

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 599**

51 Int. Cl.:

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 31/00 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2010** **E 13198645 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017** **EP 2756853**

54 Título: **Injertos vasculares procedentes de matrices de tejido acelular**

30 Prioridad:

02.09.2009 US 239237 P

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

29.11.2017

73 Titular/es:

LIFECCELL CORPORATION (100.0%)
One Millennium Way
Branchburg, NJ 08876, US

72 Inventor/es:

XU, HUI;
CUI, CUNQUI;
CZECZUGA, JOSHUA y
LOMBARDI, JARED

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 644 599 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

Injertos vasculares procedentes de matrices de tejido acelular

5 La presente descripción se refiere de forma general a injertos vasculares, y más específicamente, a injertos vasculares procedentes de matrices de tejido acelular y métodos de fabricación de los injertos, como se define en las reivindicaciones.

Los recientes avances en los campos de la bioingeniería y la investigación cardiovascular han llevado al desarrollo de nuevas técnicas y materiales para la construcción de conductos vasculares para cirugía de derivación, reparación de vasos sanguíneos dañados o enfermos y otros procedimientos vasculares. Entre los injertos vasculares se incluye una amplia variedad de construcciones sintéticas y biológicas.

10 A pesar de los desarrollos en la tecnología de injertos, la reparación o sustitución de estructuras vasculares sigue siendo un reto, particularmente debido a las complicaciones derivadas del uso de injertos sintéticos, tales como formación de fistulas entéricas, embolización distal, infección y oclusión del injerto, durabilidad limitada y falta de elasticidad del injerto en torno a la anastomosis y, por tanto, necesita de intervención adicional. La aplicación de autoinjertos para sustitución vascular se ve obstaculizada por la limitación dimensional de los injertos recolectados, la morbilidad del sitio donante y los costes quirúrgicos asociados con la recolección de vasos autólogos. Además, un número significativo de pacientes no tienen venas adecuadas para ser injertadas debido a la existencia de enfermedades vasculares previas, extirpación venosa o procedimientos vasculares previos.

20 WO2005023321 describe injertos vasculares con láminas compuestas en capas dispuestas en forma tubular, que comprenden capas de membrana basal y ECM

La presente descripción proporciona métodos y materiales mejorados para la construcción de injertos vasculares.

25 En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo dañado o enfermo. El injerto vascular comprende un conducto tubular que comprende una pared tubular que es impermeable a la sangre y delimita un lumen para el paso de sangre a su través. La pared tubular comprende una lámina de matriz de tejido acelular que tiene una membrana basal. La membrana basal forma una superficie luminal del conducto tubular.

30 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de formación de un injerto vascular. El método comprende las etapas de aporte de una lámina de matriz de tejido acelular que tiene una membrana basal y conformación de la lámina en un conducto tubular. La membrana basal forma una superficie luminal interna del conducto tubular.

Se entiende que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son meramente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención, que se define por las reivindicaciones.

35 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran los métodos y formas de realización de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de diversos aspectos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

40 La FIG. 1A muestra una forma de realización ejemplar de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo dañado o enfermo;

La FIG. 1B muestra una configuración alternativa del injerto vascular representado en la FIG. 1;

La FIG. 2A muestra otra forma de realización ejemplar de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo dañado o enfermo;

45 La FIG. 2B muestra otra forma más de realización ejemplar de un injerto vascular para el tratamiento de un vaso sanguíneo dañado o enfermo;

La FIG. 3 ilustra un método de formación de un injerto vascular de acuerdo con ciertas formas de realización;

Las FIG. 4A-4H son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con hematoxilina y eosina, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

50 Las FIG. 5A-5F son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción de Verhoeff Van Geison, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 6A-6F son micrografías electrónicas de barrido de injertos vasculares explantados, tal y como se

describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 7A y 7B son micrografías electrónicas de transmisión de un injerto vascular explantado y una aorta de rata, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

5 Las FIG. 8A-8D son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra células endoteliales, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 8E-8H son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra el factor Von Willebrand, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 9A-9E son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra células del músculo liso, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

10 Las FIG. 9F-9J son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra fibroblastos, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 10A-10L son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra células T, células B y macrófagos de rata, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

15 Las FIG. 11A-11E son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra IgG de rata, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

Las FIG. 11F-11G son imágenes de secciones histológicas de injertos vasculares explantados sometidos a tinción con anticuerpos contra IgM de rata, tal y como se describe en el Ejemplo 1;

20 La FIG. 12 muestra los resultados de la termoestabilidad de matrices dérmicas acelulares pegadas, tal y como se describe en el Ejemplo 2; y

La FIG. 13 ilustra el efecto de los biopegamentos sobre la propiedad antitrombótica de matrices dérmicas acelulares recubiertas de heparina, tal y como se describe en el Ejemplo 2;

Descripción de las formas de realización ejemplares

25 A continuación, se hará referencia en detalle a ciertas formas de realización de acuerdo con la presente descripción, ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia en todos los dibujos para referirse a las mismas partes o a partes similares.

30 En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, salvo que se indique específicamente lo contrario. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o", salvo que se indique lo contrario. Asimismo, el uso del término "incluyendo", así como de otras formas, tales como "incluye" e "incluido" no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan ambos elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, salvo que se indique específicamente lo contrario. Además, el uso del término "porción" puede incluir parte de un resto o el resto completo.

35 Tal y como se usa en el presente documento, el término "matriz de tejido acelular" se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que esté sustancialmente libre de células y otro material antigénico. En diversas formas de realización, las matrices de tejido acelular procedentes de fuentes humanas o xenogénicas se pueden usar para fabricar las matrices de soporte. Se puede usar piel, partes de la piel (por ejemplo, la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias y tejido conectivo
40 nervioso para crear matrices acelulares para fabricar matrices de soporte tisulares dentro del alcance de la presente descripción.

Los títulos de sección usados en el presente documento sirven meramente para propósitos organizativos y no se deben interpretar como limitantes del tema descrito.

45 En diversas formas de realización, se proporcionan los materiales y métodos de construcción de injertos venosos o arteriales para el tratamiento de defectos en los vasos sanguíneos. En diversas formas de realización, los injertos vasculares se usan para la sustitución de una parte de un vaso sanguíneo dañado o enfermo, por ejemplo, para la sustitución de una porción debilitada de la aorta, el tratamiento de vasos sanguíneos dañados debido a un traumatismo, el tratamiento de enfermedades vasculares causadas por
50 afecciones médicas (por ejemplo, diabetes, enfermedades autoinmunes, etc.). En algunas formas de realización, los injertos vasculares se usan para la derivación y/o sustitución de segmentos estenóticos o parcialmente ocluidos de un vaso sanguíneo, por ejemplo, los injertos de derivación arterial coronaria y de derivación de arterias periféricas.

En algunas formas de realización, un injerto vascular comprende una lámina de material conformada en un conducto tubular. La pared tubular del injerto es impermeable a la sangre a las presiones

hemodinámicas experimentadas por los vasos sanguíneos nativos. En diversas formas de realización, la lámina de material que forma el injerto tubular tiene la suficiente resistencia y durabilidad para su uso en aplicaciones vasculares, y las propiedades mecánicas (por ejemplo, la elasticidad) son similares a las del vaso huésped adyacente. En ciertas formas de realización, el revestimiento luminal del injerto es antitrombótico. En algunas formas de realización, la lámina de material que forma el injerto soporta la remodelación y repoblación tisular del injerto con las células huésped. En ciertas formas de realización, el material que forma el injerto soporta la deposición de células endoteliales en la superficie luminal y la integración de células del músculo liso en la pared tubular del injerto.

Una membrana basal es una fina lámina de material extracelular contigua al aspecto basilar de las células epiteliales. Las láminas de células epiteliales agregadas forman un epitelio. De este modo, por ejemplo, el epitelio de la piel se denomina epidermis y la membrana basal cutánea se encuentra entre la epidermis y la dermis. La membrana basal es una matriz extracelular especializada que aporta una función de barrera y una superficie de fijación para células similares a las epiteliales; sin embargo, no contribuye con un papel estructural o biomecánico significativo al tejido subyacente (por ejemplo, la dermis). Entre los componentes de las membranas basales se incluyen, por ejemplo, la laminina, el colágeno tipo VII y el nidógeno. La organización espacial y temporal de la membrana basal epitelial la distinguen de, por ejemplo, la matriz extracelular dérmica.

La lámina de material incluye una matriz de tejido acelular. La matriz de tejido acelular comprende una membrana basal intacta. La membrana basal forma la superficie luminal del conducto vascular. La membrana basal proporciona una superficie luminal no porosa y continua al injerto y, por consiguiente, impide la pérdida de sangre desde el lumen del injerto. Además, la membrana basal puede soportar el crecimiento de células endoteliales e impedir la trombosis. La membrana basal puede, por lo tanto, permitir la formación de un revestimiento endotelial que impida las pérdidas y/o la trombosis, pero no necesita siembra o cultivo con células exógenas.

La matriz de tejido acelular se puede formar a partir de varios tejidos diferentes que incluyan una membrana basal. Por ejemplo, la matriz de tejido acelular se puede formar a partir de la piel, la vejiga urinaria, el intestino, el tejido pericárdico, el peritoneo o combinaciones de tejidos. Un biomaterial adecuado para la formación de la matriz acelular procede de piel humana, tal como ALLODERM[®], que está disponible en (LifeCell Corp, Branchburg, NJ). ALLODERM[®] es una matriz dérmica acelular humana que ha sido procesada para eliminar tanto la epidermis como las células que pueden llevar al rechazo del tejido y al fallo del injerto, sin dañar las proteínas dérmicas y la membrana basal. En otra forma de realización ejemplar, la matriz de tejido acelular comprende una matriz pericárdica generada mediante procesamiento de tejido pericárdico manteniendo la integridad de la membrana basal. En otra forma de realización más, la matriz de tejido acelular procede de la membrana peritoneal, que se procesa para eliminar las células manteniendo la membrana basal intacta. La fabricación de matrices de tejido acelular adecuadas se describe con más detalle a continuación.

En diversas formas de realización, la superficie luminal del injerto se modifica usando agentes antitrombóticos y/o anticalcificación para inhibir la oclusión del injerto tras la cirugía. En otras formas de realización, la superficie luminal del injerto vascular se trata con factores de crecimiento que mejoran la proliferación de células endoteliales a lo largo de la superficie luminal.

Para conformar una lámina de matriz de tejido acelular en un tubo, se adhieren los bordes opuestos de la lámina entre sí. Los bordes se adhieren entre sí usando un adhesivo biológicamente compatible o una combinación de suturas y al menos un adhesivo, para formar una unión hermética a los fluidos que se extiende longitudinalmente a lo largo de la longitud del injerto. En algunas formas de realización, los bordes de la lámina enrollada se aseguran mediante tratamiento térmico y con presión. Entre las suturas adecuadas se incluyen, por ejemplo, las suturas de polipropileno (PROLENE[®]), y pueden ser continuas o interrumpidas. Entre los adhesivos adecuados se incluyen, por ejemplo, el pegamento de fibrina, los adhesivos tisulares a base de cianoacrilato (por ejemplo, DERMABOND[®]) y los adhesivos tisulares de quitosano.

La FIG. 1A muestra una forma de realización ejemplar de un injerto vascular 10 de acuerdo con la presente descripción. El injerto 10 comprende una lámina de material 12 que está enrollada en una construcción tubular que define un lumen 13 y una pared tubular 15 que tiene una superficie luminal 17 y una superficie abluminal 19. Los bordes longitudinales 14, 16 de la lámina se ponen en contacto entre sí en el lado abluminal de la construcción tubular y se adhieren usando suturas quirúrgicas bioadhesivas y bioadhesivos a lo largo de la longitud del injerto. La adhesión de los bordes longitudinales 14, 16 crea un cordón longitudinal 18 que sobresale por encima de la superficie abluminal 19 y se extiende a lo largo de la longitud del injerto tubular. En una forma de realización, el cordón longitudinal 18 está doblado y adherido a la superficie abluminal 19 del injerto 10, tal y como se muestra en la FIG. 1B. El cordón longitudinal 18 se asegura a la pared tubular 15 a lo largo de la longitud del injerto usando suturas, adhesivos o una combinación de ambos.

La FIG. 2A muestra una forma de realización ejemplar de un injerto vascular 20 de acuerdo con la presente descripción (que no forma parte de la invención). El injerto 20 comprende una lámina de material

22 que está enrollada en una estructura tubular que define un lumen 23. La lámina de material 22 forma una pared tubular 21 que tiene una superficie luminal 27 y una superficie abluminal 29. La lámina 22 comprende un primer borde longitudinal 24 y un segundo borde longitudinal 26 en los extremos opuestos de la lámina 22. Cuando la lámina 22 se enrolla en un tubo, el segundo borde longitudinal 26 se extiende por encima del primer borde 24 para definir una región solapada multicapa 25 que se extiende entre el primer borde 24 y el segundo borde 26. La región solapada 25 se sella a lo largo de la longitud del injerto usando suturas y/o adhesivos. En ciertas formas de realización, el intervalo de solapamiento es de al menos el 10% de la anchura de una lámina individual de material.

Se pueden formar injertos vasculares adecuados usando varias técnicas. Generalmente, los injertos se fabricarán en base a un tamaño, una longitud y unos requisitos biomecánicos deseados y necesarios para una determinada ubicación del implante seleccionada. Por ejemplo, un injerto diseñado para su uso como injerto vascular aórtico, generalmente tendrá un tamaño y unas propiedades biomecánicas (por ejemplo, resistencia al estallido) superiores a las necesarias para otra ubicación, que experimente presiones inferiores y transporte menos flujo de sangre.

En diversas formas de realización, el espesor de la lámina de material es consistente con el espesor de pared de un vaso sanguíneo que se vaya a sustituir por el injerto vascular. En ciertas formas de realización, la lámina de material se dimensiona de forma que concuerde con el espesor de pared de un vaso sanguíneo nativo.

En algunas formas de realización, los injertos se pueden formar enrollando una lámina de material a un tamaño predeterminado (es decir, el diámetro luminal). En algunas formas de realización, tal y como se ilustra en la Fig. 3, se puede formar un injerto vascular envolviendo una lámina de biomaterial 32 alrededor de la superficie exterior de un vástago o tubo cilíndrico 30. Una sección longitudinal de la lámina 34 se dobla alrededor de un vástago cilíndrico 30. En una forma de realización, se coloca un vástago de bloqueo 35 paralelo al vástago cilíndrico 30, tal y como se muestra en la FIG. 3, para bloquear la sección 34 contra el vástago cilíndrico. También se puede usar una sutura tensa entre dos soportes para bloquear la sección 34 contra el vástago cilíndrico. A continuación, se enrolla el vástago al menos 360° en torno a un eje longitudinal 31 del vástago para envolver la lámina de material alrededor de la superficie exterior del vástago. En una forma de realización, la lámina 32 se envuelve alrededor del vástago múltiples veces para formar un injerto multicapa. Una vez que la lámina está envuelta alrededor del vástago cilíndrico, el borde externo 36 de la lámina se asegura a una capa subyacente de lámina, tal y como se ilustra en la FIG. 2 (que no forma parte de la invención).

En una forma de realización, se adhieren tiras adhesivas 38 a la lámina 32 en múltiples posiciones a lo largo del ancho de la lámina, tal y como se muestra en la FIG. 3. En tal forma de realización, las tiras adhesivas 38 unen la lámina 32 a una capa subyacente de material a medida que la lámina se envuelve alrededor del vástago cilíndrico 30.

El diámetro interno del injerto tubular es sustancialmente igual al diámetro externo del vástago o tubo cilíndrico 30. Por lo tanto, el diámetro del vástago o tubo se selecciona de forma que coincida con el diámetro luminal del vaso sanguíneo nativo que se va a sustituir por la construcción de injerto. En una forma de realización, el diámetro del vástago es de aproximadamente entre 4-5 mm, el cual se usa para la construcción de injertos vasculares de diámetro pequeño (< 6 mm). En otra forma de realización, el espesor de pared del tubo es de 1 mm. Una vez que se ha envuelto la lámina alrededor del vástago y se ha asegurado el(los) borde(s) longitudinal(es), el vástago se retira del interior de la lámina enrollada. En otra forma de realización, el tubo se estira longitudinalmente para deslizar la lámina fuera del tubo. El material del vástago cilíndrico se selecciona de tal forma que inhiba la adhesión de la lámina a la superficie exterior del vástago. En una forma de realización ejemplar, el vástago cilíndrico usado es un vástago de vidrio. En otra forma de realización, el tubo cilíndrico usado es un tubo de goma. En otra forma más de realización, el tubo usado es un tubo de silicona.

Matrices de tejido acelular adecuadas

En algunas formas de realización, las matrices de tejido acelular adecuadas pueden, por ejemplo, retener ciertas funciones biológicas, tales como el reconocimiento celular, la unión celular y la capacidad de soportar la propagación celular, la proliferación celular, la integración celular y la diferenciación celular. Tales funciones se pueden aportar, por ejemplo, mediante proteínas colaginosas no desnaturalizadas (por ejemplo, colágeno tipo I) y una variedad de moléculas no colaginosas (por ejemplo, proteínas que sirvan como ligandos para moléculas tales como receptores de integrinas, moléculas con alta densidad de carga tales como glucosaminoglicanos (por ejemplo, hialuronano) o proteoglicanos u otras adhesinas). En algunas formas de realización, las matrices de tejido acelular pueden retener ciertas funciones estructurales, entre las que se incluyen el mantenimiento de la arquitectura histológica y el mantenimiento de la disposición tridimensional de los componentes tisulares. Las matrices de tejido acelular descritas en el presente documento también pueden, por ejemplo, exhibir características físicas deseables tales como resistencia, elasticidad, y durabilidad, porosidad definida y retención de macromoléculas. Las matrices de tejido acelular adecuadas pueden ser entrecruzadas o no entrecruzadas.

En algunas formas de realización, el material de injerto es susceptible de ser remodelado mediante infiltración de células, tales como células diferenciadas del tejido huésped relevante, células madre tales como células madre mesenquimales o células progenitoras. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante formación del material de matriz injertado a partir de tejido idéntico al tejido huésped circundante, pero tal identidad no es necesaria.

Tal remodelación puede estar dirigida por los componentes de la matriz de tejido acelular y las señales procedentes del tejido huésped circundante (tales como citoquinas, componentes de la matriz extracelular, estímulos biomecánicos y estímulos bioeléctricos) anteriormente descritos. Por ejemplo, la presencia de células madre mesenquimales en la médula ósea y la circulación periférica se ha documentado en la bibliografía y han demostrado regenerar una variedad de tejidos musculoesqueléticos [Caplan (1991) J. Orthop. Res. 9:641-650; Caplan (1994) Clin. Plast. Surg. 21:429-435; y Caplan et al. (1997) Clin Orthop. 342:254-269]. Además, el injerto debería aportar cierto grado (superior al valor umbral) de resistencia a la tracción y resistencia biomecánica durante el procedimiento de remodelación.

Las matrices de tejido acelular se pueden fabricar a partir de una variedad de tejidos de partida. Por ejemplo, la matriz de tejido acelular se puede producir a partir de cualquier tejido blando que contenga colágeno y un esqueleto muscular (por ejemplo, dermis, fascias, pericardio, dura, cordones umbilicales, placenta, válvulas cardíacas, ligamentos, tendones, tejido vascular (arterias y venas tales como las venas safenas), tejido conectivo neural, tejido de la vejiga urinaria, tejido del uréter o tejido intestinal), siempre y cuando la matriz retenga las propiedades anteriormente descritas.

Aunque una matriz de tejido acelular se puede hacer a partir de uno o más individuos de la misma especie como receptores del injerto de matriz de tejido acelular, esto no es necesariamente el caso. Por tanto, por ejemplo, una matriz de tejido acelular se puede hacer a partir de tejido porcino y se puede implantar en un paciente humano. Entre las especies que pueden servir como receptores de matrices de tejido acelular y como donantes de tejidos u órganos para la fabricación de la matriz de tejido acelular se incluyen, sin limitación, los humanos, los primates no humanos (por ejemplo, los monos, los babuinos o los chimpancés), los cerdos, las vacas, los caballos, las cabras, las ovejas, los perros, los gatos, los conejos, los conejillos de indias, los jerbos, los hamsters, las ratas o los ratones. Resultan de particular interés como donantes los animales (por ejemplo, cerdos) que han sido modificados mediante ingeniería genética para que no tengan el resto α -galactosa terminal. Para consultar descripciones de animales apropiados, véase la solicitud de Estados Unidos pendiente de tramitación con número de serie 10/896.594 y la patente de Estados Unidos No. 6.166.288, cuyas descripciones se incluyen como referencia en su totalidad en el presente documento.

En algunas formas de realización, LifeCell Corporation (Branchburg, NJ) fabrica una matriz de tejido acelular secada por congelación a partir de dermis humana y la comercializa en forma de láminas pequeñas como ALLODERM®. El crioprotector usado para la congelación y secado del ALLODERM® es una solución de maltodextrina al 35% y etilendiaminotetracetato (EDTA) 10 mM. Por tanto, el producto final secado contiene aproximadamente un 60% en peso de matriz de tejido acelular y aproximadamente un 40% en peso de maltodextrina. LifeCell Corporation también fabrica un producto análogo hecho de dermis porcina (denominado XENODERM) que tiene las mismas proporciones de matriz de tejido acelular y maltodextrina que el ALLODERM®.

Como alternativa al uso de tales animales diseñados por ingeniería genética como donantes, se pueden tratar tejidos y órganos apropiados, antes o después de su descelularización, con la enzima α -galactosidasa, que elimina los restos α -galactosa terminales (α -gal) de las cadenas de sacáridos de, por ejemplo, las glicoproteínas. Métodos de tratamiento de tejidos con α -galactosidasa para eliminar estos restos se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.331.319.

En una implementación, bien antes o bien después de que se hayan matado las células de la matriz de tejido acelular, el material que contiene colágeno se somete a digestión *in vitro* del material que contiene colágeno con una o más glucosidasas, y particularmente galactosidasas, tales como la α -galactosidasa. En particular, se eliminan los epítomos α -gal mediante tratamiento enzimático con α -galactosidasas.

Los residuos de N-acetilactosamina son epítomos que normalmente se expresan en las células humanas y de mamíferos y, por tanto, no son inmunogénicos. La digestión *in vitro* del material que contiene colágeno con glucosidasas se puede lograr mediante diversos métodos. Por ejemplo, el material que contiene colágeno se puede empapar o incubar en una solución tamponada que contenga glucosidasa. Alternativamente, una solución tamponada que contenga la glucosidasa se puede forzar a presión al interior del material que contiene colágeno mediante un procedimiento de lavado pulsátil.

La eliminación de los epítomos α -gal del material que contiene colágeno puede disminuir la respuesta inmunitaria frente al material que contiene colágeno. El epítomo α -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de Sudamérica), así como en macromoléculas tales como los proteoglicanos de los componentes extracelulares. U. Galili et al., J. Biol. Chem. 263: 17755 (1988). Sin embargo, este epítomo está ausente en los primates del Viejo Mundo (monos de Asia y África y simios) y los humanos. *Id.* Los anticuerpos anti-gal se producen en humanos y primates como resultado de una

respuesta inmune a estructuras de carbohidratos de epítipo α -gal de bacterias gastrointestinales. U. Galili et al., *Infect. Immun.* 56: 1730 (1988); R. M. Hamadeh et al., *J. Clin. Invest.* 89: 1223 (1992).

5 Como los mamíferos que no son primates (por ejemplo, los cerdos) producen epítipos α -gal, el xenotrasplante mediante inyección de material que contiene colágeno de estos mamíferos en primates deriva, con frecuencia, en rechazo debido a la unión de anti-gal de primate a estos epítipos en el material que contiene colágeno. Esta unión tiene como resultado la destrucción del material que contiene colágeno por fijación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. U. Galili et al., *Immunology Today* 14: 480 (1993); M. Sandrin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11391 (1993); H. Good et al., *Transplant. Proc.* 24: 559 (1992); B. H. Collins et al., *J. Immunol.* 154: 5500 (1995). Asimismo, el xenotrasplante provoca una activación importante del sistema inmune para producir mayores cantidades de anticuerpos anti-gal de alta afinidad. Por consiguiente, la eliminación sustancial de los epítipos α -gal de las células y los componentes extracelulares del material que contiene colágeno y la prevención de la reexpresión de epítipos α -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune frente al material que contiene colágeno asociada a la unión del anticuerpo anti-gal a los epítipos α -gal.

15 Las matrices de tejidos acelulares adecuadas para su uso en la presente descripción se pueden fabricar mediante una variedad de métodos, siempre y cuando su fabricación de lugar a matrices con las propiedades biológicas y estructurales anteriormente descritas. En general, las etapas implicadas en la fabricación de una matriz de tejido acelular incluyen la recolección del tejido de un donante, por ejemplo, un cadáver humano o de cualquiera de los mamíferos anteriormente citados), el tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación estructural y bioquímica junto con, o seguido de, la eliminación celular en condiciones que preserven de manera similar la función estructural y biológica. La solución estabilizante inicial detiene e impide la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege frente a la contaminación microbiana y reduce el daño mecánico que se puede producir con tejidos que contengan, por ejemplo, componentes del músculo liso (por ejemplo, vasos sanguíneos). La solución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, uno o más antibióticos, uno o más inhibidores de proteasas y, en algunos casos, un relajante del músculo liso. En algunas formas de realización ejemplares, el tejido recolectado (por ejemplo, tejido dérmico) se trata con una solución química desepitelizante para eliminar el epitelio de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se empapa una muestra que comprende tejido dérmico humano o porcino durante toda la noche en una solución de NaCl 1 M a temperatura ambiente para eliminar la capa epitelial. En ciertas formas de realización, la concentración de la solución de NaCl se aumenta a 1,5 M para garantizar la eliminación completa de la capa epitelial.

A continuación, se coloca el tejido en una solución de descelularización para eliminar las células viables (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar el complejo de la membrana basal ni la integridad biológica y estructural de la matriz de colágeno. La solución de descelularización puede contener un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes (por ejemplo, TRITON X-100™, desoxicolato sódico, monooleato de polioxietileno(20)sorbitano), uno o más agentes para impedir el entrecruzamiento, uno o más inhibidores de proteasas y/o una o más enzimas. En algunas formas de realización, la solución de descelularización comprende un 1% de TRITON X-100™ en un medio de RPMI con gentamicina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM. En algunas formas de realización, el tejido se incuba en la solución de descelularización durante toda la noche a 37°C con agitación suave a 90 rpm. En ciertas formas de realización, se pueden usar detergentes adicionales para eliminar la grasa de la muestra de tejido. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se añade desoxicolato sódico al 2% a la solución de descelularización para el tratamiento de las membranas peritoneales.

Después del proceso de descelularización, la muestra de tejido se lava a fondo con solución salina. En algunas formas de realización ejemplares, por ejemplo, cuando se usa material xenogénico, a continuación, se trata el tejido descelularizado durante toda la noche a temperatura ambiente con una solución de desoxirribonucleasa (ADNasa). En algunas formas de realización, la muestra de tejido (por ejemplo, peritoneo y tejido pericárdico) se trata con una disolución de ADNasa preparada en tampón ADNasa (HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM). Opcionalmente, se puede añadir una solución de antibiótico (por ejemplo, gentamicina) a la solución de ADNasa.

Después de lavar el tejido a fondo con solución salina para eliminar la solución de ADNasa, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar cualquier antígeno inmunogénico presente en la muestra. Como se ha indicado anteriormente, la muestra de tejido se puede tratar con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítipos α -gal presentes en el tejido. En algunas formas de realización, la muestra de tejido se trata con α -galactosidasa a una concentración de 300 U/L preparada en tampón fosfato 100 mM a pH 6,0. En otras formas de realización, la concentración de α -galactosidasa se incrementa a 400 U/L para que se produzca una eliminación adecuada de los epítipos α -gal del tejido recolectado (por ejemplo, en el tratamiento de tejidos dérmicos procedentes de porcino).

Tras la eliminación completa de los componentes celulares muertos y/o lisado, de los antígenos que

pueden provocar inflamación y de cualquier agente de eliminación celular bioincompatible, la matriz se puede tratar con un agente de criopreservación y se puede criopreservar y, opcionalmente, secar por congelación otra vez en las condiciones necesarias para mantener las propiedades biológicas y estructurales de la matriz descritas. Después de la criopreservación o secado por congelación, la matriz de tejido acelular se puede descongelar o rehidratar, respectivamente. Generalmente, todas las etapas se llevan a cabo en condiciones asépticas, preferentemente estériles.

Una vez que se ha formado la matriz de tejido acelular, opcionalmente, se pueden sembrar células viables e histocompatibles en la matriz de tejido acelular para fabricar un injerto que posteriormente pueda ser remodelado por el huésped. En una forma de realización, las células viables e histocompatibles se pueden añadir a las matrices mediante técnicas estándar de cocultivo celular *in vitro* antes de su trasplante, o mediante repoblación *in vivo* después de su trasplante. La repoblación *in vivo* se puede hacer mediante migración de las propias células del receptor a la matriz de tejido acelular o mediante infusión o inyección *in situ* de células obtenidas a partir del receptor o células histocompatibles de otro donante en la matriz de tejido acelular.

Los tipos de células seleccionados para su reconstitución pueden depender de la naturaleza del tejido u órgano cuya matriz de tejido acelular se está remodelando. Por ejemplo, las células endoteliales son importantes para la reconstitución de conductos vasculares. Tales células revisten la superficie interna del tejido y se pueden expandir en cultivo. Las células endoteliales pueden proceder directamente del paciente receptor previsto o de venas o arterias umbilicales, y se pueden usar para reconstituir una matriz de tejido acelular y la composición resultante se puede injertar al receptor. Alternativamente, se pueden añadir células cultivadas (autólogas o alogénicas) a la matriz de tejido acelular. Tales células se pueden, por ejemplo, hacer crecer en condiciones estándar de cultivo tisular y, a continuación, añadir a la matriz de tejido acelular. En otra forma de realización, las células se pueden hacer crecer en y/o sobre una matriz de tejido acelular en un cultivo tisular. Las células que han crecido en y/o sobre una matriz de tejido acelular en un cultivo tisular se pueden obtener directamente de un donante apropiado (por ejemplo, el receptor previsto o un donante alogénico) o se pueden hacer crecer primero en un cultivo tisular en ausencia de la matriz de tejido acelular.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para dar una explicación mejor de diversas formas de realización y no se deben interpretar en ningún modo como limitantes del alcance de la presente descripción.

Ejemplo 1. Estudio funcional de injertos vasculares procedentes de matrices dérmicas

Se formaron injertos vasculares usando ALLODERM[®], que es una matriz dérmica acelular humana (HADM, por sus siglas en inglés) disponible en LifeCell Corporation (Branchburg, NJ). La HADM se proporcionó en láminas de un espesor comprendido entre 0,3-0,5 mm. La HADM se empapó en solución salina durante 30 min y, a continuación, se cortó en una sección de 0,5 x 1,5 cm. La HADM ALLODERM[®] incluye una membrana basal intacta y las secciones de HADM se enrollaron en tubos con la membrana basal a lo largo de la superficie luminal del tubo. Los tubos se suturaron a lo largo del borde de unión para crear una construcción de tubo de una única capa.

A continuación, se ensayaron los injertos vasculares en un modelo de sustitución de aorta abdominal de rata. Se anestesió a veinte ratas de Lewis macho adultas (9-11 semanas de edad) con 40 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal y se realizó una incisión en la línea media abdominal de cada rata. Se extirpó un segmento de 1 cm de la aorta abdominal, desde debajo de las arterias renales hasta justo encima de la bifurcación aórtica, a través de la incisión en la línea media. El segmento arterial extirpado se sustituyó por un injerto vascular procedente de HADM. Los injertos se implantaron en posición ortotópica, con anastomosis de extremo a extremo usando suturas interrumpidas de nylon 9-0. La calidad del injerto y el grado de cicatrización del sitio de implantación se registraron en cuatro puntos de valoración del estudio (1, 3, 6 y 12 meses). Se sacrificaron cinco animales en cada punto de valoración. Se extirpó 1 cm del injerto vascular y 0,5 cm de material de tejido huésped más allá de las anastomosis (longitud total del explante de 2 cm) de cada animal sacrificado, junto con una muestra del bazo y el nódulo linfático. Las secciones explantadas se usaron para análisis de histología, inmunohistoquímica, MEB (microscopía electrónica de barrido) y MET (microscopía electrónica de transmisión). Las muestras extirpadas, que representan la porción media del injerto y la interfaz injerto-tejido huésped, se colocaron en formalina al 10% o glutaraldehído al 8% (para análisis MEB y MET) para su fijación y posterior análisis.

Observación clínica

Todos los animales que recibieron el injerto vascular tuvieron una recuperación posquirúrgica normal y se mantuvieron o ganaron peso durante el periodo de estudio, de forma similar a los animales no operados. Catorce animales sobrevivieron hasta su fecha de sacrificio predeterminada sin indicios clínicos de fallo del implante, que se evidenciaban por limitación del movimiento de las piernas y cambios patológicos en las piernas. Un animal murió cuatro días después de la implantación debido a hemorragia interna. No hubo evidencia alguna de infección en el sitio quirúrgico de ningún animal durante el estudio. La observación general de los injertos vasculares explantados no evidenció estenosis, aneurisma, hiperplasia, dehiscencia de las suturas ni formación de trombos. Además, la mayoría de los injertos

explantados tenían superficies lumbales lisas y no se observaron indicios de calcificación. Dos de los injertos (explantados a los 6 y 12 meses) mostraron áreas más rígidas que la estructura vascular normal, que sugerían calcificación vascular. Todos los injertos se integraron bien con la aorta nativa de rata en el sitio de anastomosis.

5 Histología

Las secciones de injerto explantadas se procesaron con tinción H&E (hematoxilina y eosina) y tinción Verhoeff Van Geison. La tinción H&E de una sección transversal de injerto representativa a los 3 meses (FIG. 4A y 4B) y a los 12 meses (FIG. 4C-4G) demostró la presencia de fibroblastos poblando los injertos y de unas pocas células endoteliales revistiendo la superficie luminal de los injertos. Las FIG. 4A-4E son secciones transversales de tinciones H&E tomadas en la porción media de los injertos; las FIG. 4F y 4G son secciones transversales de tinciones H&E tomadas en el sitio de anastomosis y la FIG. 4H es una tinción H&E de un injerto que nunca se implantó y se usó como control en el estudio.

La histología del sitio de anastomosis extirpado mostró una integración tisular completa y una transición suave del injerto al vaso sanguíneo huésped. Se observó una leve infiltración de células inflamatorias al cabo de 1 mes, pero el nivel disminuyó a lo largo del tiempo y a los 3 meses no se observaron células inflamatorias, lo que indica que no se produjo inflamación crónica inducida por los injertos implantados.

Las FIG. 5A y 5B muestran secciones transversales de tinciones de Verhoff tomadas en la porción media de los injertos; las FIG. 5C y 5D muestran secciones transversales de tinciones de Verhoff tomadas en el sitio de anastomosis, la FIG. 5E muestra la tinción de Verhoff de una aorta normal de rata y la FIG. 5F muestra un injerto vascular preimplante usado como control. La tinción de Verhoff de las secciones transversales del injerto indicó que la neomedía era rica en colágeno y que las células parecían presentar una amplia deposición de elastina.

Análisis MEB y MET

Las FIG. 6A-6F son micrografías MEB de injertos vasculares fabricados tal y como se describe anteriormente. Las MEB de injertos preimplante no mostraron estructuras celulares en la superficie de la membrana basal, tal y como se muestra en la FIG. 6A. Los injertos vasculares explantados a 1 mes tenían células endoteliales en sus superficies lumbales (FIG. 6B) y a los 3 meses, las células de tipo endotelial cubrían completamente la superficie luminal (FIG. 6C). La interfaz del injerto y la aorta de rata mostraba la anastomosis intacta, tal y como se muestra en la FIG. 6D. La superficie del injerto a los 3 meses (FIG. 6E) estaba cubierta completamente de células y era indistinguible de la superficie de la aorta de rata (FIG. 6F).

De forma similar, las micrografías MET de injertos vasculares representativos al cabo de 1 mes (FIG. 7A) mostraban células endoteliales planas con membrana basal (MB) adjunta revistiendo el lumen del injerto. También se veían claramente en las imágenes MET células del músculo liso (CML) con microfilamentos y cuerpos densos. En las micrografías MET se observó el material de tinción oscura a lo largo de la superficie de las células del músculo liso, lo que es representativo de la formación de fibras elásticas, aunque las fibras elásticas formadas eran inmaduras en comparación con la lámina elástica interna (LEI) que se observa en la imagen MET de una aorta normal de rata (FIG. 7B).

Inmunotinción

El desarrollo de células endoteliales en la superficie luminal de los injertos se confirmó usando tinción de las células endoteliales y tinción vWF (factor de Von Willebrand). Se usaron anticuerpos específicos contra células endoteliales de rata y el vWF para identificar la deposición de células endoteliales en la superficie del lumen. Se observaron células endoteliales a 1 mes, pero no cubrían totalmente el lumen, tal y como se muestra en la FIG. 8A. Se observó deposición significativa de células endoteliales a los 3 meses, 6 meses y 12 meses, tal y como se muestra en las FIG. 8B, 8C y 8D, respectivamente. La tinción inmunohistológica mediante vWF mostró que la totalidad de la superficie del injerto estaba revestida de endotelio, tal y como se muestra en las FIG. 8E-8H.

La repoblación del injerto vascular con células del músculo liso y fibroblastos se verificó mediante tinción con anticuerpos específicos contra α -actina y α -vimentina del músculo liso, respectivamente. También se realizó tinción de secciones transversales de aorta abdominal de rata con anticuerpos contra α -actina del músculo liso y fibroblastos para su uso como control (FIG. 9A y 9F, respectivamente). Los injertos a 1 mes (FIG. 9B y 9G), 3 meses (FIG. 9C y 9H), 6 meses (FIG. 9D y 9I) y 12 meses (FIG. 9E y 9J) mostraron que la repoblación del injerto con células del músculo liso y fibroblastos empezaba 1 mes después de la implantación.

Respuesta inmune e inflamatoria

Se realizó tinción de las secciones explantadas con anticuerpos anti-células T, células B y macrófagos de rata para identificar la respuesta inflamatoria del huésped frente al injerto implantado. Las FIG. 10A-10D representan los injertos con tinción con anticuerpos anti-células T de rata a 1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses, respectivamente. De forma similar, las FIG. 10E-10H representan injertos con tinción con

anticuerpos contra células B y las FIG. 10I-10L representan injertos con tinción con anticuerpos contra macrófagos. Se encontró que los tres tipos de células inflamatorias se infiltraban en los injertos implantados moderadamente al cabo de 1 mes, pero no se detectó infiltración de células inflamatorias en la neomedia. Las células inflamatorias disminuían significativamente a los 3 meses y las que se observaban estaban principalmente cerca de la periferia del injerto. No se observaron células inflamatorias después de 6 meses.

De forma similar, se vio un nivel moderado de anticuerpo IgG en los injertos durante los 3 primeros meses, pero no en la neomedia. El IgG de rata (FIG. 11A-11E) y el IgM de rata (FIG. 11F-11J) unidos a los injertos vasculares se examinaron al cabo de 1 mes (FIG. 11A y 11F), 3 meses (FIG. 11B y 11G), 6 meses (FIG. 11C y 11H) y 12 meses (FIG. 11D y 11I). Se usó como control aorta abdominal de rata (FIG. 11E y 11J). Tal y como se muestra en las FIG. 11A-11D, se descubrió un nivel moderado de anticuerpo IgG en el injerto durante los 3 primeros meses. Después de 3 meses, el nivel de IgG disminuyó significativamente. No se encontró deposición de IgM en ningún injerto durante el estudio.

Ejemplo 2. Evaluación de la resistencia mecánica, la termoestabilidad y el efecto trombotico de injertos vasculares formados usando bioadhesivos.

Para este estudio se usaron injertos vasculares procedentes de matriz dérmica acelular humana (HADM). Se enrollaron láminas de HADM en construcciones tubulares y los bordes de la lámina se adhirieron usando pegamento de fibrina. Se ensayó la resistencia al estallido de los injertos usando la prueba de estallido (Instituto Nacional Estadounidense de Estándares (ANSI) de código: ANSI/AAMI/ISO 7198:1998/2001/©2004). Se calculó que la resistencia al estallido máxima era de 1.639 ± 432 mmHg ($n=2$), lo que indicaba que los injertos vasculares formados usando bioadhesivos eran lo suficientemente fuertes como para mantener las presiones sanguíneas fisiológicas.

Se determinaron las temperaturas de inicio de la desnaturalización del colágeno en las matrices dérmicas mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB). Tal y como se muestra en la gráfica de la FIG. 12, la temperatura de desnaturalización del colágeno de los injertos vasculares pegados es más favorable que la de las matrices dérmicas acelulares humanas. La gráfica incluye datos correspondientes a la temperatura de inicio de la desnaturalización de HADM no tratado, e injertos vasculares formados mediante pegado de HADM con DERMABOND[®], adhesivos a base de fibrinógeno y quitosano. Los datos de este experimento indican que los bioadhesivos no alteraron las propiedades bioquímicas de la matriz.

Se evaluó la eficacia de los agentes antitrombóticos (por ejemplo, heparina) en injertos vasculares pegados usando un método de formación de coágulos. Se llevó a cabo el recubrimiento de heparina mediante suspensión de los injertos vasculares en una solución salina de heparina sódica al 0,4% durante 24 horas a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μ l de sangre y 12,5 μ l de CaCl_2 100 mM a la superficie luminal de secciones de los injertos vasculares de 1 cm^2 y, a continuación, las secciones del injerto se colocaron en una incubadora durante 1 hora a 37°C con un 5% de CO_2 . Se eliminaron todos los coágulos visibles de la superficie con pinzas y se colocaron en un tubo, liofilizaron y pesaron. Tal y como se muestra en la gráfica de la FIG. 13, la propiedad antitrombótica de la heparina no se ve afectada cuando la heparina entra en contacto con un bioadhesivo. La gráfica incluye datos que corresponden al peso de coágulos sanguíneos formados en HADM sin tratar, HADM tratada con heparina (HADM + Hep), pegamento de fibrinógeno (FG) y HADM tratada tanto con heparina como con adhesivo de fibrinógeno (HADM + FG + Hep). Tal y como se muestra en la gráfica, la cantidad de coágulo sanguíneo formado en la HADM tratada tanto con heparina como con pegamento de fibrinógeno resultaba favorable en comparación con los datos de coágulo sanguíneo procedentes de la HADM tratada con heparina, lo que indicaba que el pegamento de fibrinógeno no interfería con la función antitrombótica del recubrimiento de heparina de las matrices dérmicas.

REIVINDICACIONES

1. Injerto vascular, que comprende:

un conducto tubular que comprende una pared tubular, pared tubular que define un lumen para el paso de sangre a su través y

5 donde la pared tubular comprende una matriz de tejido acelular que tiene una membrana basal, membrana basal que forma una superficie luminal de la pared tubular donde un primer borde longitudinal de la matriz de tejido acelular está adherida a un segundo borde longitudinal de la matriz de tejido acelular con un adhesivo para formar una unión hermética a los fluidos que se extiende a lo largo de la longitud del injerto, donde la adhesión del primer y segundo bordes longitudinales crea un cordón longitudinal que
10 sobresale de una superficie abluminal de la pared tubular.

2. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde el primer y segundo bordes se adhieren usando una combinación de suturas y al menos un adhesivo.

3. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular comprende una matriz dérmica.

15 4. El injerto vascular de la reivindicación 3, donde la matriz dérmica procede de piel humana.

5. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular comprende una matriz de tejido pericárdico.

6. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular comprende una membrana peritoneal.

20 7. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular procede de tejido que es xenogénico para un receptor humano.

8. El injerto vascular de la reivindicación 7, donde el tejido proviene de un cerdo deficiente en α 1,3-galactosiltransferasa (α -1,3GT).

25 9. El injerto vascular de la reivindicación 1, donde la matriz de tejido acelular procede de tejido que es alogénico para un receptor humano.

10. El dispositivo de la reivindicación 1, donde la membrana basal además comprende al menos un agente antitrombótico.

11. El dispositivo de la reivindicación 10, donde el agente antitrombótico comprende heparina.

30

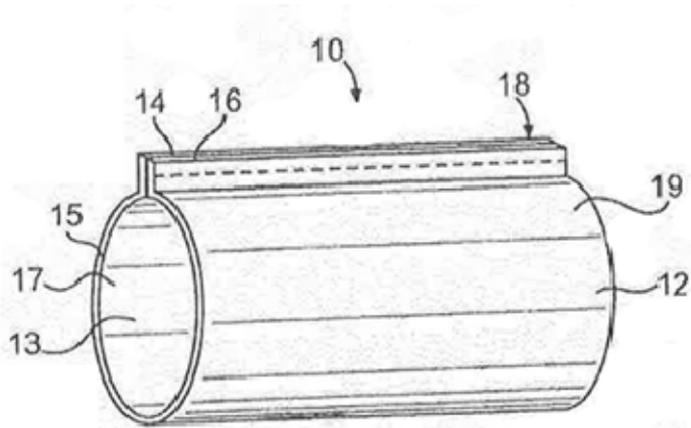


FIG. 1A

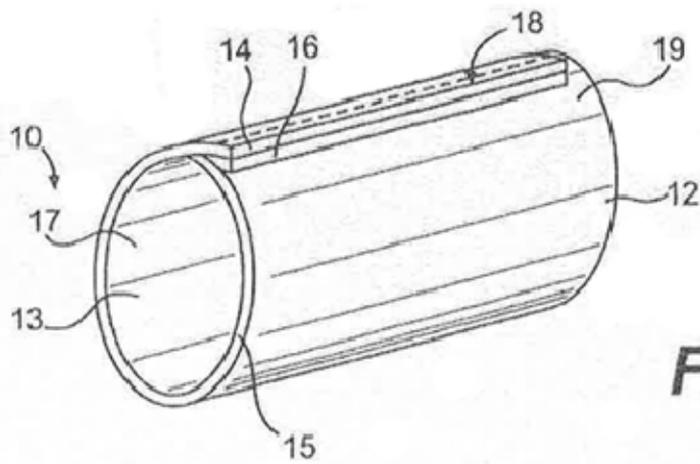
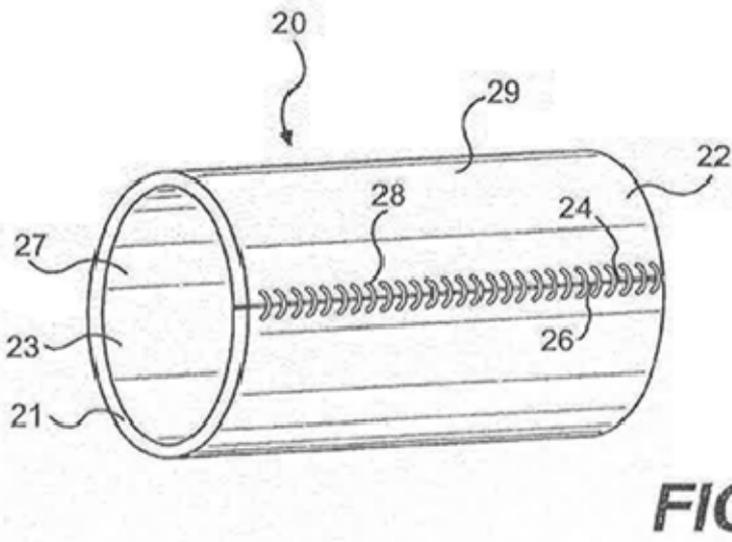
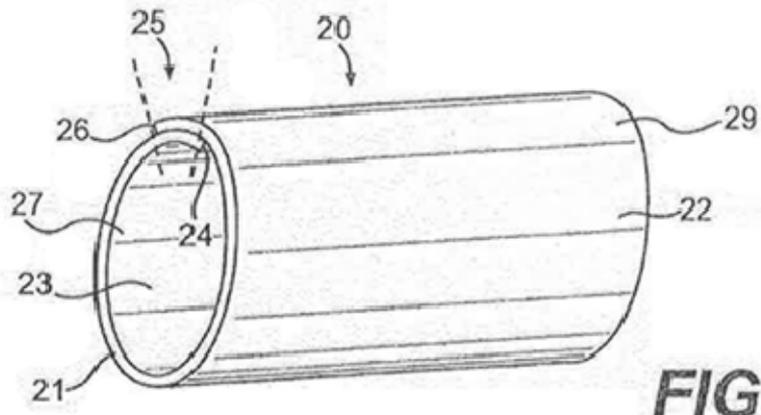


FIG. 1B



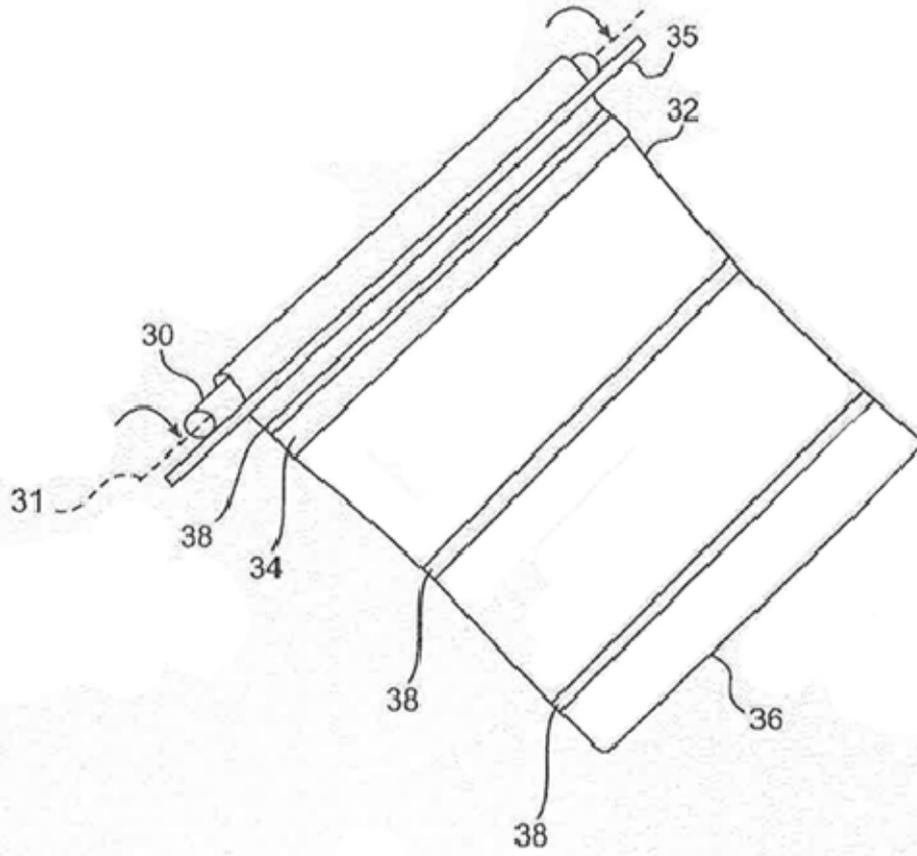


FIG. 3



FIG. 4A



FIG. 4B



FIG. 4C

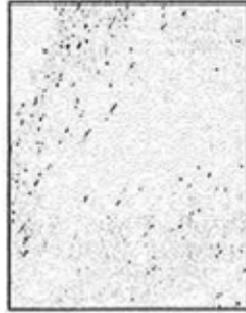


FIG. 4D

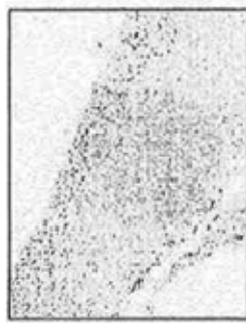


FIG. 4E



FIG. 4F



FIG. 4G



FIG. 4H

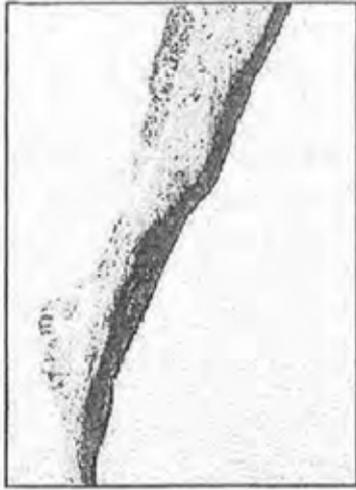


FIG. 5C

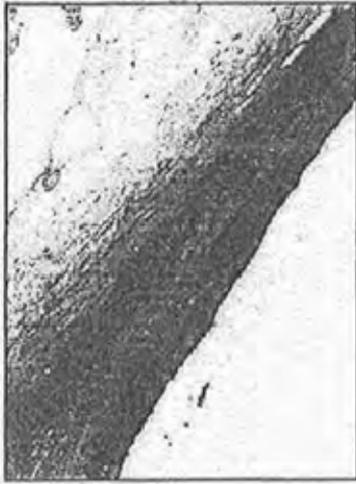


FIG. 5B

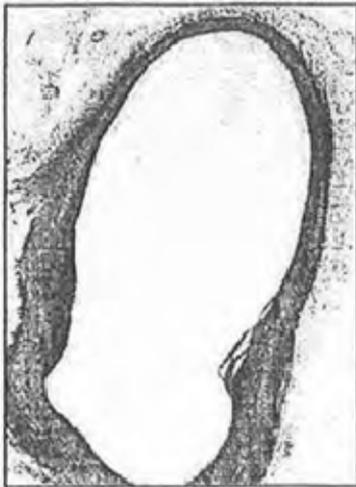


FIG. 5A



FIG. 5F



FIG. 5E



FIG. 5D



FIG. 6C

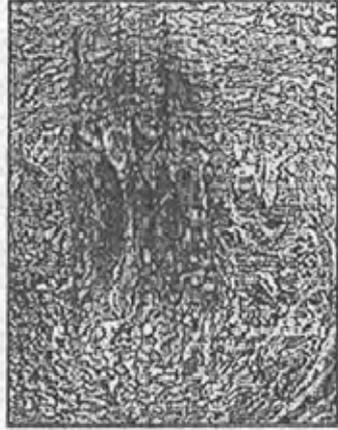


FIG. 6B



FIG. 6A



FIG. 6F

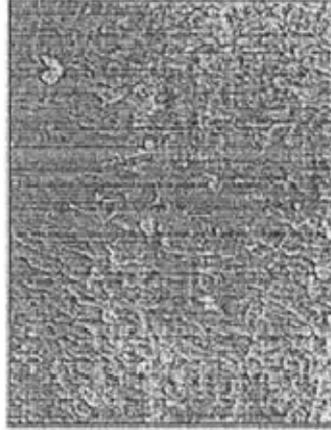


FIG. 6E



FIG. 6D

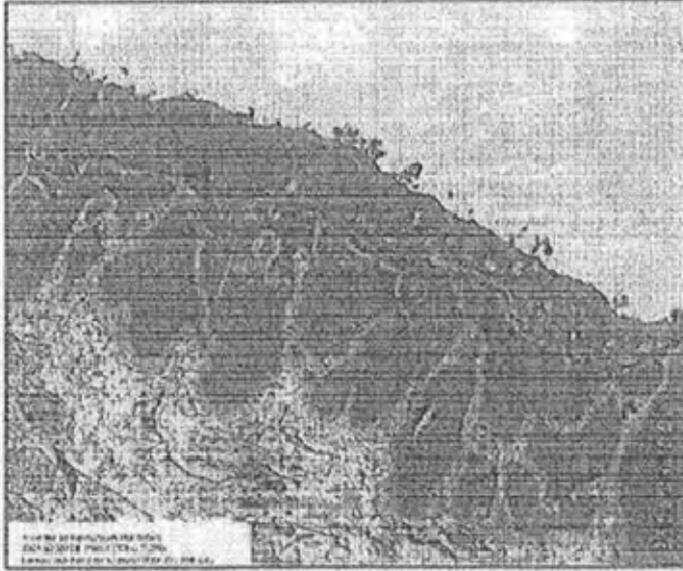


FIG. 7B

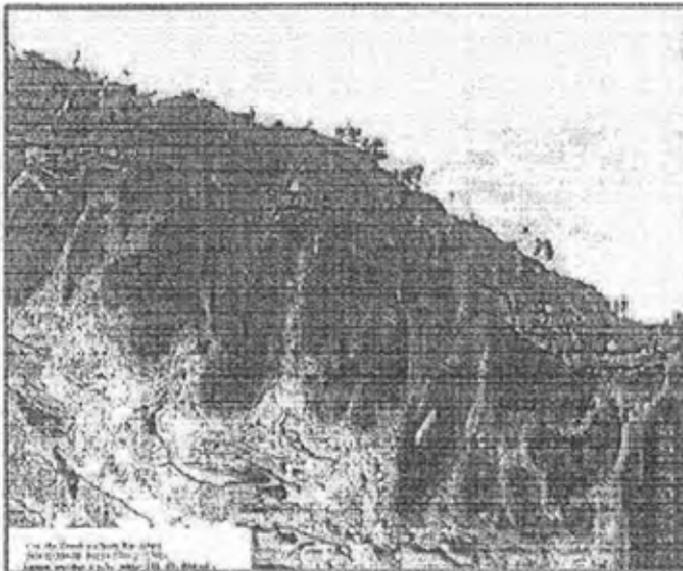


FIG. 7A



FIG. 8D

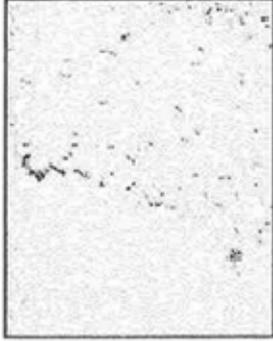


FIG. 8C



FIG. 8B

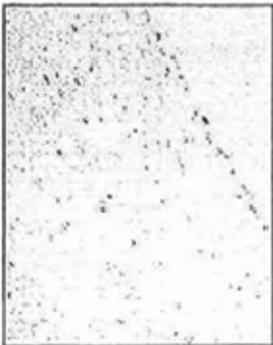


FIG. 8A



FIG. 8H

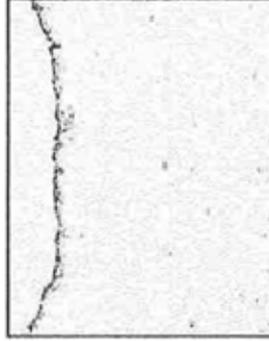


FIG. 8G

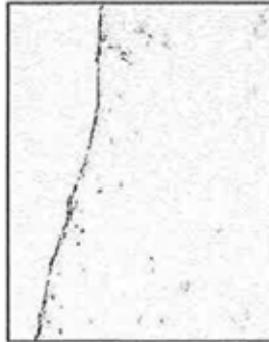


FIG. 8F

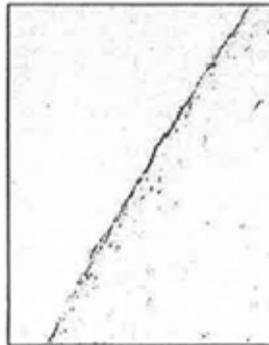


FIG. 8E



FIG. 9E



FIG. 9D



FIG. 9C



FIG. 9B



FIG. 9A



FIG. 9J

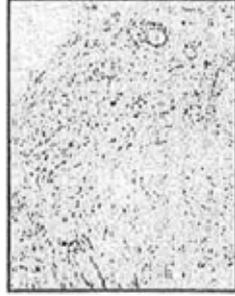


FIG. 9I



FIG. 9H

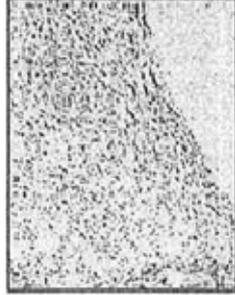


FIG. 9G



FIG. 9F



FIG. 10D

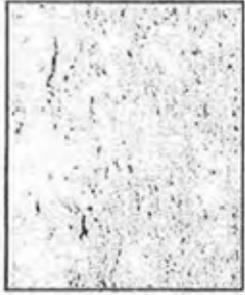


FIG. 10C



FIG. 10B

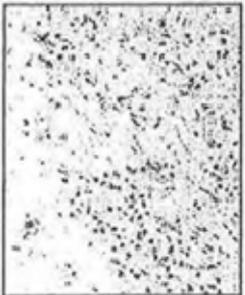


FIG. 10A



FIG. 10H



FIG. 10G

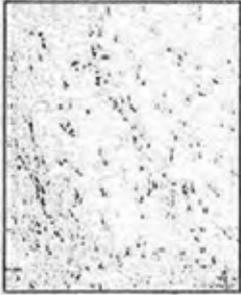


FIG. 10F

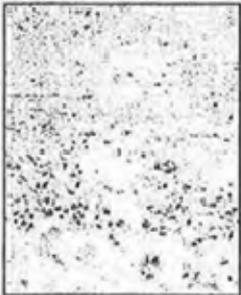


FIG. 10E



FIG. 10L

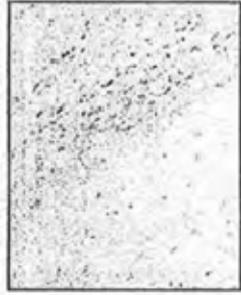


FIG. 10K



FIG. 10J

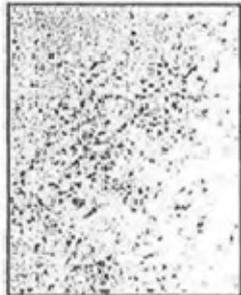


FIG. 10I



FIG. 11A FIG. 11B FIG. 11C FIG. 11D FIG. 11E



FIG. 11F FIG. 11G FIG. 11H FIG. 11I FIG. 11J

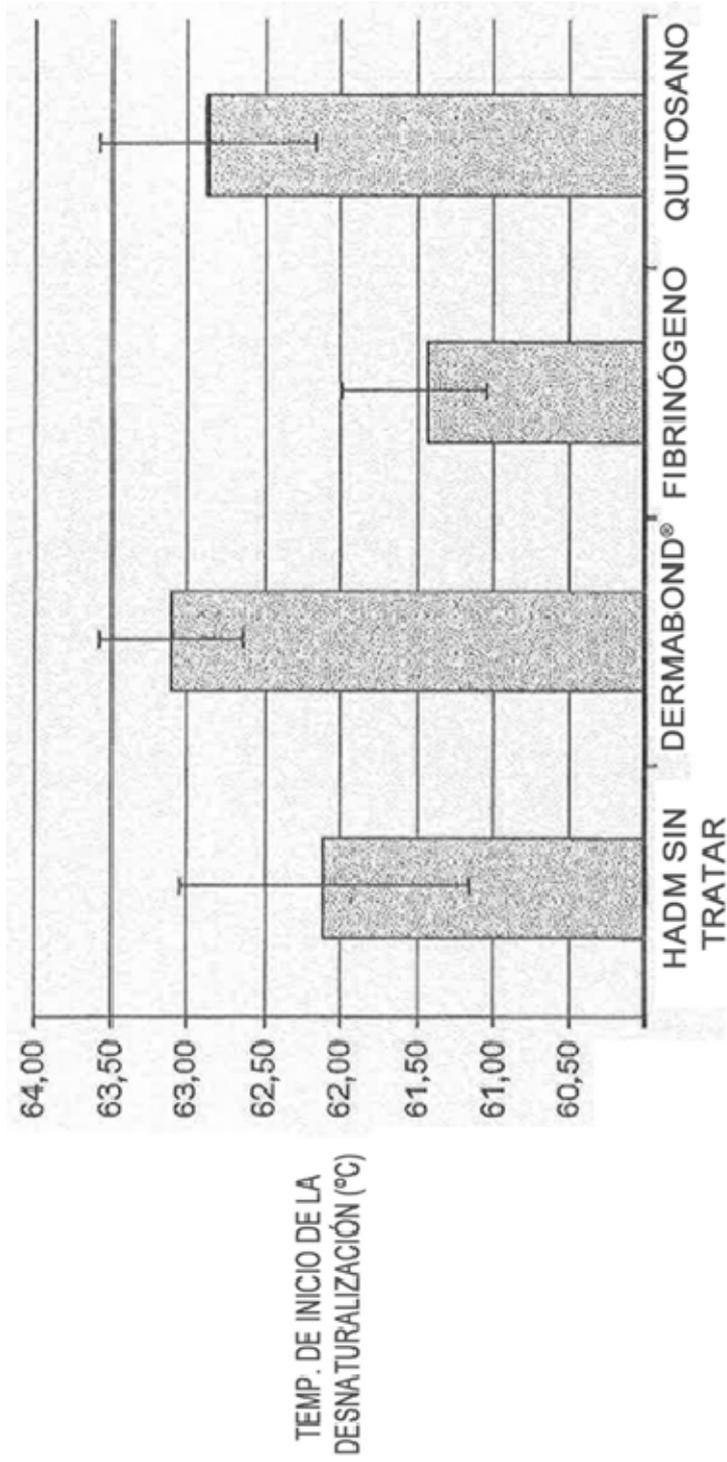


FIG. 12

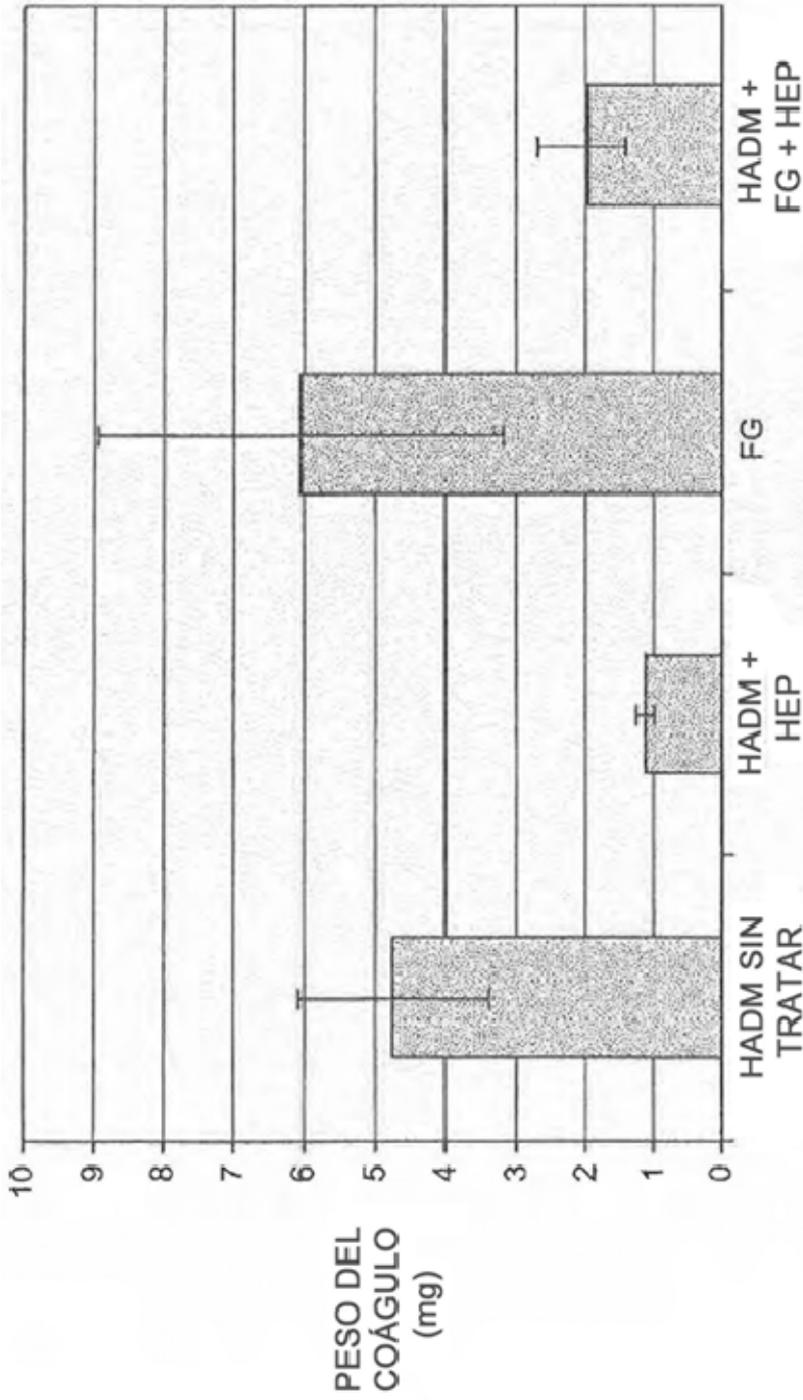


FIG. 13