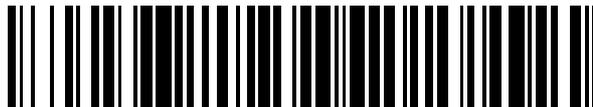


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 609**

51 Int. Cl.:

**A61L 17/10** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 31/04** (2006.01)

**C08B 37/08** (2006.01)

**A61K 8/73** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2009 PCT/US2009/055704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10028025**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2009 E 09812153 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2324064**

54 Título: **Hilos de ácido hialurónico y/o derivados de los mismos, métodos para fabricar los mismos, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.09.2008 US 190866 P**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**TAUTONA GROUP LP (100.0%)  
4040 Campbell Avenue, Suite 110  
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**GURTNER GEOFFREY C.;  
HORNE KENNETH N. y  
RAJADAS JAYAKUMAR**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 658 609 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

Hilos de ácido hialurónico y/o derivados de los mismos, métodos para fabricar los mismos, y usos de los mismos

### 5 CAMPO

La presente invención se refiere en general a hilos de ácido hialurónico, y/o derivados de los mismos, y a métodos para fabricar los mismos. Los hilos son útiles, por ejemplo, en aplicaciones estéticas (por ejemplo, rellenos dérmicos).

10

### ANTECEDENTES

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal (es decir, un glucosaminoglicano no sulfatado) que consiste en una  
 15 unidad de disacárido repetida de  $\beta$ -D-N-acetilglucoamina unida alternativamente y ácido  $\beta$ -D-glucurónico (es decir, (-4GlcUA $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-)<sub>n</sub>) que es un componente principal de la matriz extracelular y se encuentra, por ejemplo, en tejido conectivo, epitelial y neuronal. El ácido hialurónico natural es altamente biocompatible debido a su falta de especificidad de especie y órgano y, por lo tanto, se usa a menudo como biomaterial en ingeniería de tejidos y como ingrediente común en diversos rellenos dérmicos.

20

Se han sintetizado diversas formas químicamente modificadas de ácido hialurónico (por ejemplo, formas reticuladas, formas iónicamente modificadas, formas esterificadas, etc.) para abordar un problema significativo asociado con el ácido hialurónico natural que tiene poca estabilidad in vivo debido a la rápida degradación e hidrólisis enzimática. Actualmente, el ácido hialurónico o versiones reticuladas del mismo se usan en diversas formas de gel, por ejemplo,  
 25 como rellenos dérmicos, barreras contra adherencias, etc.

Sin embargo, existen problemas sustanciales con el uso de geles de ácido hialurónico o las versiones reticuladas de los mismos. En primer lugar, la fuerza requerida para dispensar geles de ácido hialurónico o versiones reticuladas del mismo no es lineal, lo que causa la "bola" inicial que muchos médicos informan cuando inyectan ácido  
 30 hialurónico o versiones reticuladas del mismo. En segundo lugar, dispensar con precisión geles de hialurónico en lugares específicos es muy difícil porque dichos geles tienen poca resistencia mecánica. Además, el gel ocupará el espacio de menor resistencia lo que hace que su uso en muchas aplicaciones (por ejemplo, tratamiento de arrugas finas) sea problemático.

Por consiguiente, lo que se necesita son nuevas formas físicas de ácido hialurónico o versiones reticuladas del mismo que puedan dispensarse uniformemente en lugares específicos independientemente de la resistencia del tejido. Tales nuevas formas pueden tener usos particulares, por ejemplo, en aplicaciones estéticas y quirúrgicas, suministro de fármacos, tratamiento de heridas y apósitos para heridas.

La patente WO 2004/022603 describe derivados de ácido hialurónico con ácido hialurónico reticulado a un polímero de glicol por enlaces amida. Los derivados se pueden usar en forma de un gel, película o hilo para diversos fines tales como aumento dérmico, corrección de arrugas faciales, viscosuplemento para artrosis o administración de fármacos.

45

### RESUMEN

La presente invención satisface estas y otras necesidades proporcionando, en un aspecto, un hilo desecado compuesto por ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, donde el ácido hialurónico reticulado se ha entrecruzado únicamente con éter diglicídico de butanodiol (BDDE), y donde el hilo desecado tiene un diámetro de  
 50 entre 0,00254 mm (0,0001 pulg.) y 2,54 mm (0,100 pulg.). En un segundo aspecto, la invención proporciona un relleno dérmico que comprende el hilo del primer aspecto.

En un tercer aspecto, se proporciona un método para fabricar un hilo desecado de ácido hialurónico reticulado o sales de acuerdo con el primer aspecto. El ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo, se mezclan con agua o un tampón y un agente de reticulación para formar un gel, donde el agente de reticulación es éter diglicídico de butanodiol (BDDE). El gel se extruye para formar un hilo. El hilo se seca entonces para proporcionar un hilo de ácido hialurónico reticulado.

También se describe en el presente documento un método para tratar una arruga en un sujeto que lo necesita. Un

hilo de ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo o un hilo de ácido hialurónico reticulado o sales, hidratos o solvatos del mismo o una combinación de los mismos, está unido al extremo proximal de una aguja. El extremo distal de la aguja se inserta a través de la superficie de la piel del sujeto en la dermis adyacente a o dentro de la arruga. La dermis del sujeto en la base de la arruga se atraviesa con la aguja. A continuación, la aguja sale de la superficie de la piel del sujeto y se arrastra distalmente hasta que se retira de la piel del sujeto de tal forma que se arrastra del hilo hacia la ubicación previamente ocupada por la aguja. El exceso de hilo se corta desde la aguja en la superficie de la piel del sujeto.

También se describen en el presente documento métodos para usar hilos de ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo o hilos de ácido hialurónico reticulado o sales, hidratos o solvatos del mismo o combinaciones de los mismos, por ejemplo, como rellenos dérmicos, barreras contra adherencias, apósitos de heridas incluyendo apósitos de heridas de presión negativa, suturas, etc. También se describen métodos para usar hilos de ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo o hilos de ácido hialurónico reticulado o sales, hidratos o solvatos del mismo, o combinaciones de los mismos, por ejemplo, en cirugía, optalmología, cierre de heridas, administración de fármacos, etc.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 ilustra un hilo unido al extremo proximal de una aguja, en su totalidad;

la Fig. 2A ilustra una vista en primer plano de un hilo insertado en el diámetro interior de una aguja;

la Fig. 2B ilustra una vista en primer plano del extremo proximal de una aguja sólida con el hilo superpuesto a la aguja;

la Fig. 3A ilustra una arruga facial fina en la región periorbitaria de un ser humano;

la Fig. 3B ilustra una aguja e hilo que se insertan en la dermis de la arruga en el extremo medial;

la Fig. 3C ilustra la aguja que se ajusta para atravesar por debajo de la arruga;

la Fig. 3D ilustra la aguja que sale en el extremo lateral de la arruga;

la Fig. 3E ilustra la aguja que ha arrastrado el hilo al lugar que ocupaba previamente debajo de la arruga;

la Fig. 3F ilustra el hilo implantado debajo de la arruga, habiendo cortado el exceso de hilo;

la Fig. 4A ilustra una vista desde arriba hacia abajo de un varón con calvicie de patrón masculino típica;

la Fig. 4B ilustra dónde se desea el recrecimiento del cabello, teniendo en cuenta las líneas capilares;

la Fig. 4C ilustra una aguja curvada con hilo que se inserta en una línea imaginaria en la que se desea un recrecimiento del pelo;

la Fig. 4D ilustra la aguja que atraviesa la línea imaginaria, y sale de la piel;

la Fig. 4E ilustra la aguja atravesada distalmente, tirando del hilo hasta la ubicación deseada;

la Fig. 4F ilustra unas tijeras que se usan para cortar el exceso de hilo;

la Fig. 5A ilustra una vista en sección transversal de un pliegue o una arruga;

la Fig. 5B ilustra un hilo implantado bajo una arruga que no está todavía hidratado;

la Fig. 5C ilustra un hilo implantado bajo una arruga que está completamente hidratado y ha aplanado la apariencia de la superficie de la arruga;

la Fig. 6A ilustra un páncreas humano con un tumor;

la Fig. 6B ilustra una aguja curvada con un hilo unido a la misma;

la Fig. 6C ilustra una aguja curvada que atraviesa el tumor dentro del páncreas;

la Fig. 6D ilustra el resultado final de implantaciones repetidas de hilo;

la Fig. 7A ilustra múltiples capas de bobinas concéntricas de hilo, conformadas para representar un pezón humano;

la Fig. 7B ilustra el implante de la Fig. 7A en sección transversal;

la Fig. 7C ilustra cómo se usaría un implante de hilo en espiral para la reconstrucción del pezón; y

La Fig. 8 ilustra cómo se usaría una aguja e hilo para colocar un hilo en una localización lineal específica para promover el recrecimiento nervioso o vascular en una línea específica.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

#### Definiciones

"Tampón" incluye, pero sin carácter limitativo, a 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol, ácido L-(+)-tartárico, ácido D-(-)-tartárico, ACES, ADA, ácido acético, acetato de amonio, bicarbonato de amonio, citrato de amonio, formiato de amonio, oxalato de amonio, fosfato de amonio, fosfato de amonio y sodio, sulfato de amonio, tartrato de amonio, BES, BICINE, BIS-TRIS, bicarbonato, ácido bórico, CAPS, CHES, acetato de calcio, carbonato de calcio, citrato de calcio, citrato, ácido cítrico, dietanolamina, EPP, sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético, solución de ácido fórmico, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly, glicina, HEPES, imidazol, acetato de litio, citrato de litio, MES, MOPS, acetato de magnesio, citrato de magnesio, formiato de magnesio, fosfato de magnesio, ácido oxálico,

PIPES, solución salina tamponada con fosfato, D-tartrato de potasio piperazina, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, formiato de potasio, oxalato de potasio, fosfato de potasio, ftalato de potasio, tartrato de potasio y sodio, tetraborato de potasio, tetraoxalato de potasio dihidrato, solución de ácido propiónico, solución tampón de STE, 5,5-dietilbarbiturato de sodio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, bitartrato de sodio monohidrato, carbonato de sodio, citrato de sodio, formiato de sodio, oxalato de sodio, fosfato de sodio, pirofosfato de sodio, tartrato de sodio, tetraborato de sodio, TAPS, TES, TNT, TRIS-glicina, TRIS-acetato, solución salina tamponada con TRIS, TRIS-HCl, TRIS fosfato-EDTA, tricina, trietanolamina, trietilamina, acetato de trietilamonio, fosfato de trietilamonio, acetato de trimetilamonio, fosfato de trimetilamonio, acetato Trizma®, base Trizma®, carbonato Trizma®, clorhidrato Trizma® o maleato Trizma®.

10 "Sal" se refiere a una sal de ácido hialurónico, que posee la actividad deseada del compuesto precursor. Dichas sales incluyen, pero sin limitación: (1) sales de adición de ácidos, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etano-disulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido benzenosulfónico, ácido 4-clorobenzenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico, ácido 4-metilbencilo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido t-butilacético, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares; o (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor se reemplaza por un ión amonio, un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino (por ejemplo, sodio o potasio), un ión de metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio o magnesio) o un ión aluminio; o se combina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, N-metilglucamina, morfolina, piperidina, dimetilamina, dietilamina, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginatos y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónicos o galactunóricos, y similares.

#### Hilos de ácido hialurónico y derivados del mismo

30 La presente invención proporciona generalmente hilos desecados de ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, y combinaciones de los mismos, donde el ácido hialurónico reticulado se ha entrecruzado únicamente con éter diglicídico de butanodiol (BDDE), y donde el hilo desecado tiene un diámetro de entre 0,00254 mm (0,0001 pulg.) y 2,54 mm (0,100 pulg.). En algunas realizaciones, el ácido hialurónico se aísla de una fuente animal. En otras realizaciones, el ácido hialurónico se aísla de la fermentación bacteriana.

35 En algunas realizaciones, la vida útil de los hilos del ácido hialurónico o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 mes. En otras realizaciones, la vida útil del hilo de ácido hialurónico o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 1 semana. En aún otras realizaciones, la vida útil del hilo de ácido hialurónico o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 3 días.

45 En algunas realizaciones, la vida útil del hilo de ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 1 semana y aproximadamente 24 meses. En otras realizaciones, la vida útil del hilo de ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 12 meses. En aún otras realizaciones, la vida útil del hilo de ácido hialurónico o sales del mismo, *in vivo*, es de entre aproximadamente 3 meses y aproximadamente 9 meses.

50 En algunas de las realizaciones anteriores, el grado de reticulación entre el ácido hialurónico o sales del mismo y el agente de reticulación (BDDE) está entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 20 %. En otra de las realizaciones anteriores, el grado de reticulación entre el ácido hialurónico o sales del mismo y el agente de reticulación está entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 10 %. En aún otra de las realizaciones anteriores, el grado de reticulación entre el ácido hialurónico o sales del mismo y el agente de reticulación está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 8 %.

55 En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo incluye uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico. En otra de las realizaciones anteriores, el agente de diagnóstico es proteína TB (tuberculosis) soluble. En aún otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es un anestésico incluyendo, pero sin carácter limitativo, lidocaína, xilocaína, novocaína, benzocaína, prilocaína, ropivacaína, propofol o combinaciones de los mismos. En aún otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es epinefrina, adrenalina, efedrina, aminofilina, teofilina o combinaciones de los mismos. En aún otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es toxina botulínica.

En aun otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es laminina 511. En aun otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es glucosamina, que puede usarse, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedad articular degenerativa. En aun otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es un antioxidante incluyendo, pero sin carácter limitativo, vitamina E o ácido all-trans retinoico tal como retinol. En aun otras de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico incluye células madre. En aun otra de las realizaciones anteriores, el agente terapéutico es insulina, un factor de crecimiento tal como, por ejemplo, NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) o purmorfamina, deferoxamina, NGF (factor de crecimiento nervioso), dexametasona, ácido ascórbico, 5-azacitidina, pirrolopirimidina 4,6-disustituida, cardiogenoles, ADNc, ADN, iARN, BMP-4 (proteína morfogenética ósea 4), BMP-2 (proteína morfogenética ósea 2), un agente antibiótico tal como, por ejemplo,  $\beta$ -latámicos, quinolonas incluyendo fluoroquinolonas, aminoglicósidos o macrólidos, un agente antifibrótico incluyendo, pero sin carácter limitativo, factor de crecimiento de hepatocitos o pirfenidona, un agente anticicatrización tal como, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 2 (AcM rhanti-TGF- $\beta$ 2), un péptido tal como, por ejemplo, péptido de unión al cobre GHK, un agente de regeneración de tejido, un esteroide, fibronectina, una citocina, un analgésico tal como, por ejemplo, HCl de tapentadol, opiáceos (p.ej., morfina, codona, oxicodona, etc.), un antiséptico, interferón alfa, beta o gamma, EPO, glucagones, calcitonina, heparina, interleucina 1, interleucina 2, filgrastim, una proteína, HGH, hormona luteinizante, factor natriurético auricular, factor VIII, factor IX u hormona estimulante de los folículos. En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo contiene una combinación de más de un agente terapéutico o agente de diagnóstico. En algunas de estas realizaciones, diferentes hilos comprenden diferentes agentes terapéuticos o agentes de diagnóstico.

En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción final de entre aproximadamente 0 MPa (0 kpsi) y aproximadamente 1724 MPa (250 kpsi). En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción final de entre aproximadamente 7 MPa (1 kpsi) y aproximadamente 862 MPa (125 kpsi). En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción final de entre aproximadamente 34 MPa (5 kpsi) y aproximadamente 689 MPa (100 kpsi). En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción axial de entre aproximadamente 0,04 N (0,01 lb) y aproximadamente 44 N (10 lb). En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción axial de entre aproximadamente 0,4 N (0,1 lb) y aproximadamente 22 N (5 lb). En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una resistencia a la tracción axial de entre aproximadamente 2 N (0,5 lb) y aproximadamente 9 N (2 lb). En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un área en sección transversal de entre aproximadamente  $6 \times 10^6 \text{ cm}^2$  ( $1 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ) y aproximadamente  $6,45 \times 10^9 \text{ cm}^2$  ( $1.000 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ). En otras de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un área en sección transversal de entre aproximadamente  $6,45 \times 10^7 \text{ cm}^2$  ( $10 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ) y aproximadamente  $3,23 \times 10^9 \text{ cm}^2$  ( $500 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ). En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un área en sección transversal de entre aproximadamente  $3,23 \times 10^8 \text{ cm}^2$  ( $50 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ) y aproximadamente  $1,61 \times 10^9 \text{ cm}^2$  ( $250 \times 10^6 \text{ pulg.}^2$ ). En una realización de la invención, el hilo tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,00025 cm (0,0001 pulg.) y aproximadamente 0,25 cm (0,100 pulg.). En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,0025 cm (0,001 pulgadas) y aproximadamente 0,0508 cm (0,020 pulgadas). En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un diámetro de entre aproximadamente 0,0076 cm (0,003 pulgadas) y aproximadamente 0,025 cm (0,010 pulgadas). En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una elasticidad de entre aproximadamente el 1 % y el 200 %. En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una elasticidad de entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 100 %. En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una elasticidad de entre aproximadamente el 10 % y el 50 %. En el presente documento, la elasticidad es el % de elongación del hilo al tiempo que conserva la capacidad de volver a la longitud inicial del hilo.

En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,1 MD y aproximadamente 8 MD (MD es un millón de Dalton). En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un peso molecular de entre aproximadamente 0,5 MD a aproximadamente 4 MD. En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene un peso molecular de entre aproximadamente 1 MD a aproximadamente 2 MD.

En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una longitud de cadena persistente de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 250 nm. En otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una longitud de cadena persistente de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 125 nm. En aun otra de las realizaciones anteriores, el hilo tiene una longitud de cadena persistente de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 75 nm.

En algunas de las realizaciones anteriores, el área en sección transversal del hilo cuando está completamente hidratado se hincha entre aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 10.000 %. En otra de las realizaciones anteriores, el área en sección transversal del hilo cuando está completamente hidratado se hincha entre aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 2.500 %. En aun otra de las realizaciones anteriores, el área en

sección transversal del hilo cuando está completamente hidratado se hincha entre aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 900 %.

5 En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo se alarga cuando está completamente hidratado entre aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 1.000 %. En otra de las realizaciones anteriores, el hilo se alarga cuando está completamente hidratado entre aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 100 %. En aún otra de las realizaciones anteriores, el hilo se alarga cuando está completamente hidratado entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 30 %.

10 En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo se hidrata completamente después de sumergirlo en un ambiente acuoso entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 24 horas. En otra de las realizaciones anteriores, el hilo se hidrata completamente después de sumergirlo en un ambiente acuoso entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 1 hora. En aún otra de las realizaciones anteriores, el hilo se hidrata completamente después de sumergirlo en un ambiente acuoso entre aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 5 minutos.

15 En algunas realizaciones, el hilo está reticulado y tiene una resistencia a la tracción final de entre aproximadamente 345 MPa (50 kpsi) y aproximadamente 517 MPa (75 kpsi), un diámetro de entre 0,013 cm (0,005 pulgadas) y aproximadamente 0,038 cm. (0,015 in), el espesor o diámetro del hilo cuando está totalmente hidratado se hincha entre aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 100 %, y la vida útil del hilo in vivo es de aproximadamente 6  
20 meses.

En algunas realizaciones, pueden formarse trenzas a partir de los hilos descritos anteriormente. En otras realizaciones, pueden formarse cordones a partir de los hilos descritos anteriormente. En aún otras realizaciones, se puede formar una malla tejida a partir de los hilos descritos anteriormente. En aún otras realizaciones, se puede  
25 formar una malla tejida a partir de las trenzas o cordones descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, se puede construir una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando los hilos descritos anteriormente. En otras realizaciones, se puede construir una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las trenzas descritas anteriormente. En aún otras  
30 realizaciones, se puede construir una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando los cordones descritos anteriormente. En aún otras realizaciones, se puede construir una estructura tridimensional tejiendo o envolviendo o enrollando o estratificando las mallas descritas anteriormente.

En algunas realizaciones, se proporciona un implante cilíndrico tridimensional formado de cualquiera de los hilos. Un  
35 uso ejemplar para tal implante es para la reconstrucción de pezón. En algunas realizaciones, los hilos usados para fabricar el implante cilíndrico incluyen compuestos de adhesión de condrocitos. En otras realizaciones, la forma cilíndrica está proporcionada por múltiples espirales concéntricas de hilos.

Los hilos de ácido hialurónico pueden contener uno o más centros quirales y, por lo tanto, pueden existir como  
40 estereoisómeros, tales como enantiómeros o diastereómeros. En general, todos los estereoisómeros (es decir, todos los enantiómeros y estereoisómeros posibles de los compuestos ilustrados que incluyen la forma estereoisoméricamente pura (por ejemplo, enantioméricamente pura o diastereoméricamente pura) y las mezclas enantioméricas y estereoisoméricas, están dentro del alcance de la presente invención.

45 Los hilos de ácido hialurónico pueden existir en varias formas tautómeras y mezclas de las mismas, todas las cuales están dentro del alcance de la presente invención. Los hilos desecados de ácido hialurónico pueden existir tanto en formas no solvatadas como en formas solvatadas. Por consiguiente, todas las formas físicas de hilos desecados de ácido hialurónico son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y pretenden estar dentro del alcance de la presente invención.

50

#### **Métodos de fabricación de hilos de ácido hialurónico y derivados del mismo**

La presente invención también proporciona métodos para fabricar hilos de ácido hialurónico como se ha descrito anteriormente. También se describe en el presente documento un método para fabricar hilos de ácido hialurónico o  
55 sales, hidratos o solvatos del mismo, se proporciona ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo, que se mezclan con agua o un tampón para formar un gel. El gel se extruye entonces para formar un hilo de gel. El gel se puede extruir, por ejemplo, colocando el gel en una jeringa con una boquilla, presurizando la jeringa, y trasladando linealmente la jeringa a medida que se extruye el gel de la boquilla. Las características de las boquillas, tal como el ahusamiento, la longitud y el diámetro, la presión de la jeringa, y la velocidad de traslación lineal pueden ajustarse  
60 para fabricar hilos de diferentes tamaños y características mecánicas. Otro método para fabricar un hilo de gel es

- enrollando el gel, es decir, como una masa, o colocándolo en un molde. Aún otro método para fabricar un hilo de gel es permitir que el gel se estire en un hilo bajo la influencia de la gravedad o utilizando la fuerza centrífuga. Otro método más para fabricar un hilo de gel es cortar el gel entre placas de vidrio paralelas cargadas. Otro método más para fabricar un hilo de gel es mediante el confinamiento del gel en una ranura modelada sobre un elastómero y estirar entonces el elastómero. Otro método más para fabricar un hilo de gel es confinar el gel en una estructura tubular permeable que permita la deshidratación del hilo y, si es necesario, controlar la naturaleza de la deshidratación ajustando parámetros ambientales tales como temperatura, presión y composición gaseosa. El hilo de ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo, se seca entonces después de la preparación.
- 5
- 10 En una realización de la invención, se proporciona un método para fabricar hilos desecados de ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, como se ha descrito anteriormente. El ácido hialurónico o sales, hidratos o solvatos del mismo, se mezclan con agua o un tampón y un agente de reticulación para formar un gel, donde el agente de reticulación es éter diglicídico de butanodiol (BDDE). El gel se extruye entonces para formar un hilo como se ha descrito anteriormente, o el hilo se puede fabricar mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.
- 15 Generalmente, el gel se debe extruir o manipular de otro modo, poco después de la adición del agente de reticulación, de manera que se produzca la reticulación a medida que se seca el hilo. El hilo de ácido hialurónico reticulado o sales, hidratos o solvatos del mismo, se seca entonces después de la preparación.
- En algunas realizaciones, la relación de agente de reticulación con respecto a ácido hialurónico es de entre aproximadamente el 0,01 % y aproximadamente el 10 %. En otras realizaciones, la relación de agente de reticulación con respecto a ácido hialurónico es de entre aproximadamente el 0,02 % y aproximadamente el 5 %. En aún otras realizaciones, la relación de agente de reticulación con respecto a ácido hialurónico es de entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 3 %.
- 20
- 25 En algunas de las realizaciones anteriores, se incluyen uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico en la etapa de formación de gel.
- En algunas de las realizaciones anteriores, el gel tiene una concentración en peso de ácido hialurónico de entre aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 10 %. En otra de las realizaciones anteriores, el gel tiene una concentración en peso de ácido hialurónico de entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 7 %. En aún otra de las realizaciones anteriores, el gel tiene una concentración en peso de ácido hialurónico de entre aproximadamente el 4 % y aproximadamente el 6 %.
- 30
- 35 En algunas de las realizaciones anteriores, las cadenas poliméricas se orientan adicionalmente a lo largo del eje del hilo al estirarse axialmente. En otra de las realizaciones anteriores, las cadenas poliméricas están orientadas a lo largo del eje del hilo por fuerza de la gravedad o fuerza centrífuga. En aún otra de las realizaciones anteriores, la fuerza de la gravedad se aplica colgando el hilo en vertical. En aún otra de las realizaciones anteriores, las cadenas poliméricas están orientadas a lo largo del eje del hilo mediante la aplicación de un potencial eléctrico a lo largo de la longitud del hilo. En aún otra de las realizaciones anteriores, las cadenas poliméricas están orientadas a lo largo del eje del hilo mediante una combinación de los métodos anteriores.
- 40
- En algunas de las realizaciones anteriores, los hilos se hidratan con agua y luego se secan de nuevo. En otra de las realizaciones anteriores, las etapas de hidratación y secado se repiten múltiples veces. En aún otra de las realizaciones anteriores, las cadenas poliméricas están orientadas a lo largo del eje del hilo estirándose axialmente, mediante la aplicación de fuerza de la gravedad o fuerza centrífuga, mediante la aplicación de un potencial eléctrico a lo largo del hilo, o mediante combinaciones de las mismas. En aún otra de las realizaciones anteriores, se aplica un agente terapéutico o un agente de diagnóstico o un agente de reticulación al hilo durante la etapa de hidratación.
- 45
- 50 En algunas de las realizaciones anteriores, el gel se extruye sobre un hilo previamente fabricado para proporcionar un hilo en capas.
- En otra de las realizaciones anteriores, después de la etapa de secado, el hilo se sumerge o se aclara con un agente. En algunas de las realizaciones anteriores, el agente es un agente de reticulación, un agente terapéutico o de diagnóstico.
- 55
- En otra de las realizaciones anteriores, mientras el hilo se hidrata, por ejemplo después de una etapa de aclarado, el hilo se sumerge o se aclara con un agente. En algunas de las realizaciones anteriores, el agente es el agente de reticulación (BDDE), o un agente terapéutico o de diagnóstico.
- 60 En aún otra de las realizaciones anteriores, el hilo se congela y luego se descongela. En aún otra de las

realizaciones anteriores, el hilo se congela y luego se descongela al menos más de una vez.

En aún otra de las realizaciones anteriores, se irradia un hilo desecado para promover la reticulación. En algunas de las realizaciones anteriores, se irradia un hilo hidratado para promover la reticulación.

5

En aún otra de las realizaciones anteriores, se recubre un hilo desecado o hidratado para alterar las propiedades del hilo, con un biopolímero bioabsorbible, tal como, por ejemplo, colágeno, PEG o PLGA. Como alternativa, las construcciones tejidas, ya sean monocapa o tridimensionales, se pueden recubrir en su totalidad para crear tejidos o mallas con propiedades físicas alteradas de las de una malla de tejido libre.

10

### **Métodos de uso de hilos de ácido hialurónico y derivados del mismo**

Los hilos, trenzas, cordones, mallas tejidas o estructuras tridimensionales descritas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para rellenar aneurismas, ocluir el flujo sanguíneo a tumores (es decir, oclusión del tumor), en cirugía de párpados, en aumento del pene (por ejemplo, para agrandar o para reducir la sensibilidad, es decir, tratamiento de la eyaculación precoz), dispositivos de administración intranasales (barrera hematoencefálica) para agentes de diagnóstico y/o terapéuticos, implantes corneales para administración de fármacos, aumento o reconstrucción de nariz, aumento o reconstrucción de labios, aumento o reconstrucción facial, aumento o reconstrucción del lóbulo de la oreja, implantes espinales (por ejemplo, para sostener un disco protruyente), relleno del conducto radicular (medicado con agente terapéutico), insuficiencia glótica, terapia fotorrefractiva con láser (por ejemplo, hilo/tejido de ácido hialurónico utilizado como almohadillado), estructuras de armazón para el crecimiento orgánico, tratamiento de la médula espinal (BDNF y NGF), en la enfermedad de Parkinson (administración estereotáctica), administración precisa de moléculas terapéuticas o de diagnóstico, en la implantación pulpar, tratamiento de sustitución del conducto radicular de la pulpa, sistemas de conformación del conducto radicular, terapia de heridas mediante presión negativa, barreras antiadherentes y apósitos para heridas.

En algunas realizaciones, los hilos, trenzas, cordones, mallas tejidas o estructuras tridimensionales que se describen en el presente documento se usan como rellenos dérmicos en diversas aplicaciones estéticas. En otras realizaciones, los hilos, trenzas, cordones, mallas tejidas o estructuras tridimensionales que se describen en el presente documento se usan como suturas en diversas aplicaciones quirúrgicas. En aún otras realizaciones, los hilos, trenzas, cordones, mallas tejidas o estructuras tridimensionales que se describen en el presente documento en cirugía oftalmológica, administración de fármacos, e inyección intraarticular.

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en un método para tratar una arruga en un sujeto. Por ejemplo, la arruga puede estar en la región periorbitaria como se ilustra en la Fig. 3A. El hilo puede enlazarse con un agujero como se ilustra, por ejemplo, en las Fig. 1, 2A y 2B. El extremo distal de la aguja puede insertarse a través de la superficie de la piel del sujeto hasta la dermis adyacente a o dentro de la arruga como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 3B. En algunas realizaciones, se inserta el hilo en el espacio subcutáneo en lugar de en la dermis. La aguja puede atravesar entonces la dermis del sujeto bajo la arruga como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 3C. La aguja puede salir entonces la piel del sujeto por el margen opuesto de la arruga, como se ilustra por ejemplo en la Fig. 3D. La aguja puede arrastrarse entonces distalmente hasta que se retira del sujeto de tal modo que el hilo se arrastre a la localización ocupada anteriormente por la aguja bajo la arruga, como se ilustra por ejemplo en la Fig. 3E. Finalmente, se corta el hilo en exceso de la aguja en la superficie de la piel del sujeto, lo que deja el hilo implantado como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 3F.

45

Aun sin desear ligarse a teoría alguna, el método anterior puede tratar exitosamente arrugas como se muestra en las Fig. 5A, 5B y 5C. Se ilustra una arruga típica en la Fig. 5A. La Fig. 5B ilustra un hilo implantado bajo una arruga que no está todavía hidratado. A medida que el hilo implantado bajo la arruga se vuelve totalmente hidratado, se alisa simultáneamente la apariencia superficial de la arruga como se ilustra en la Fig. 5C.

50

En algunas realizaciones, el método anterior puede usarse para rejuvenecer la piel de un sujeto que lo necesite. En muchas de estas realizaciones, el hilo incluye cantidades sustanciales de ácido hialurónico no reticulado. En algunas de estas realizaciones, el hilo incluye antioxidantes, vitamina E o retinol, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en un método para tratar la pérdida de cabello en un sujeto. Un sujeto tal como, por ejemplo, se ilustra un varón con calvicie de patrón masculino típica en la Fig. 4A y el área donde se desea el crecimiento del cabello (con líneas capilares imaginarias) se muestra en la Fig. 4B. El hilo puede enlazarse con un agujero como se ilustra, por ejemplo, en las Fig. 1, 2A, 2B y 4C. El extremo distal de la aguja se puede insertar en una de las líneas capilares como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4C. Después, la aguja puede atravesar el área bajo la línea del cabello del sujeto y luego puede salir de la piel del sujeto como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4D.

60

La aguja puede arrastrarse entonces distalmente hasta que se retira del sujeto de tal modo que el hilo se arrastre a la localización ocupada anteriormente por la aguja como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4E. Finalmente, se corta el hilo en exceso de la aguja en la superficie de la piel del sujeto, lo que deja el hilo implantado como se ilustra, por ejemplo, en la Fig. 4D.

5

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en un método para tratar tumores en un sujeto que lo necesite. El hilo puede unirse a una aguja como se ilustra, por ejemplo, en las Figs. 1, 2A y 2B. El extremo distal de la aguja se puede insertar en el tumor del sujeto. La aguja puede atravesar entonces el tumor y luego puede salir del tumor. La aguja se puede arrastrar entonces distalmente hasta que se extrae del tumor del sujeto de tal forma que el hilo se arrastra hacia la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta el exceso de hilo de la aguja que deja el hilo implantado en el tumor del sujeto. En algunas de las realizaciones anteriores, el hilo incluye un agente anticanceroso. En algunas realizaciones, el hilo incluye inhibidores de Bcl-2.

10

En una realización ejemplar, el hilo puede ser útil en el tratamiento de tumores pancreáticos. La Fig. 6A ilustra un páncreas humano con un tumor mientras que la Fig. 6B ilustra una aguja con un hilo unido a la misma. Se puede acceder al páncreas mediante cirugía o métodos mínimamente invasivos, tal como por laparoscopia. El extremo distal de la aguja se puede insertar en el tumor pancreático. La aguja puede atravesar el tumor pancreático como se ilustra en la Fig. 6C y luego puede salir del tumor. La aguja se puede arrastrar entonces distalmente hasta que se extrae del tumor pancreático de tal forma que el hilo se arrastra hacia la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta el exceso de hilo de la aguja que deja el hilo implantado en el tumor pancreático. El proceso puede repetirse cualquier cantidad de veces para proporcionar, como se ilustra en la Fig. 6D, un tumor pancreático que ha sido implantado con varios hilos. En algunas realizaciones, el hilo incluye un agente anticanceroso.

15

20

25

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en un método para tratar una vena varicosa en un sujeto que lo necesite. El hilo puede enlazarse con un aguja como se ilustra, por ejemplo, en las Fig. 1, 2A y 2B. El extremo distal de la aguja se puede insertar en la vena varicosa del sujeto. La aguja puede atravesar la vena varicosa y luego puede salir de la vena. La aguja se puede arrastrar entonces distalmente hasta que se extrae de la vena varicosa del sujeto de tal forma que el hilo se arrastra hacia la ubicación previamente ocupada por la aguja. Finalmente, se corta el exceso de hilo de la aguja que deja el hilo implantado en la vena varicosa del sujeto. En algunas realizaciones, la aguja es flexible. En otras realizaciones, el hilo se enrolla cuando se hidrata, ocluyendo más fácilmente el vaso.

30

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en un método para la reconstrucción de pezón donde un implante cilíndrico tridimensional compuesto por hilos entrecruzados se implanta bajo la piel. El implante puede incluir agentes terapéuticos, por ejemplo, compuestos de adhesión de condrocitos. La Fig. 7A ilustra un implante de múltiples capas de espirales de hilos concéntricos conformados para representar un pezón, mientras que la Fig. 7B muestra una sección transversal del implante de la Fig. 7A. La Fig. 7C ilustra cómo se podría usar el implante de la Fig. 7A para la reconstrucción del pezón.

40

En algunas realizaciones, el hilo puede ser útil en métodos para el recrecimiento de nervios o vasos. Como se ilustra en la Fig. 8, se puede usar una aguja para colocar un hilo en una línea específica que podría promover la regeneración nerviosa o vascular.

#### 45 Ejemplos

La presente invención se define adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos. Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden ponerse en práctica muchas modificaciones, tanto en materiales como en métodos, sin apartarse del alcance de la invención actual.

50

#### Ejemplo 1: Síntesis de un hilo reticulado

Se fabricó un hilo reticulado de un diámetro entre 0,004 pulgadas y 0,006 pulgadas formando un gel con una concentración de ácido hialurónico al 5 % y BDDE al 0,4 %, en peso con el resto compuesto por agua. Se utilizó una boquilla de punta cónica con un diámetro interno de 0,02 pulgadas, una presión de jeringa de 20 psi y una velocidad de traslación lineal acorde con la velocidad de eyección del gel desde la jeringa para extruir el gel en forma de hilo. Sin embargo, existen numerosas combinaciones de parámetros de extrusión que pueden formar un hilo del espesor deseado. El hilo se secó y luego se aclaró con agua que hidrataba el hilo, que después se estiró durante el secado.

55

En el transcurso de múltiples ciclos de aclarado y secado, la longitud total del hilo se aumentó entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 100 %. El hilo fabricado como se ha descrito anteriormente fallará

60

a una fuerza de tracción de entre aproximadamente 0,25 kg y aproximadamente 1,50 kg y se hinchará en diámetro en aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 100 % cuando se hidrate. Puede persistir *in vivo* como un hilo entre 1 y 9 meses.

**5 Ejemplo 2: Tratamiento de arrugas de un cadáver con hilos de ácido hialurónico**

Se fijaron agujas hipodérmicas (22 a 25 Ga) con hebras sencillas o dobles de hilos de ácido hialurónico, que variaban de espesores de 0,004 a 0,008 pulgadas. Se usaron hilos no reticulados e hilos reticulados usando BDDE. Las agujas fueron capaces de atravesar arrugas en una cabeza de cadáver de una mujer de 50 años, tal como el  
10 pliegue nasolabial, perioral, periorbitarias, músculo frotal (frente) y glabellar. La aguja fue capaz de arrastrar el hilo a través de la piel de forma tal que el hilo se ubicó donde se insertó previamente la aguja.

**Ejemplo 3: Colocación de hilos de ácido hialurónico en perros**

15 Se realizaron estudios caninos agudos y crónicos. Se fijaron agujas hipodérmicas (22 a 25 Ga) con hebras sencillas o dobles de hilos de ácido hialurónico, que variaban de espesores de 0,004 a 0,008 pulgadas. Se usaron hilos no reticulados e hilos reticulados usando BDDE. En todos los casos, la aguja fue capaz del tirar del hilo o los hilos enlazados hasta la dermis. En cuestión de minutos, la mayoría de los hilos produjeron un impacto visible sobre la superficie de la piel de los animales en forma de una protuberancia lineal.  
20

**Ejemplo 4: Comparación de la resistencia a la tracción de diferentes hilos de ácido hialurónico**

La resistencia a la tracción de un hilo auto-reticulado de ácido hialurónico se comparó con un hilo reticulado usando el método del Ejemplo 1. Un hilo de ácido hialurónico no reticulado se congeló y se descongeló repetidamente,  
25 replicando un método de auto-reticulación de ácido hialurónico (Ref. Patente USPTO 6.387.413). Todas estas muestras presentaban una menor fuerza de tracción hasta el fallo que un hilo fabricado usando los mismos parámetros de extrusión y reticulado usando BDDE como se ha descrito anteriormente.

Finalmente, cabe apreciar que existen formas alternativas de implementar la presente invención. Por consiguiente,  
30 las presentes realizaciones se deben considerar como ilustrativas y no restrictivas, y la invención no debe limitarse a los detalles dados en el presente documento, sino que puede modificarse dentro del alcance y equivalentes de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 1 Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado compuesto por ácido hialurónico reticulado o sales del mismo, donde el ácido hialurónico reticulado se ha reticulado con éter diglicídico de butanodiol (BDDE), y  
5 donde el hilo desecado tiene un diámetro de entre 0,00254 mm (0,0001 pulg.) y 2,54 mm (0,100 pulg.).
- 2 Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el hilo desecado está unido a una aguja.
- 10 3. Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el hilo desecado tiene un diámetro de entre 0,025 mm (0,001 pulgadas) y 0,508 mm (0,020 pulgadas).
4. Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el grado de reticulación entre el ácido hialurónico o la sal del mismo y BDDE está entre el 0,01 % y el 20 %.
- 15 5. Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el hilo desecado tiene una resistencia a la tracción axial de entre 0,4 N (0,1 lb) y 22 N (5 lb).
6. Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el  
20 desecado tiene una resistencia a la tracción final de entre 7 MPa (1 kpsi) y 862 MPa (125 kpsi).
7. Un relleno dérmico que comprende un hilo desecado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el área en sección transversal del hilo cuando está completamente hidratado se hincha hasta entre el 0 % y el 2500 %.

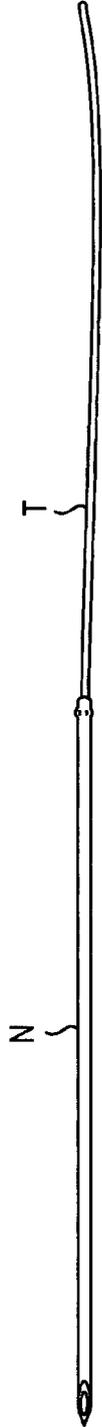


FIG. 1

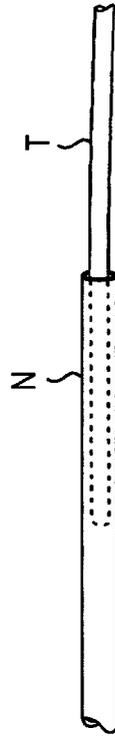


FIG. 2A

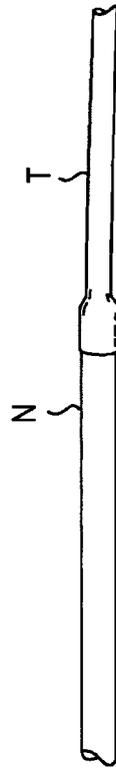


FIG. 2B

FIG. 3A

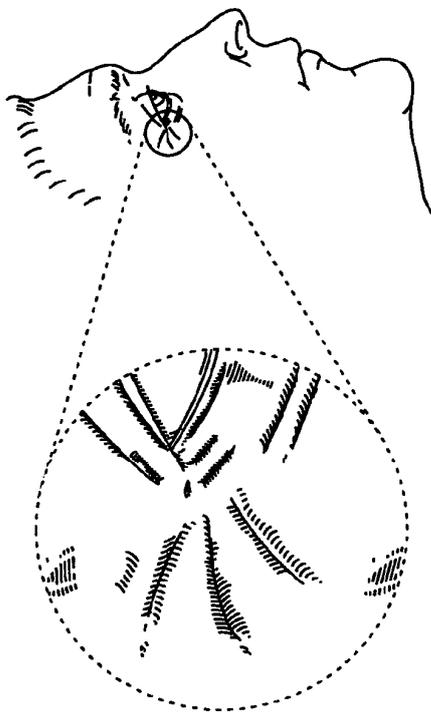
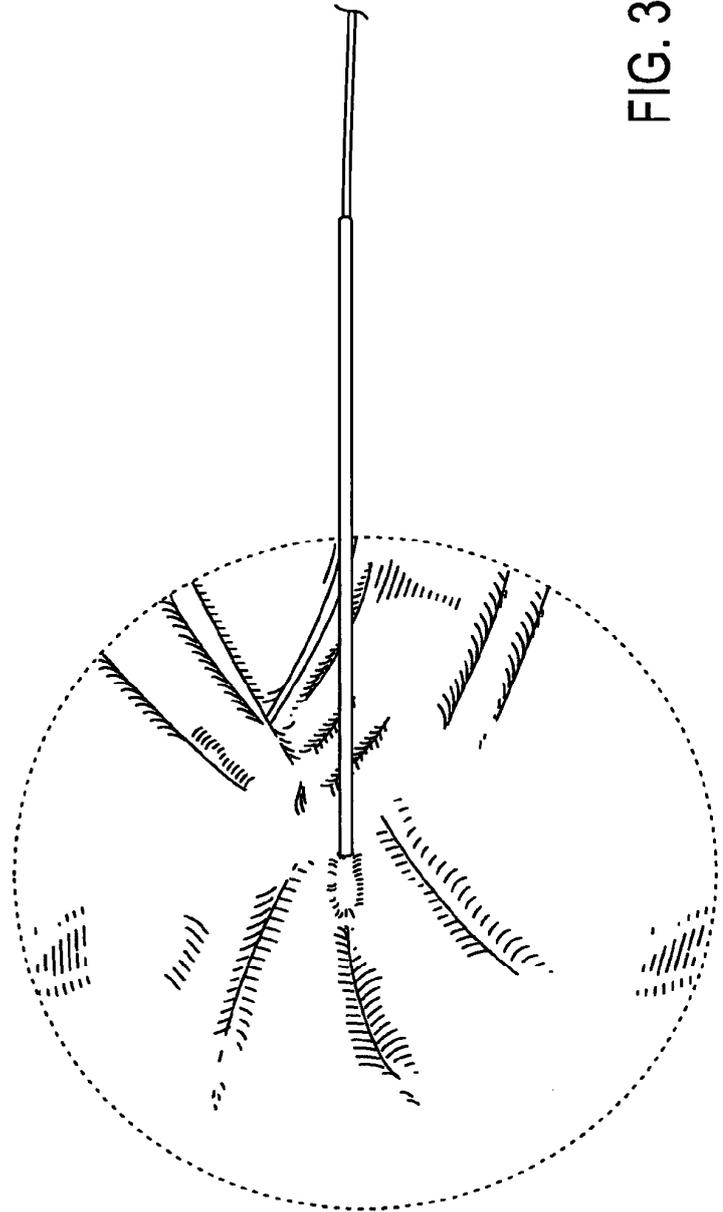
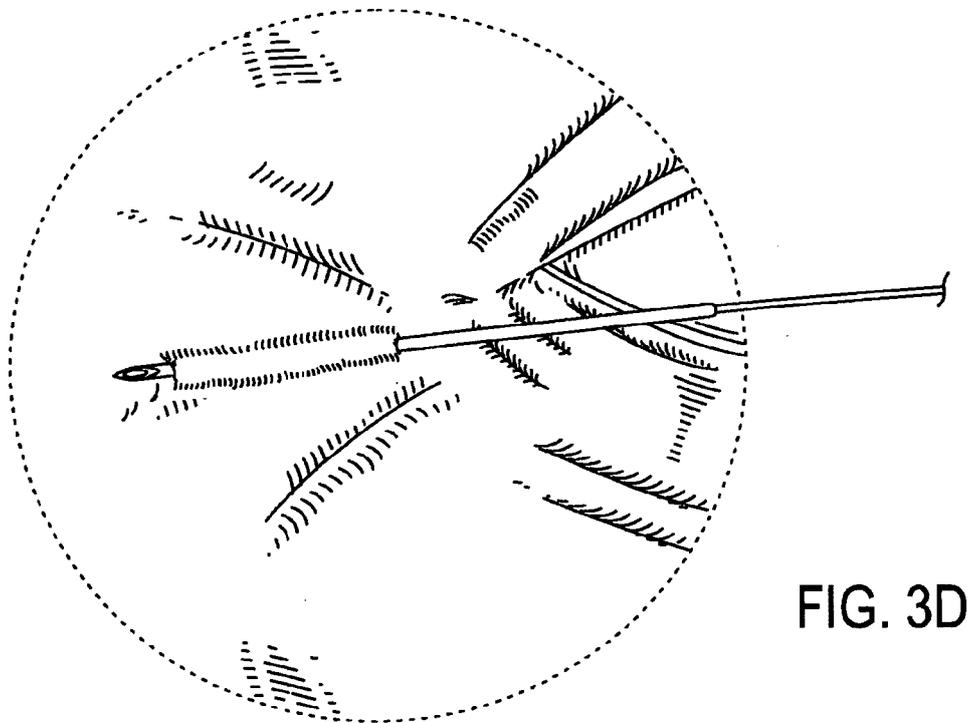
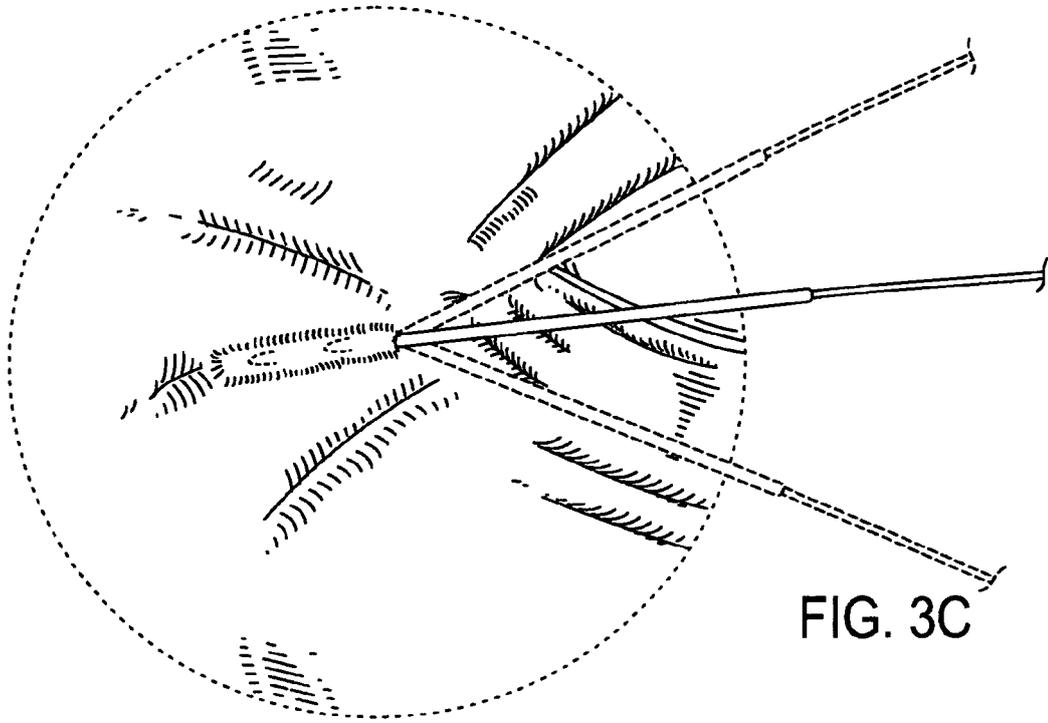


FIG. 3B





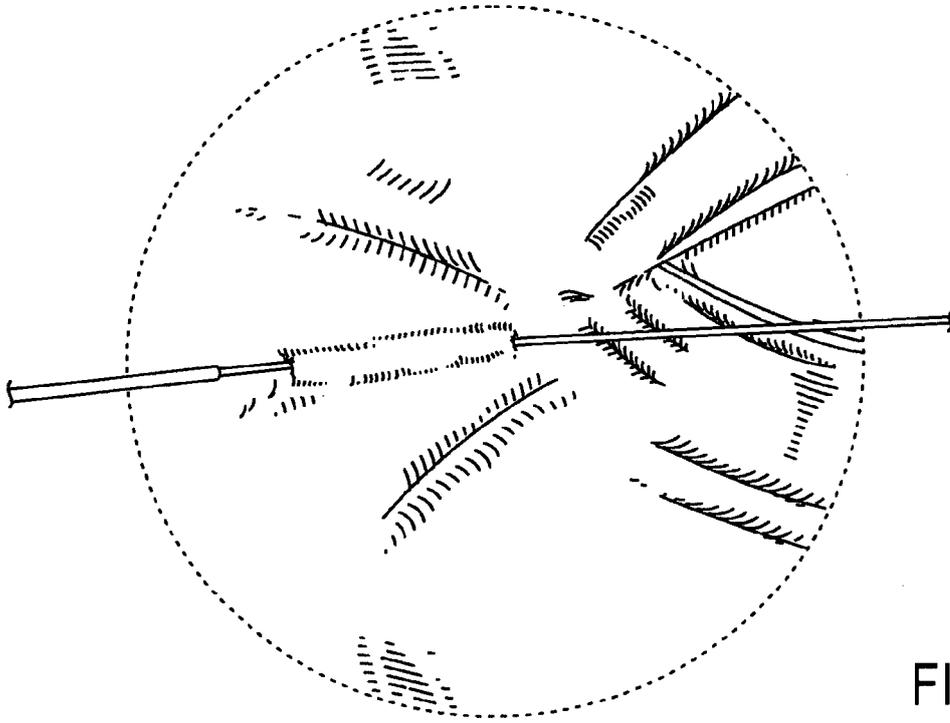


FIG. 3E

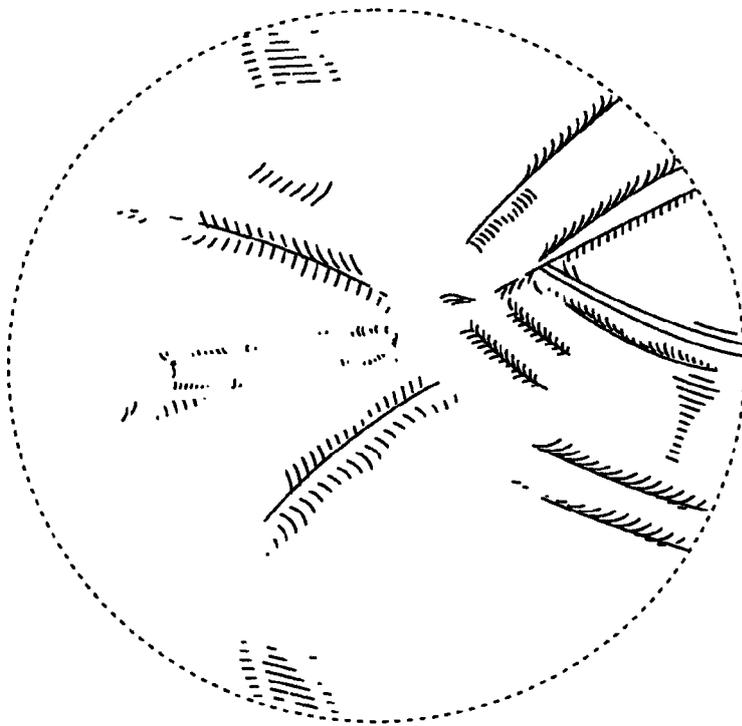


FIG. 3F

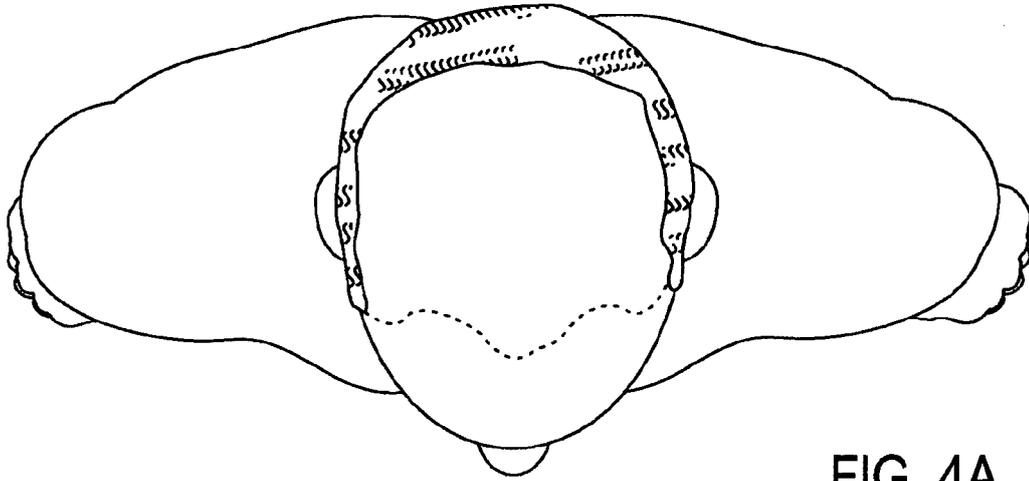


FIG. 4A

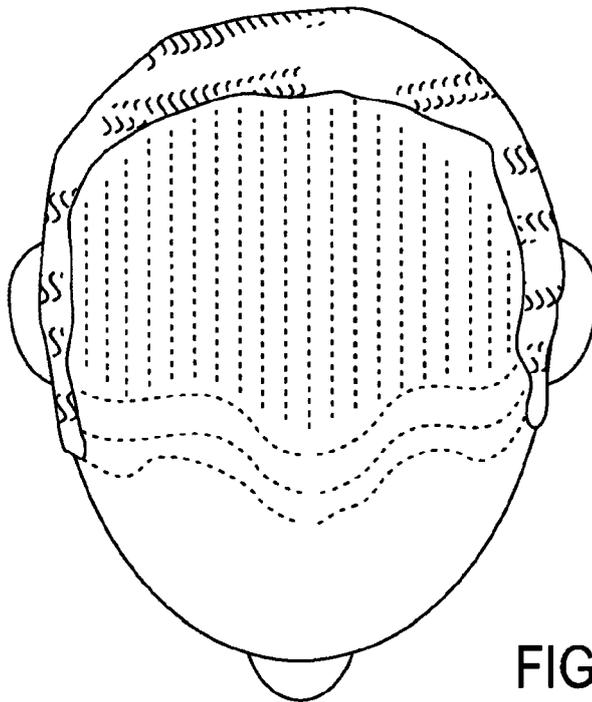


FIG. 4B

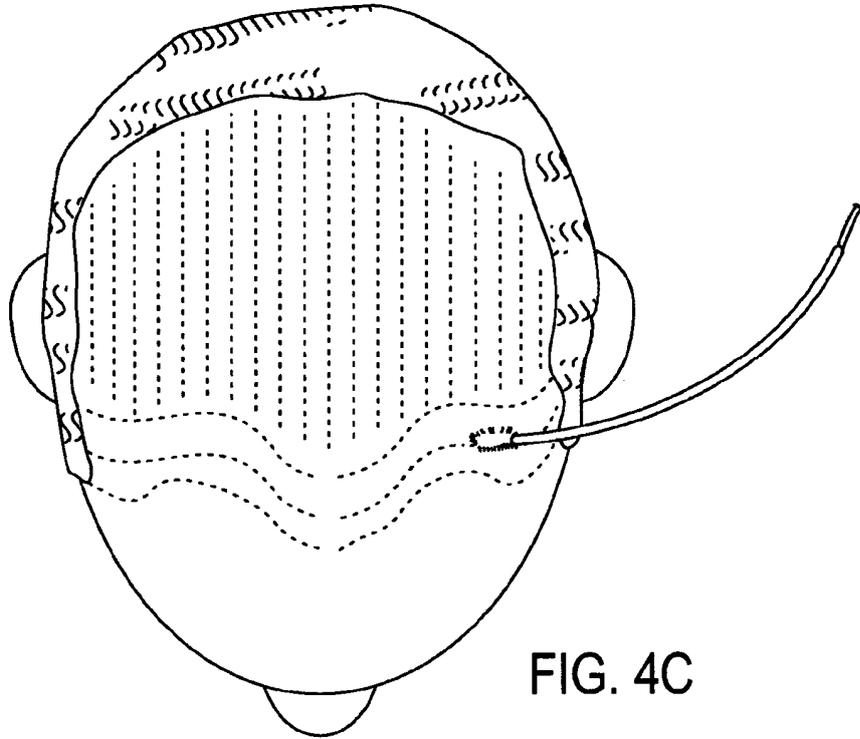


FIG. 4C

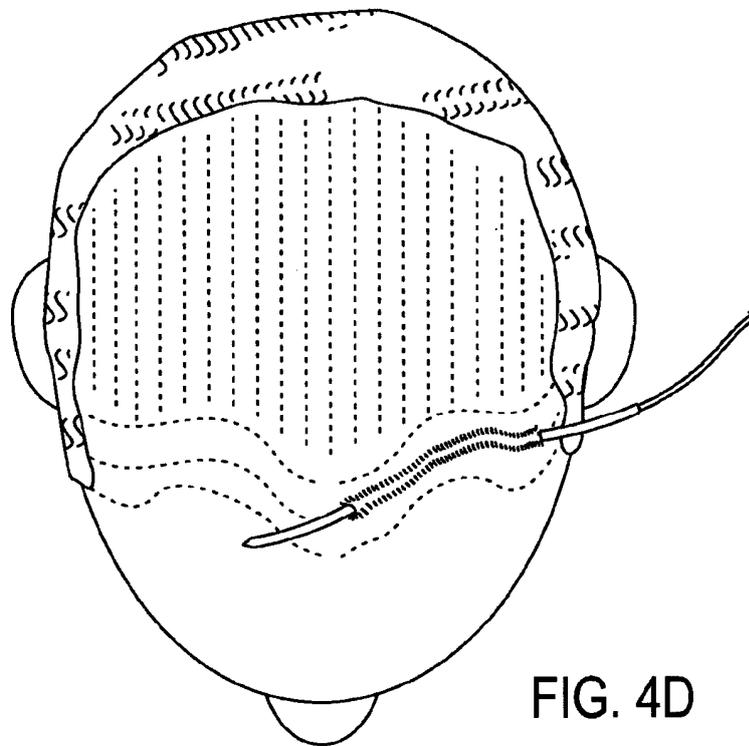


FIG. 4D

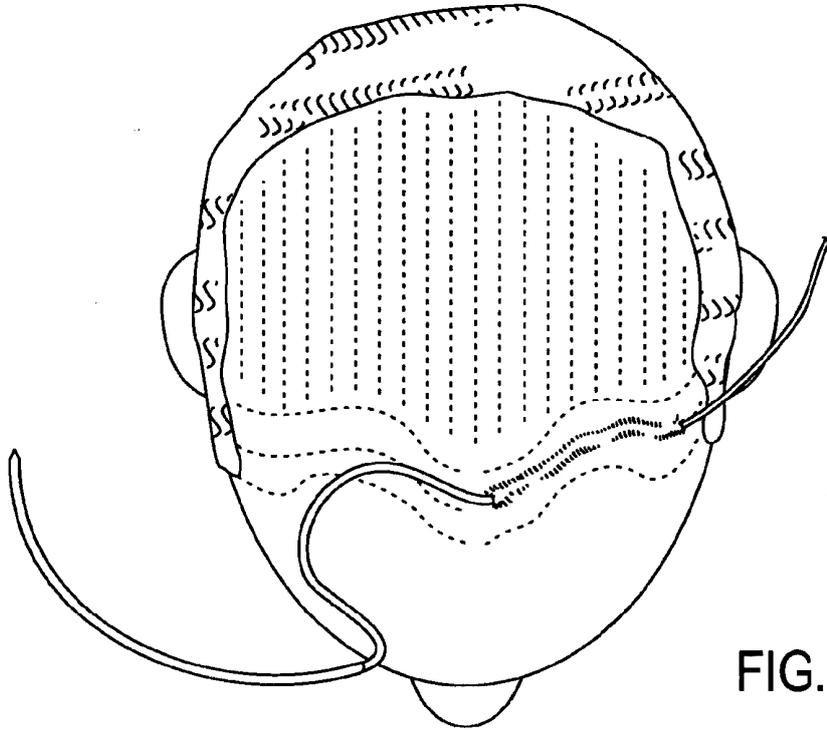


FIG. 4E

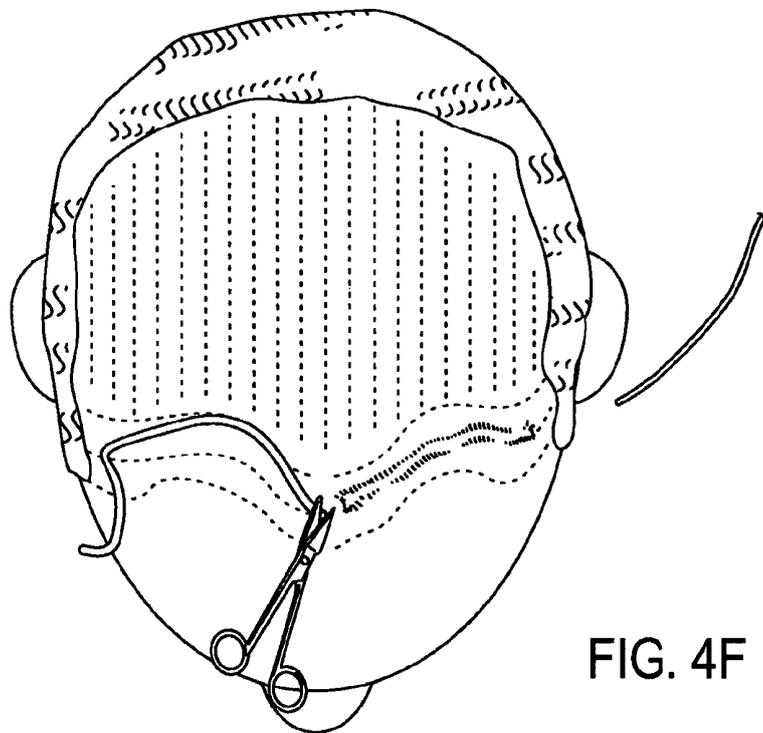


FIG. 4F

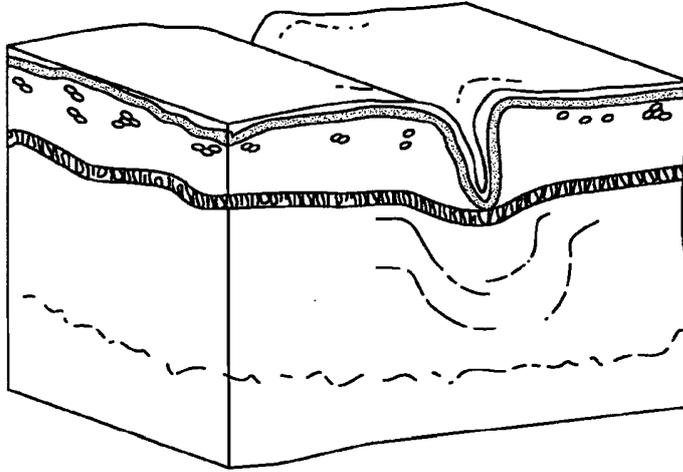


FIG. 5A

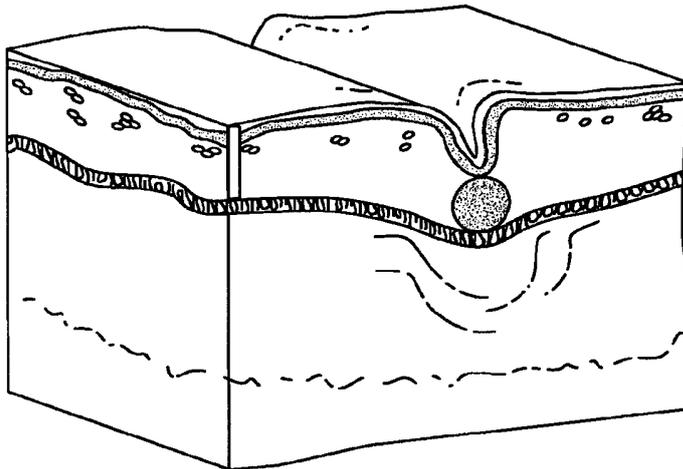


FIG. 5B

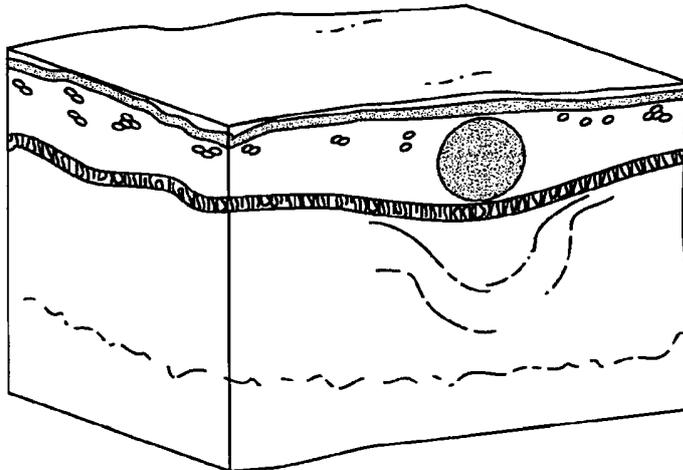
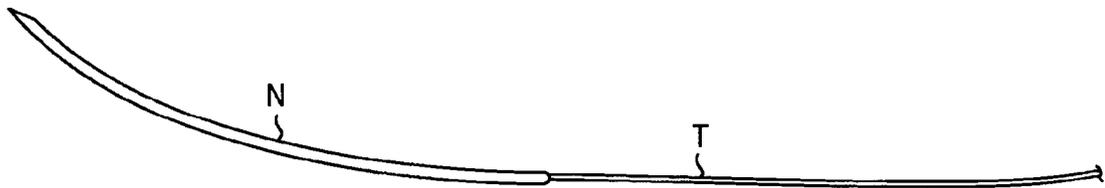
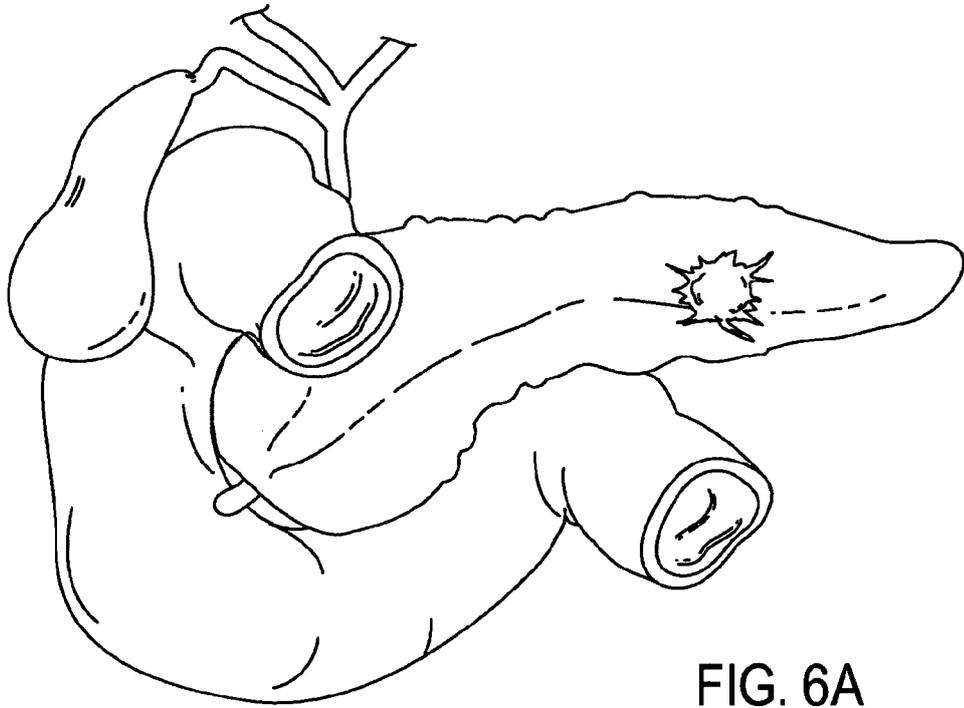


FIG. 5C



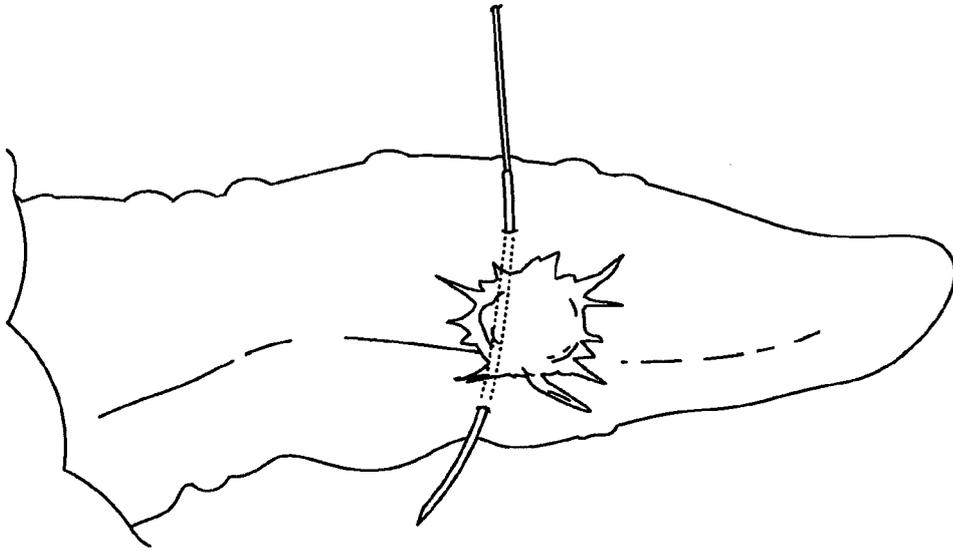


FIG. 6C

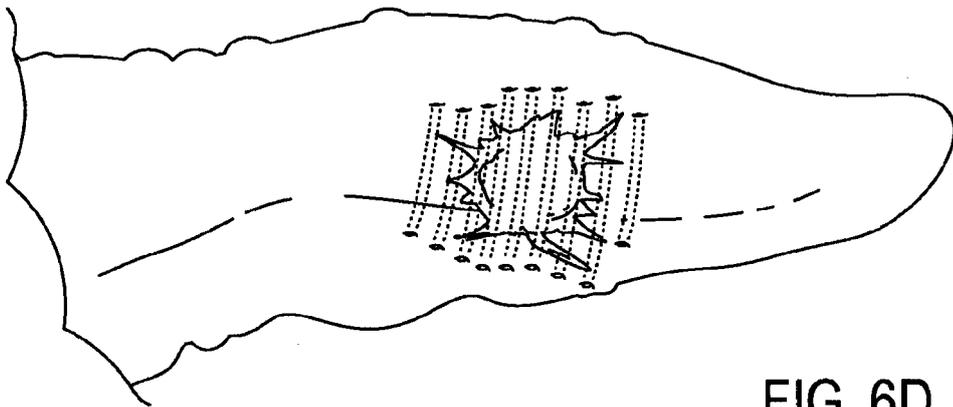


FIG. 6D

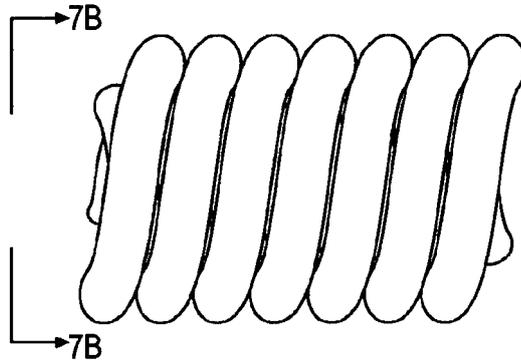


FIG. 7A

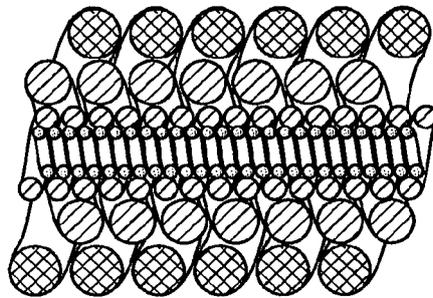


FIG. 7B

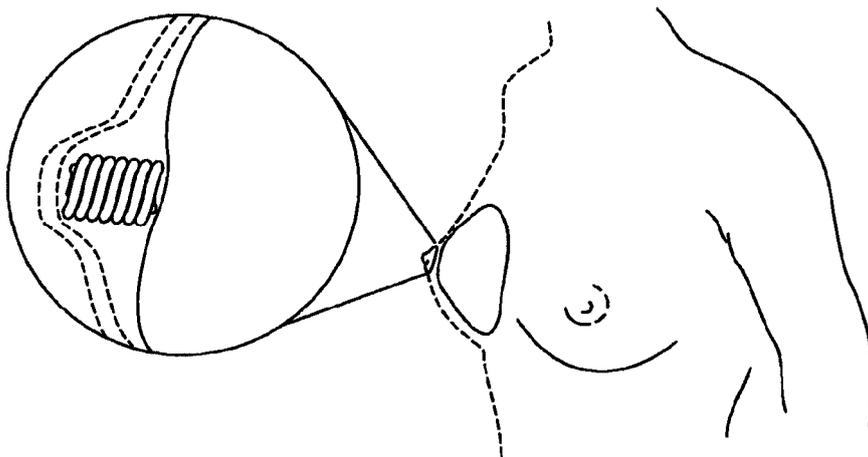


FIG. 7C

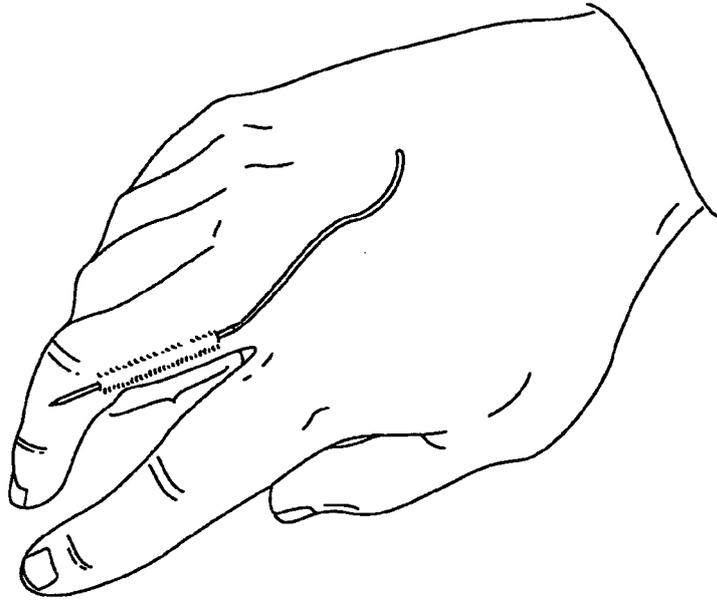


FIG. 8