie de agarre incluye postes de fijación y la membrana incluye una zona que define aberturas para postes de fijación alineadas espacialmente con los postes de fijación para asegurar la membrana entre la primera y la segunda superficie de agarre.
7. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde el primer anillo y el segundo anillo son biodegradables.
8. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde al menos uno de los anillos comprende un polímero que incluye, además, al menos una molécula bioactiva.
9. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde la membrana, el primer anillo, y el segundo anillo se dimensionan cada uno para la colocación sobre una superficie de un ojo.
10. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde la membrana, el primer anillo, y el segundo anillo se dimensionan cada uno para la colocación sobre una superficie de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido dérmico, tejido del tracto gastrointestinal, tejido del tracto respiratorio, tejido del sistema genital, tejido del sistema urinario, tejido del sistema circulatorio, y tejido óseo.
11. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde al menos uno de los anillos comprende metacrilato de polimetilo o un material de silicona.
12. El recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, en donde al menos uno de los anillos se fabrica de un material seleccionado del grupo que consiste en poliuretano, poliéster, y politetrafluoroetileno
13. Un recubrimiento de superficie tisular de la reivindicación 1, que comprende, además, células seleccionadas del grupo que consiste en células diseñadas previamente por ingeniería genética para terapia génica, células epiteliales del pigmento retinal, células madre epiteliales, células madre limbares, y células epiteliales limbares.
14. Un recubrimiento de superficie tisular de la Reivindicación 1, para el uso como una composición para reducir el dolor ocular y la opacidad de la córnea después de la cirugía láser de excímeros y para mejorar el éxito de la implantación de queratoprótesis.

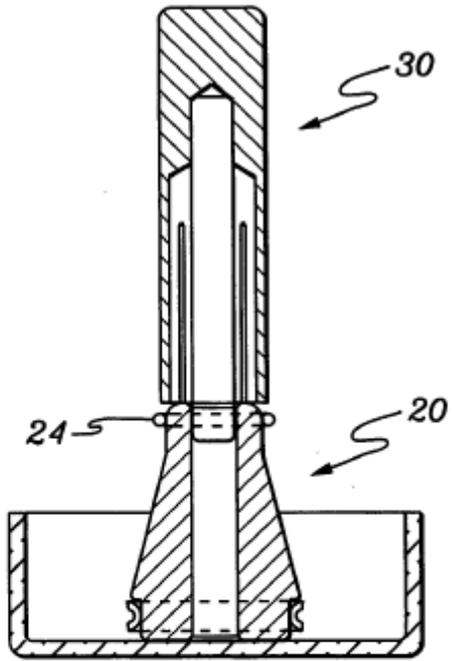


fig. 1A

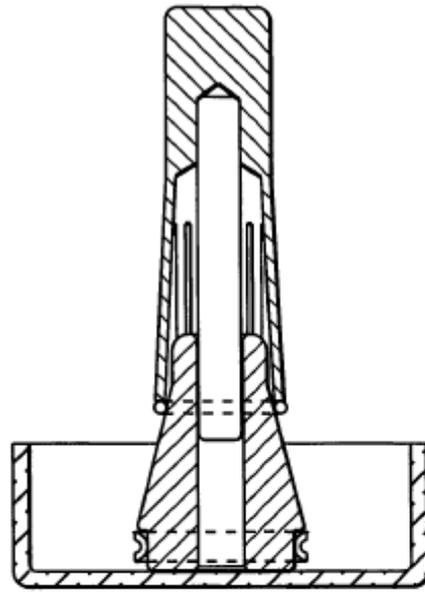


fig. 1B

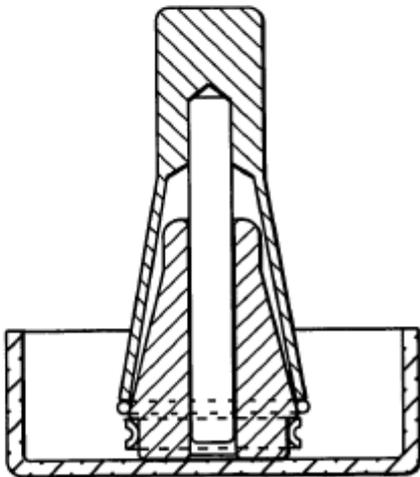


fig. 1C

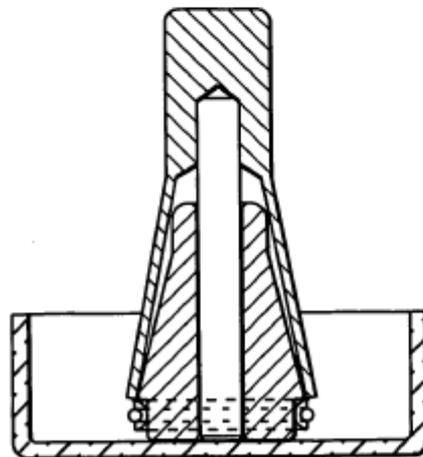


fig. 1D

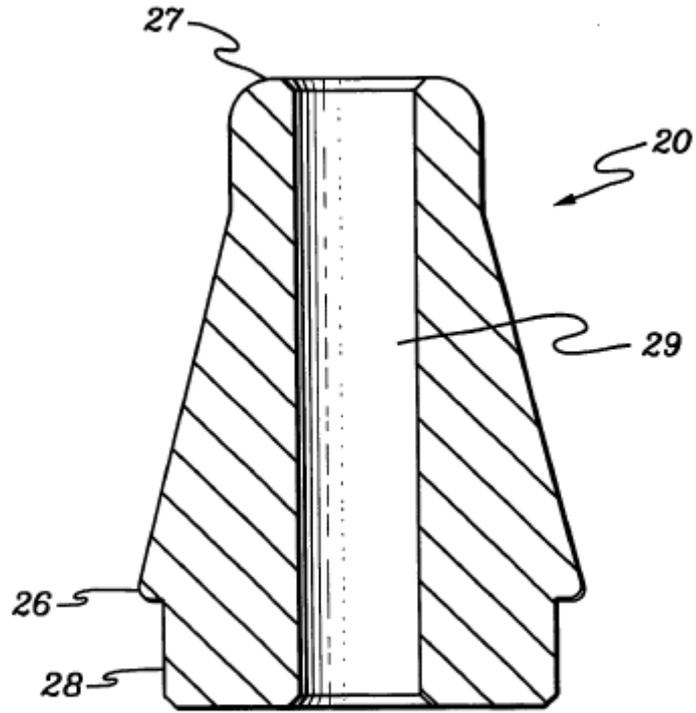


fig. 2

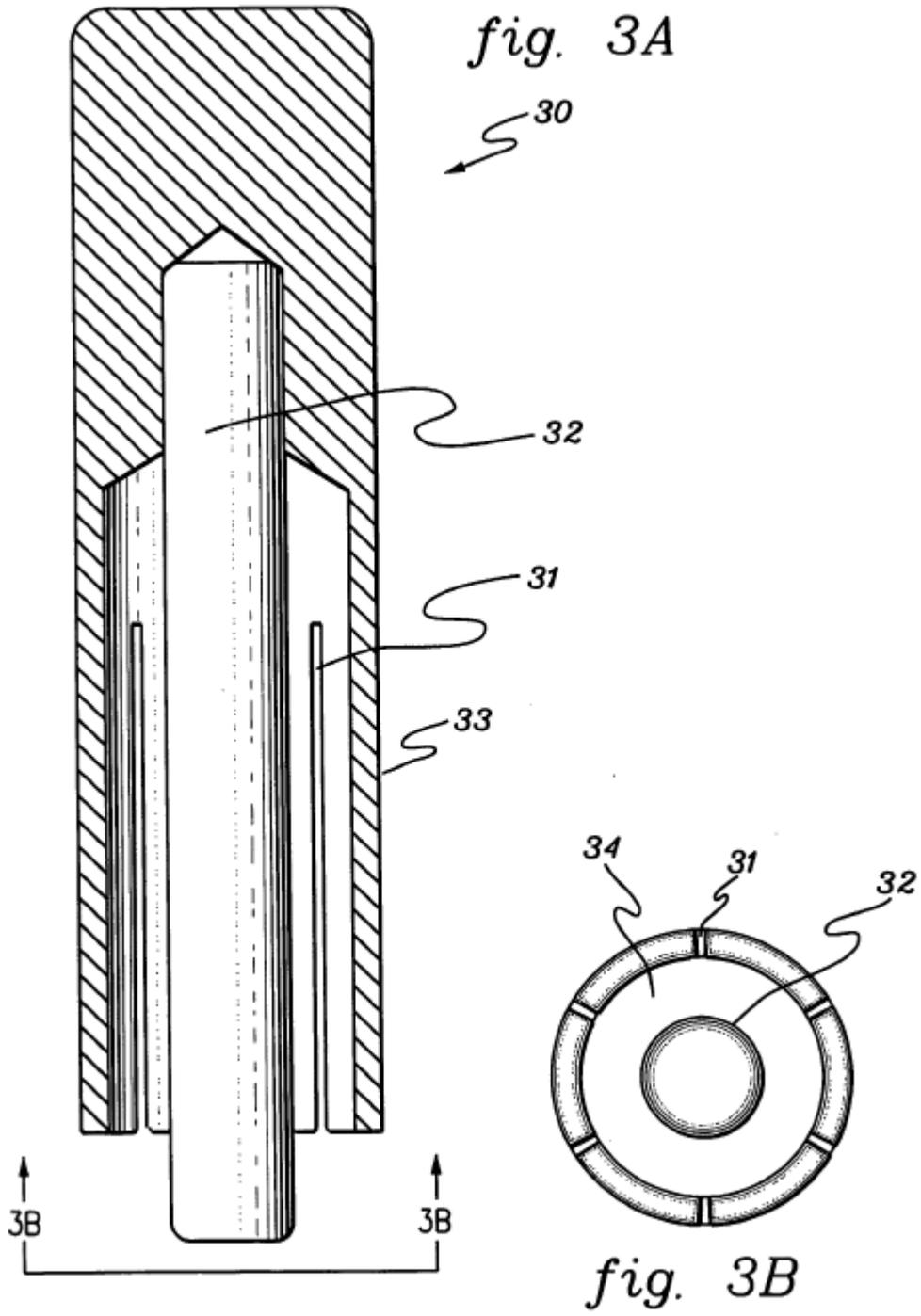




fig. 4A



fig. 4B

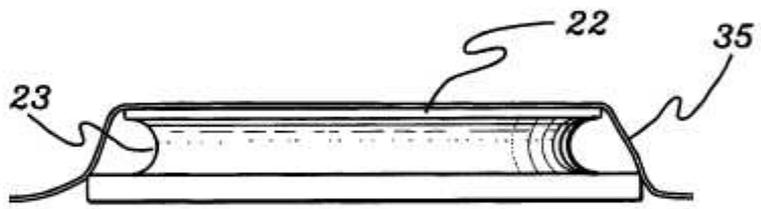


fig. 4C



fig. 4D



fig. 5A



fig. 5B



fig. 5C

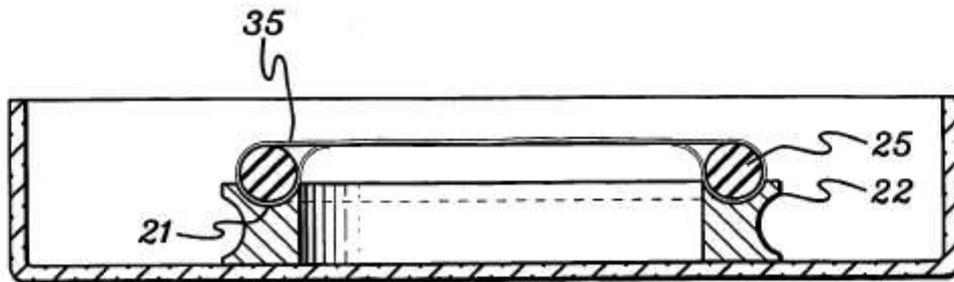
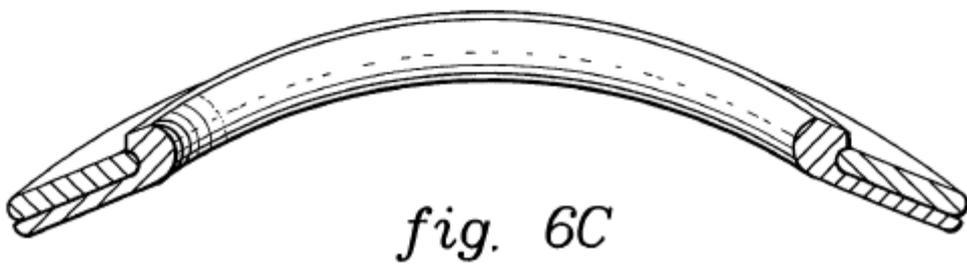
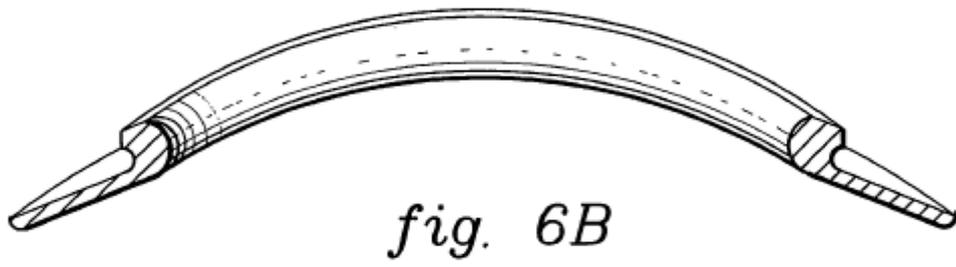
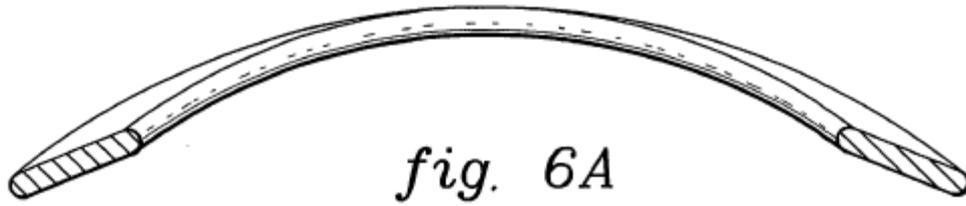
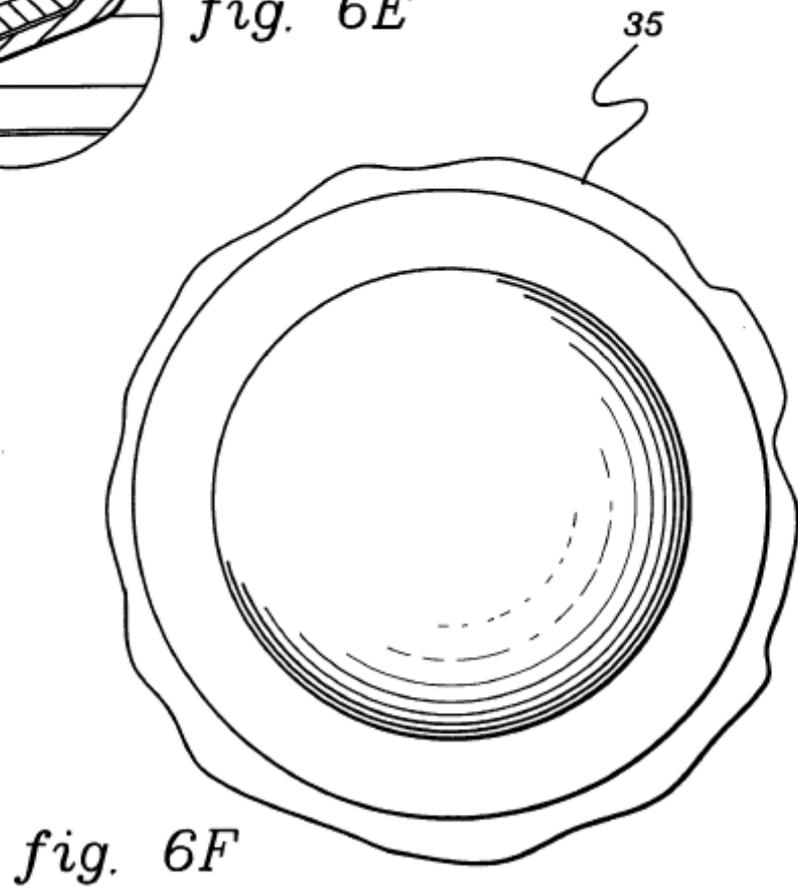
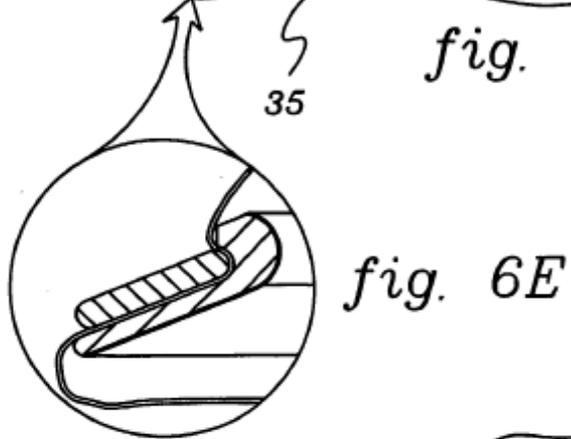
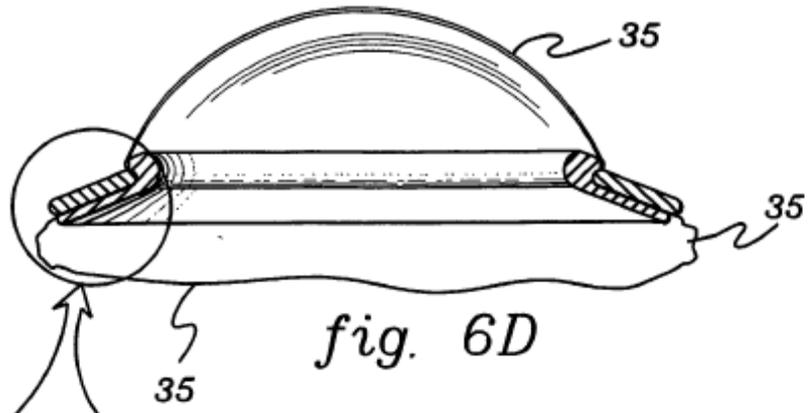
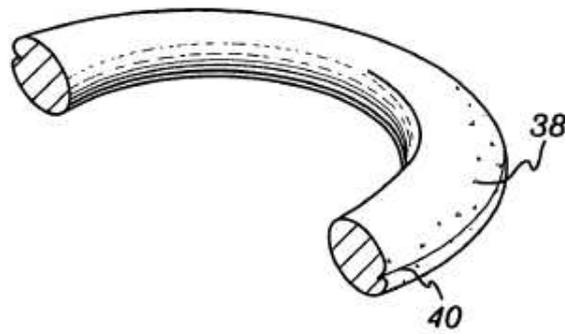
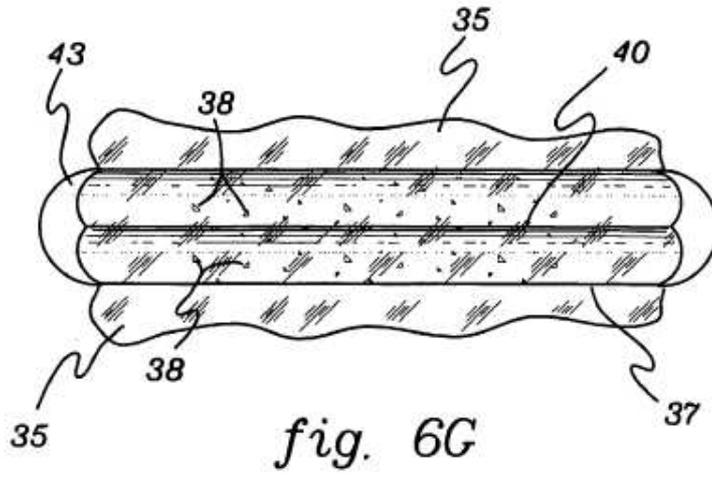
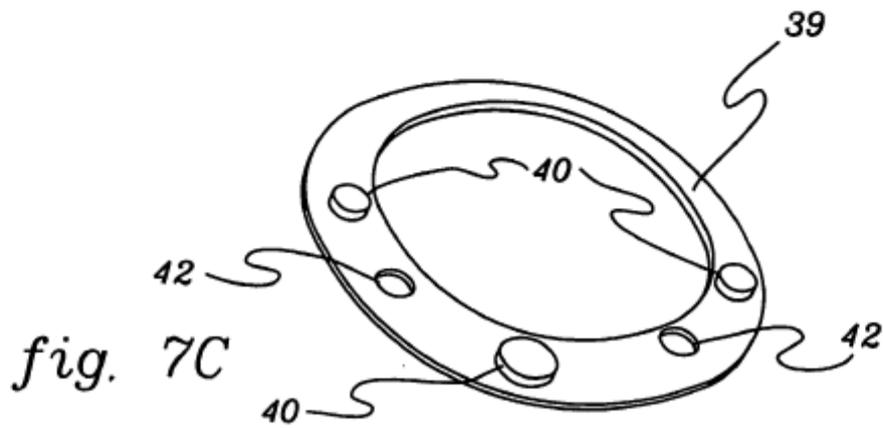
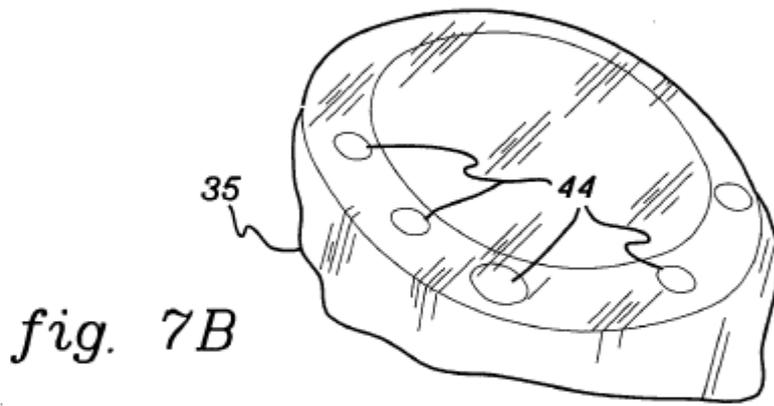
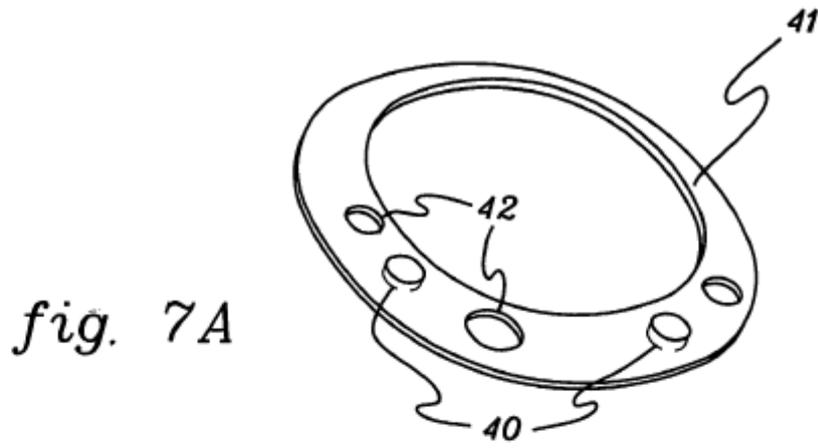


fig. 5D









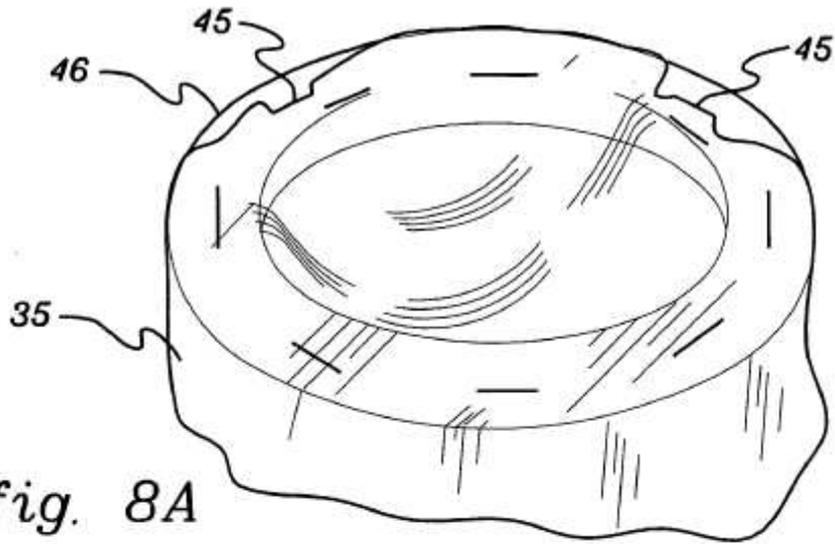


fig. 8A

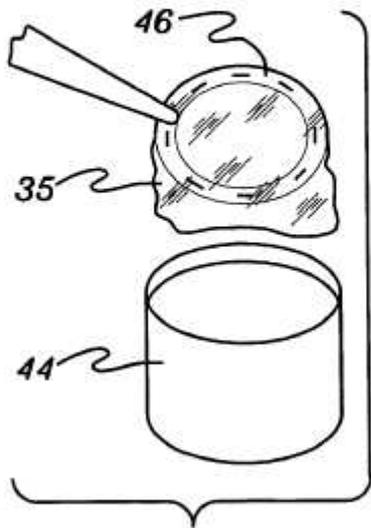


fig. 8B

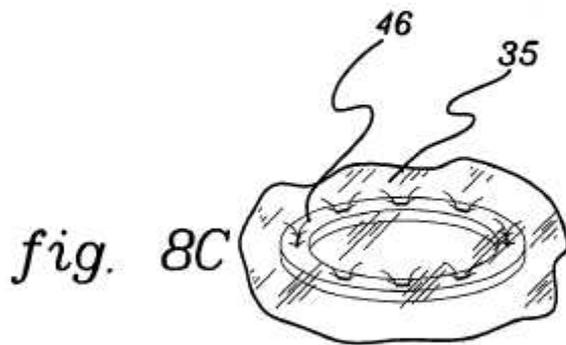


fig. 8C

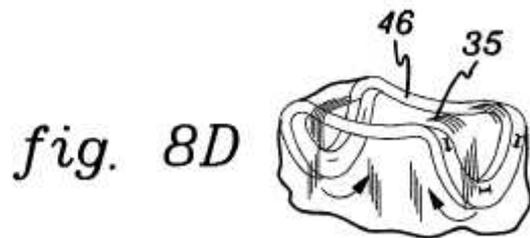
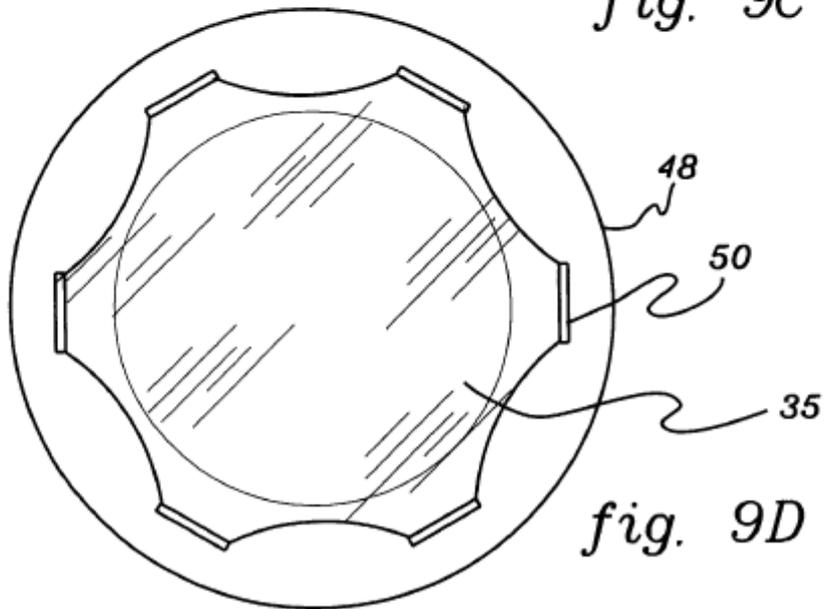
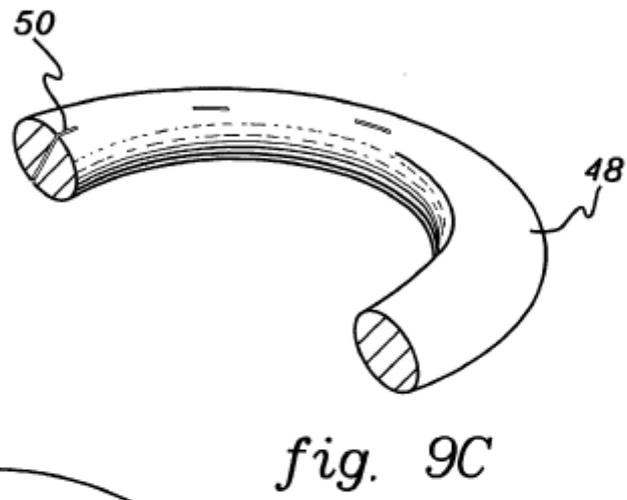
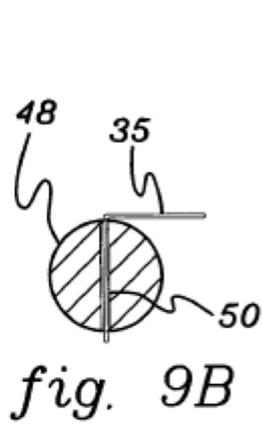
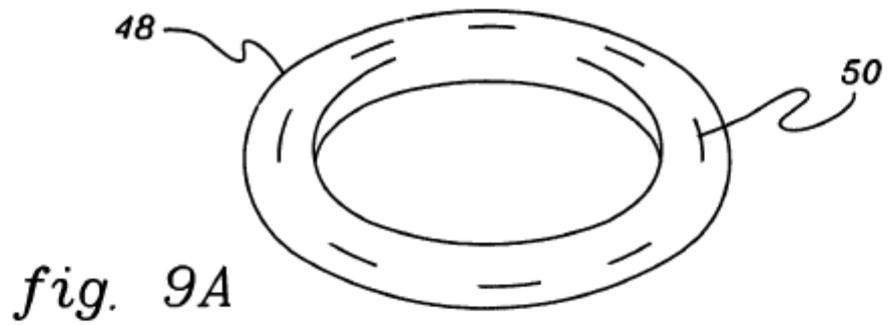
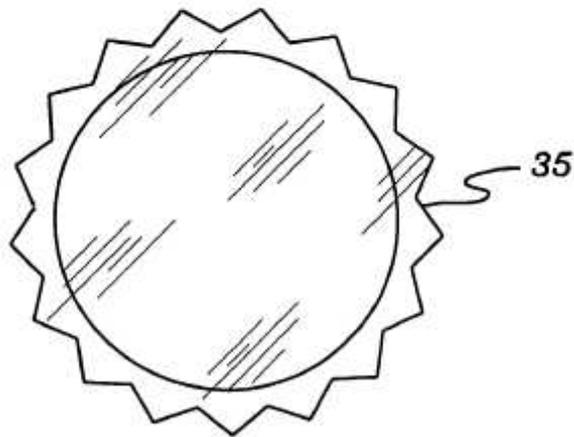
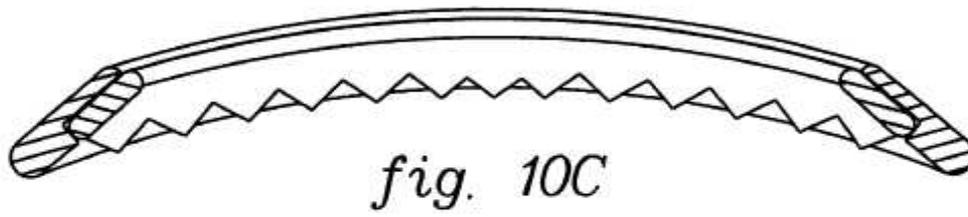
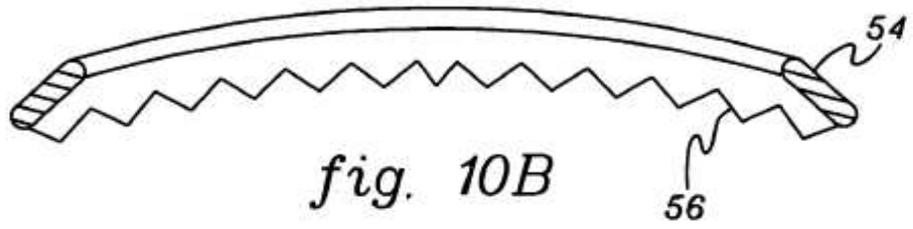
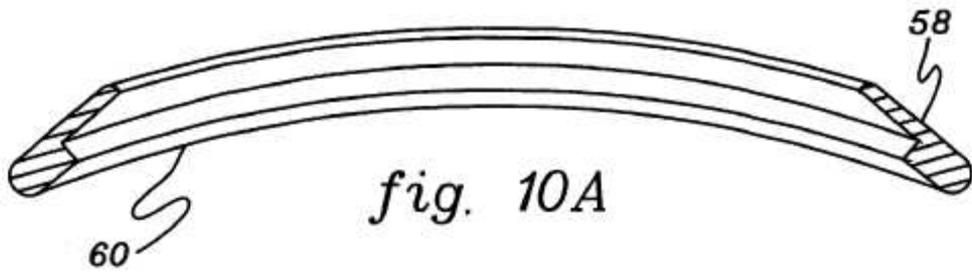


fig. 8D



fig. 8E





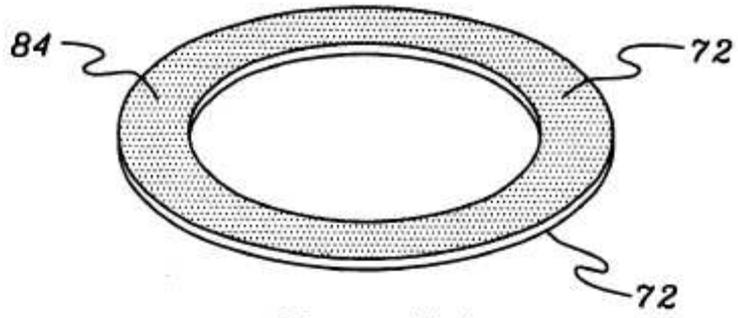


fig. 11A

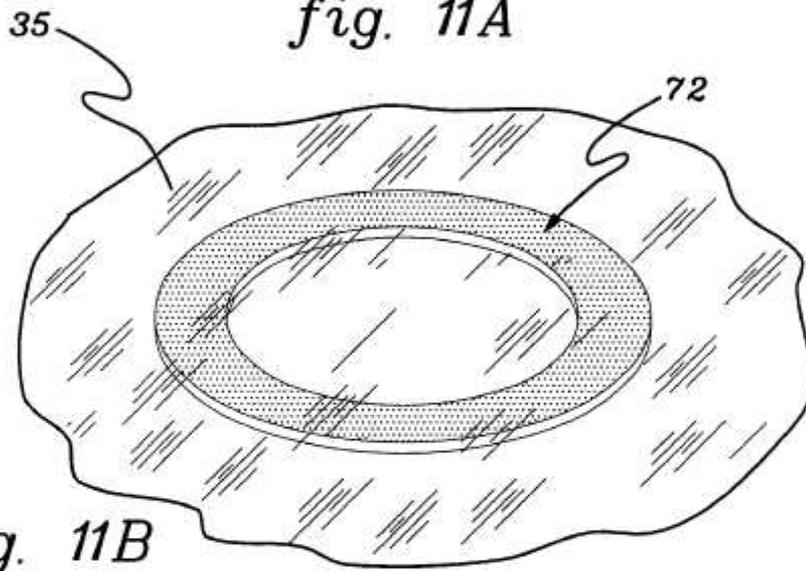


fig. 11B

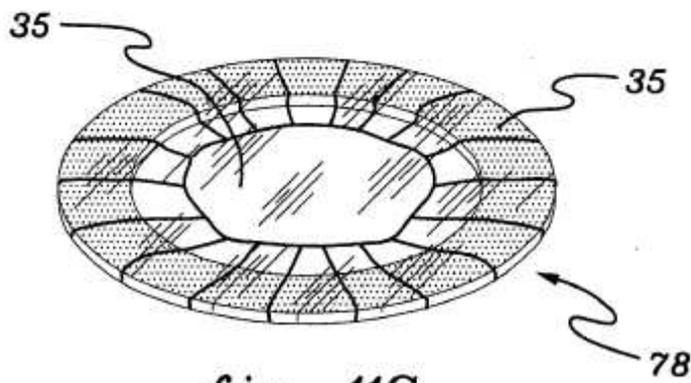


fig. 11C

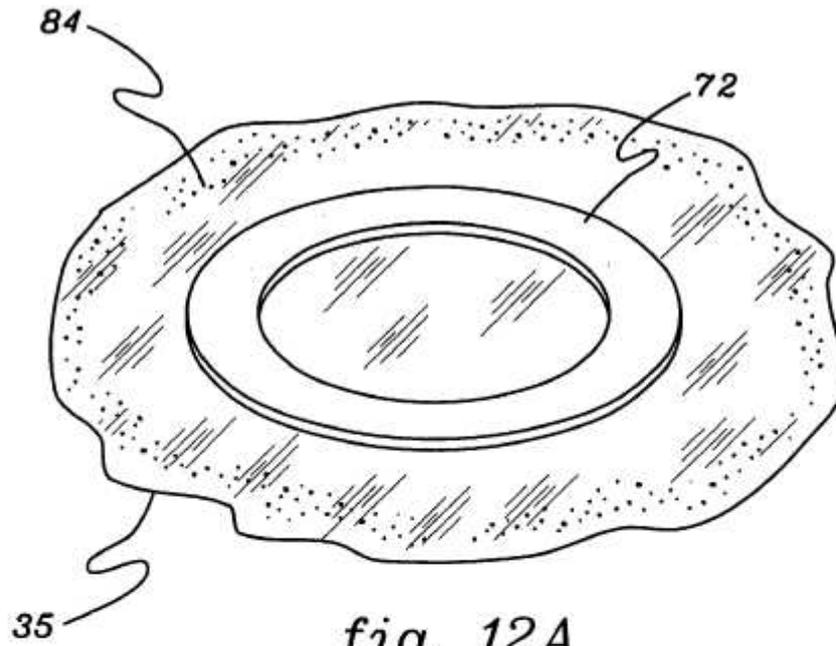


fig. 12A

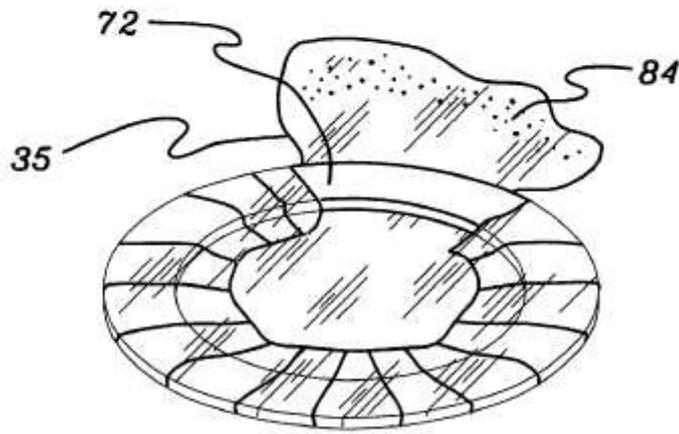
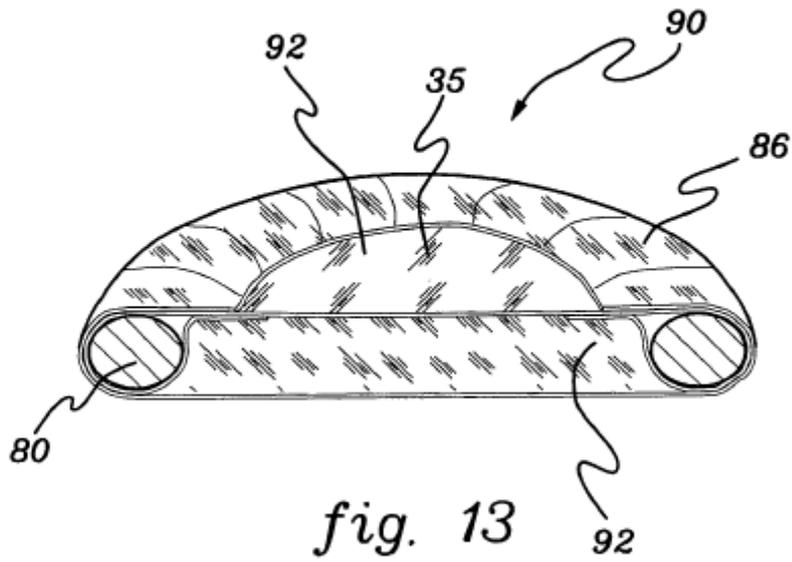


fig. 12B



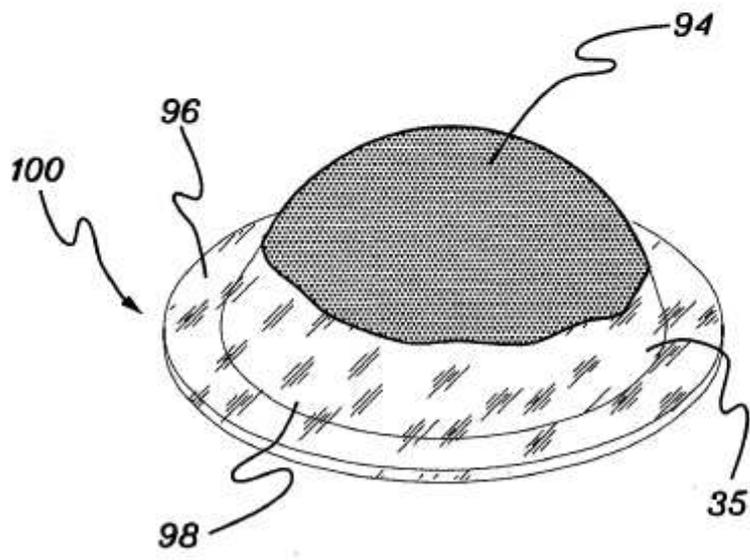
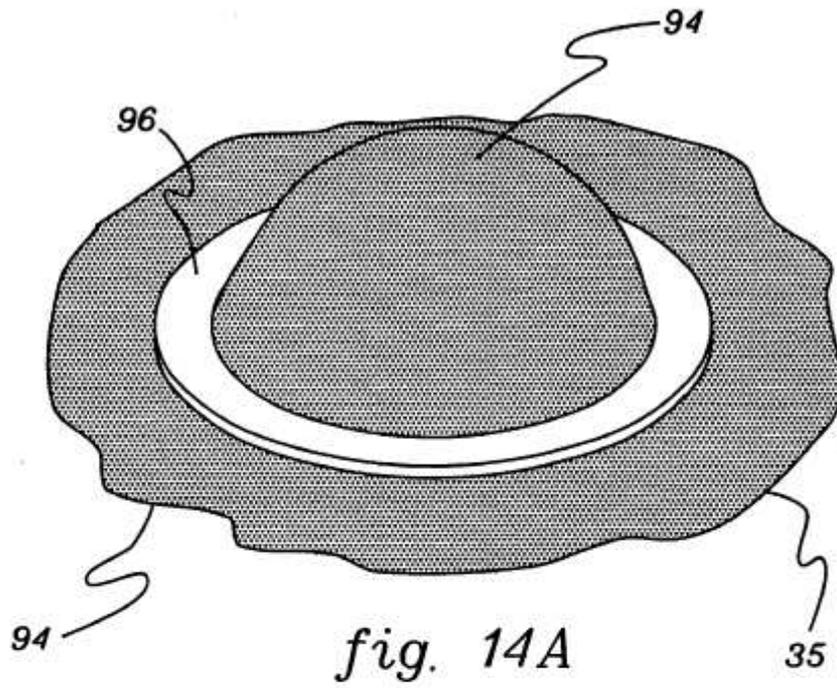


fig. 14B

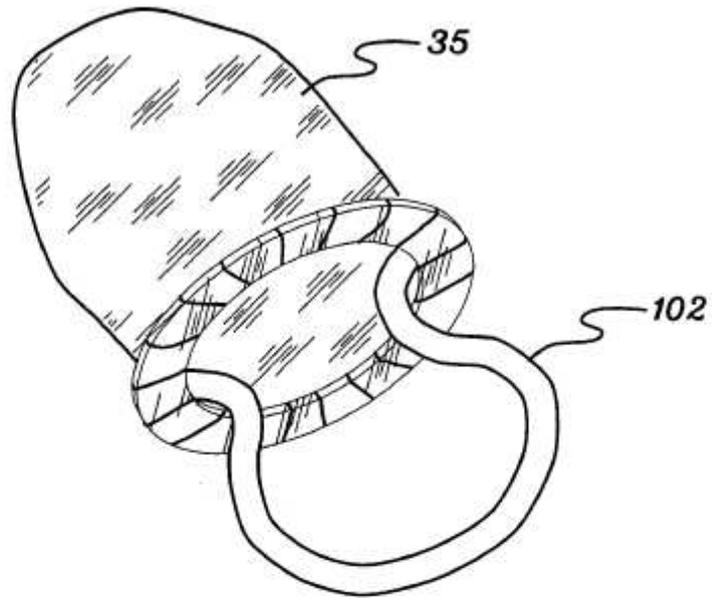


fig. 14C

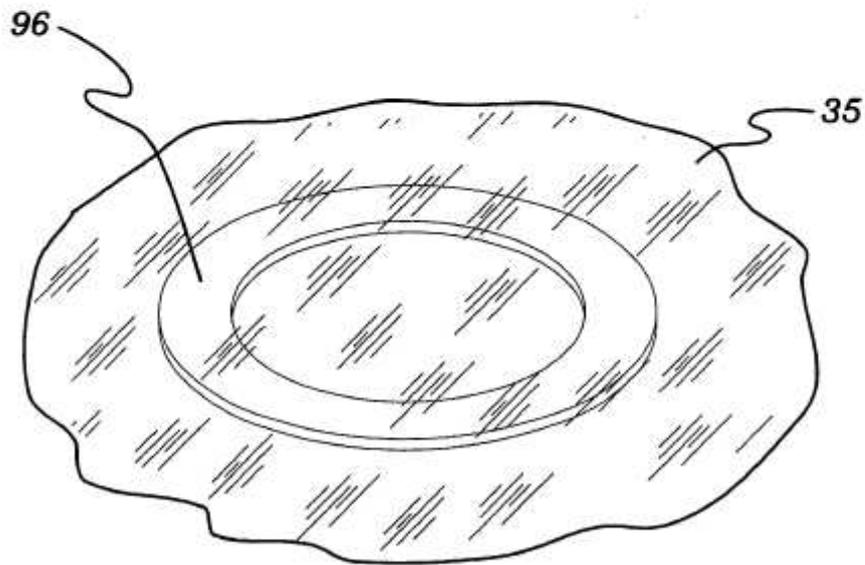


fig. 14D

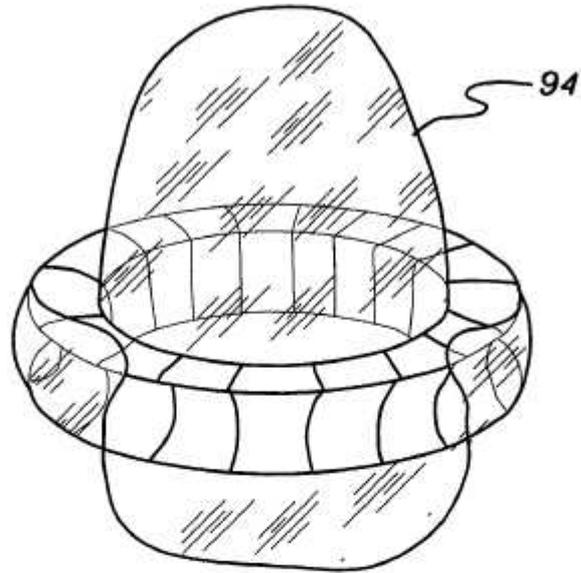


fig. 15A

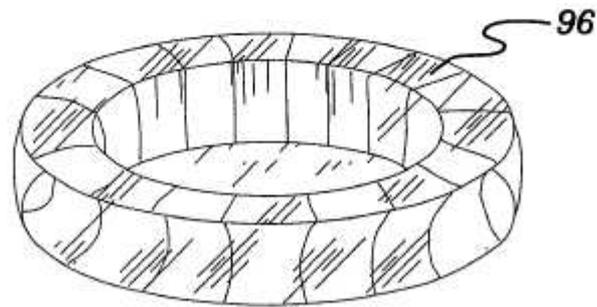
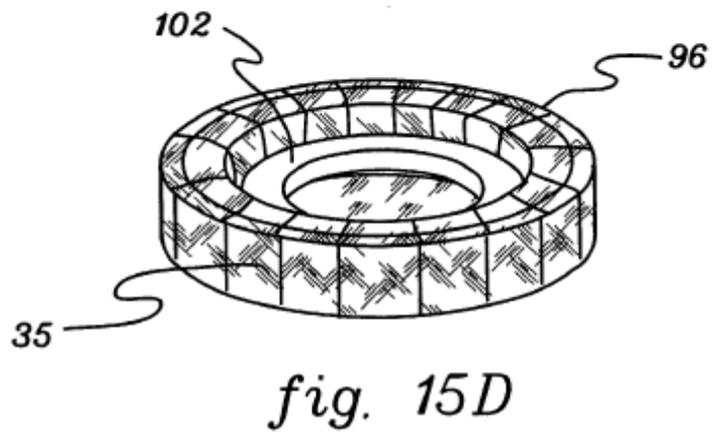
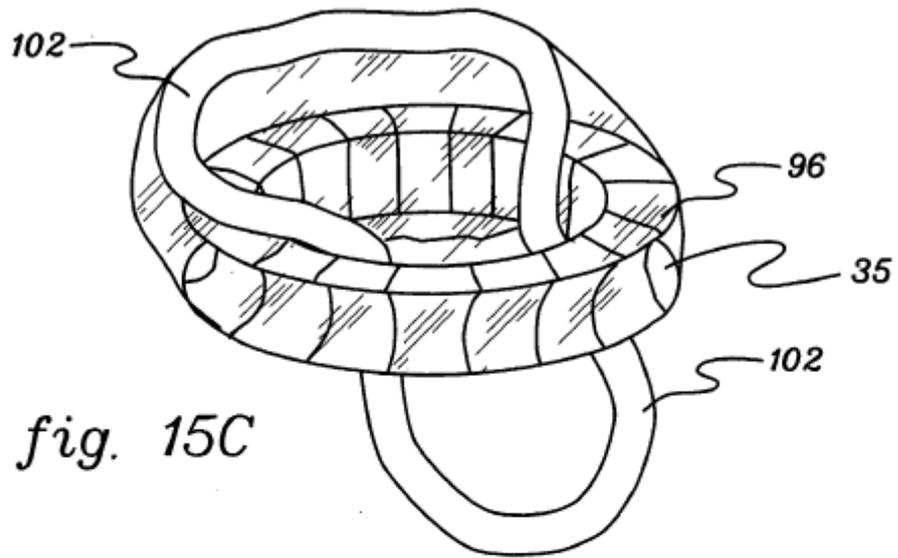


fig. 15B



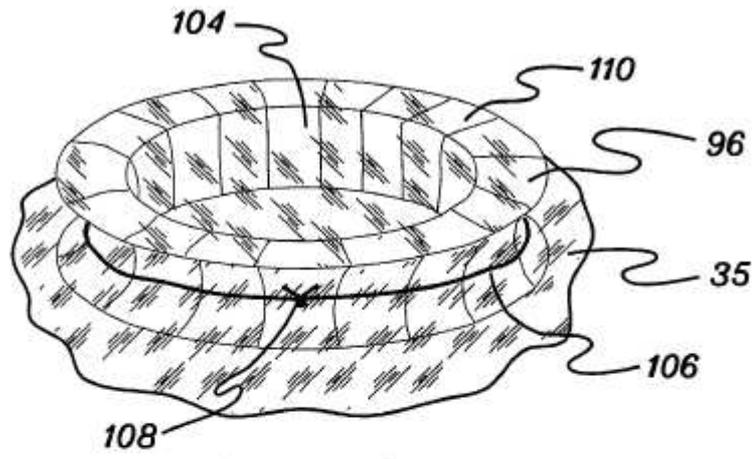


fig. 16A

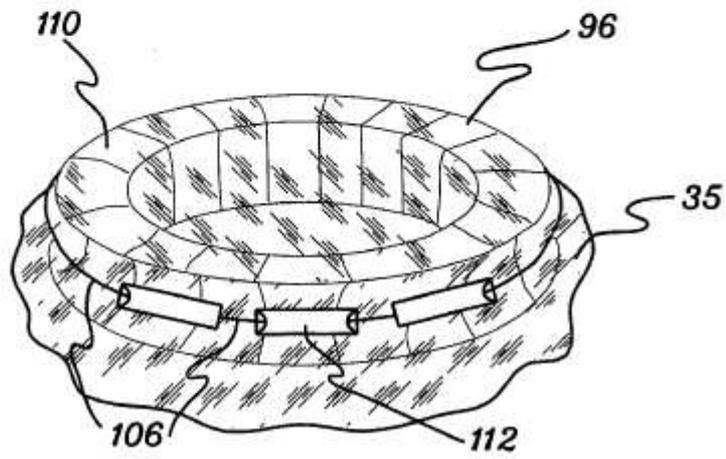


fig. 16B

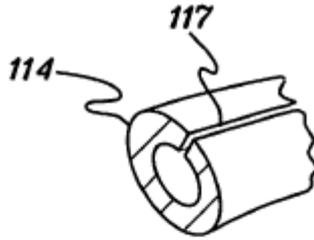


fig. 17A

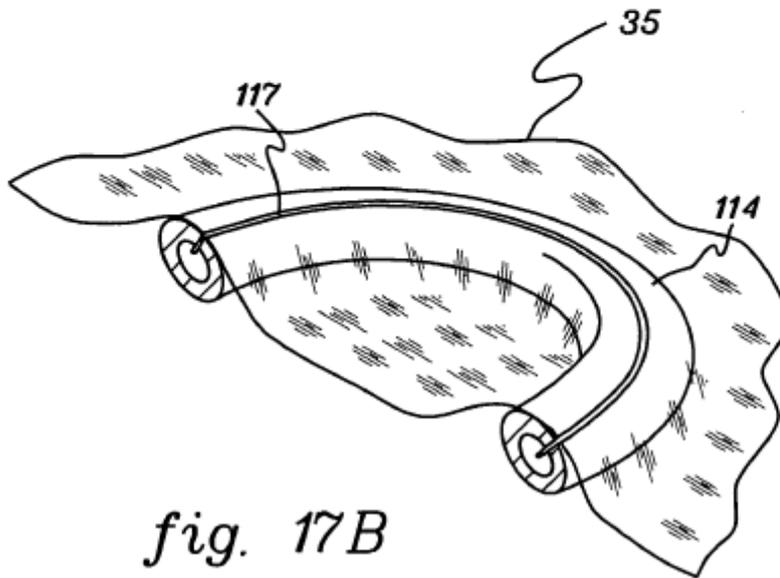
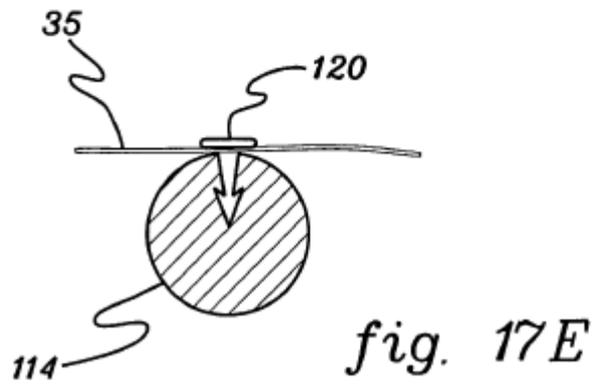
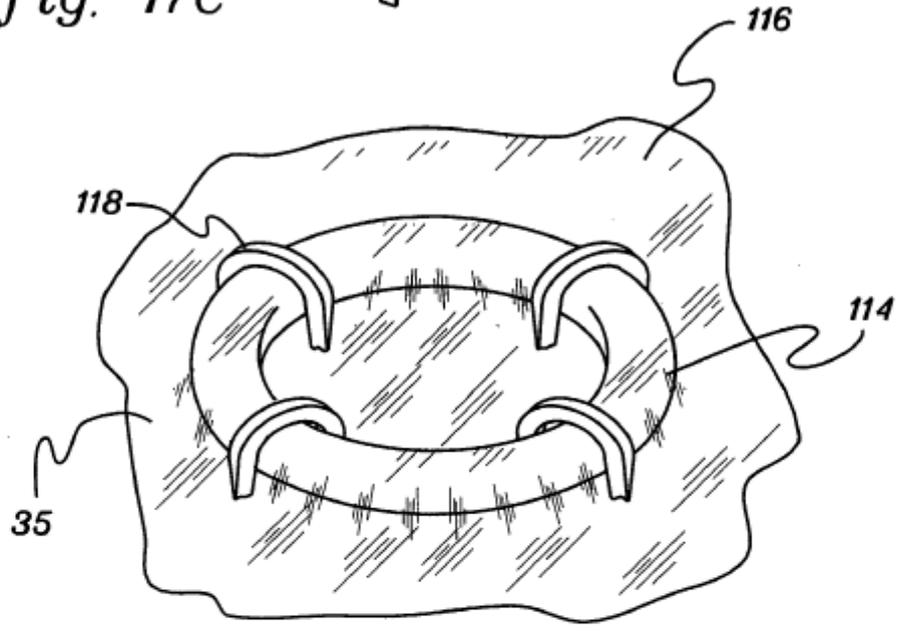
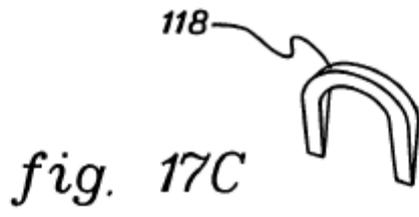
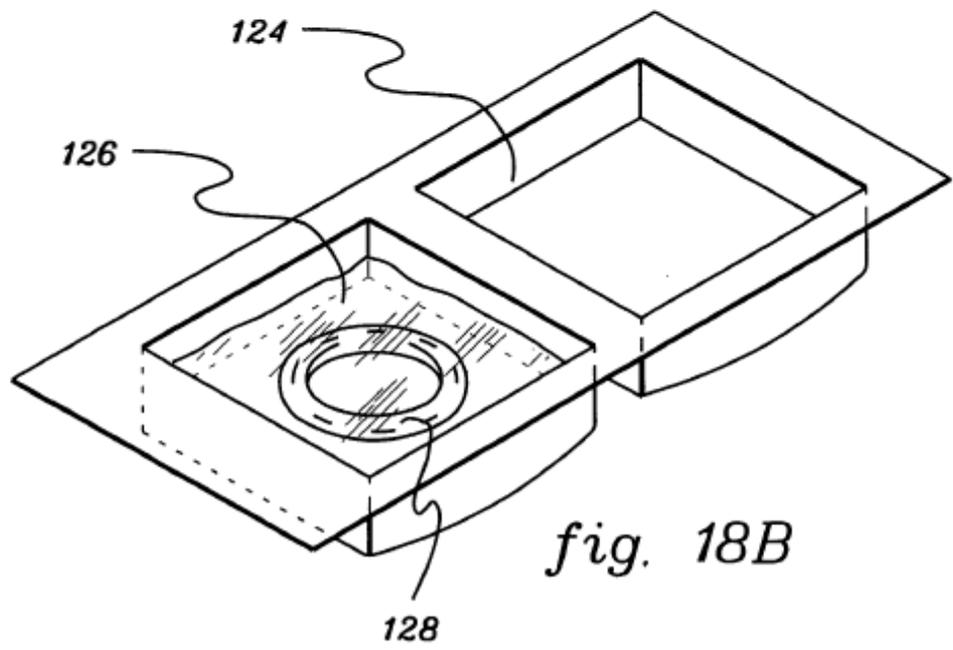
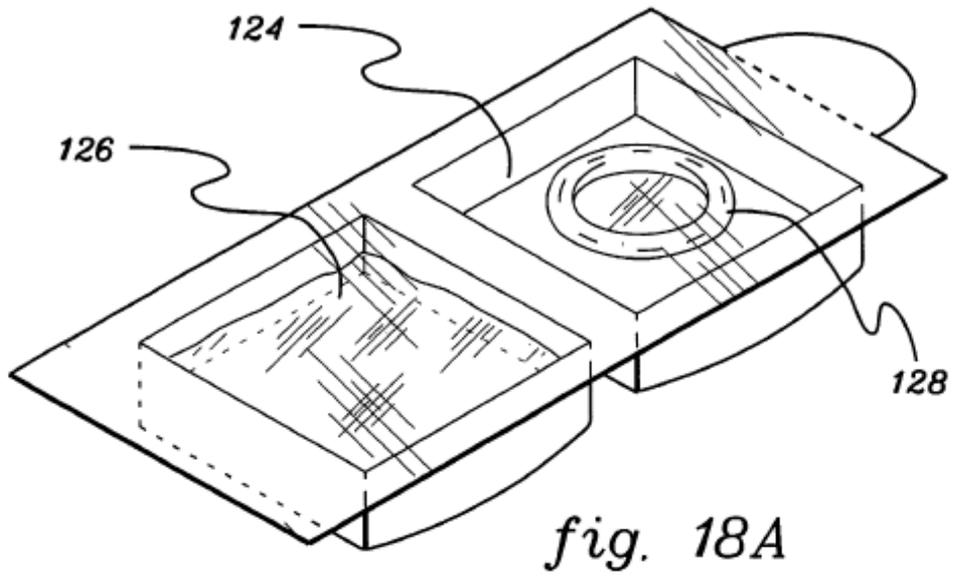


fig. 17B





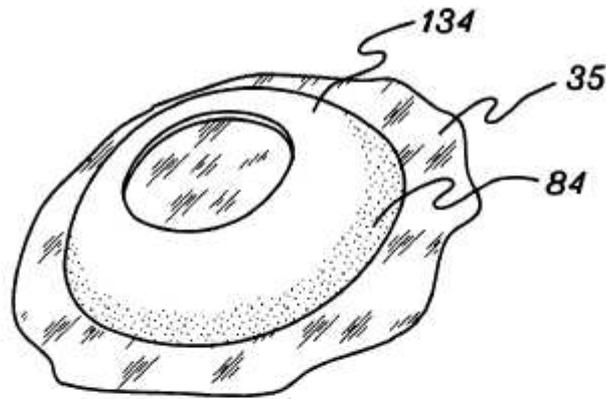


fig. 19A

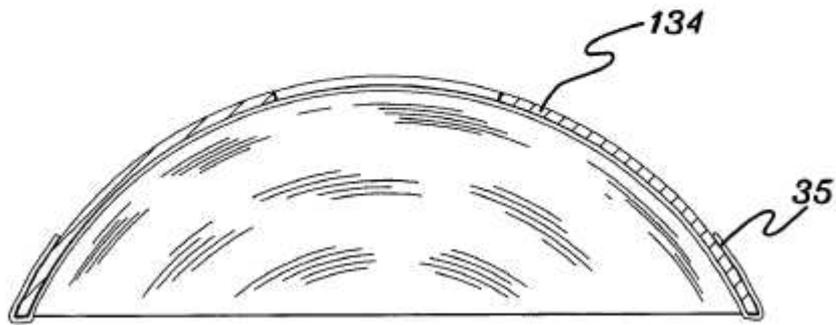


fig. 19B

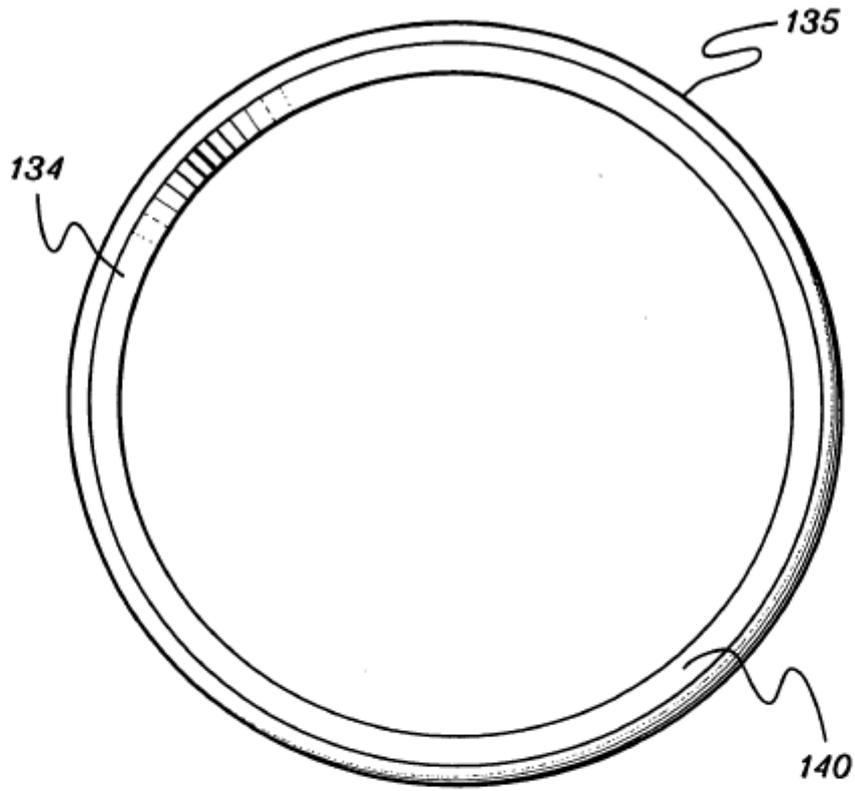


fig. 20A

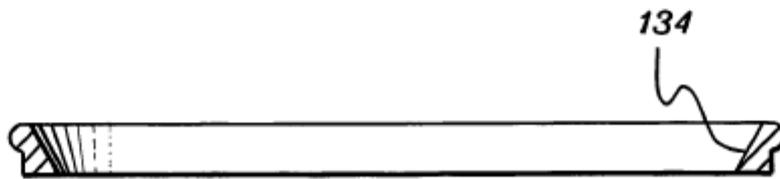


fig. 20B

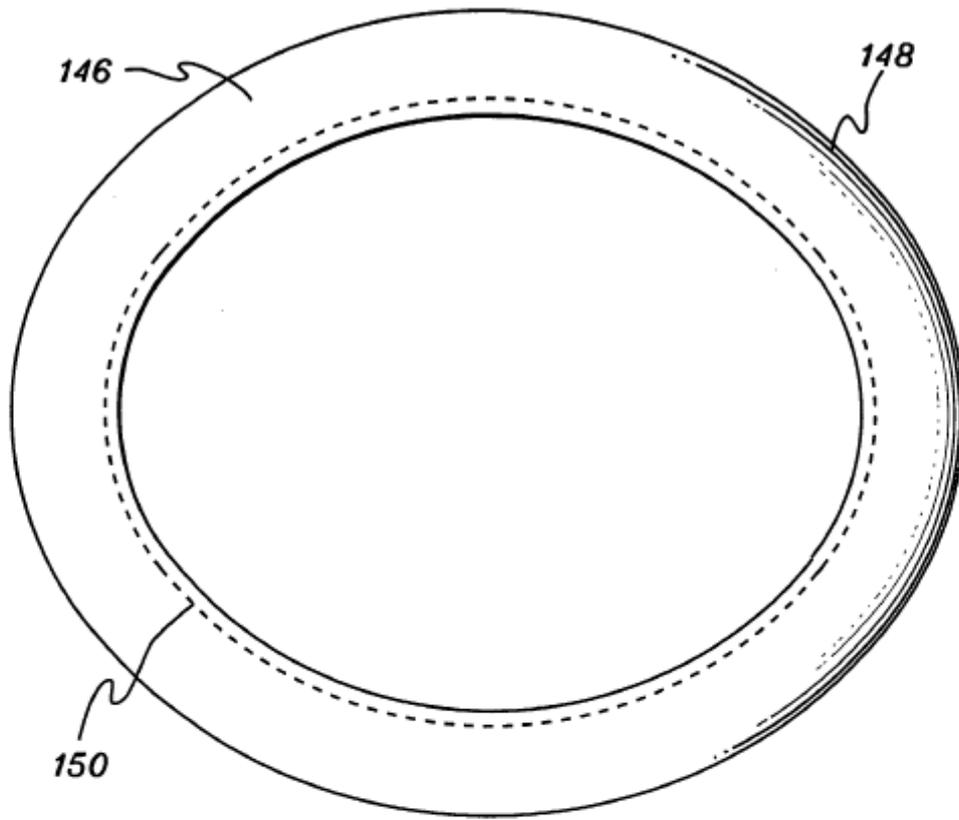


fig. 21A

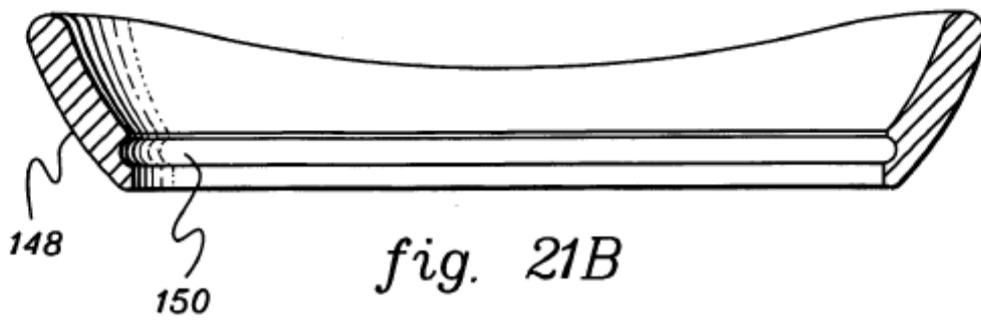


fig. 21B