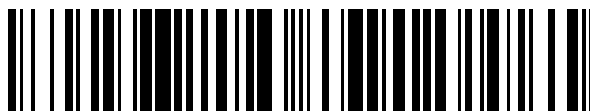


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 331**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2011 PCT/US2011/047041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12021490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 11748831 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2603248**

54 Título: **Matrices tisulares regenerativas**

30 Prioridad:

10.08.2010 US 372339 P

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**LIFECELL CORPORATION (100.0%)
One Millennium Way
Branchburg, NJ 08876-3876, US**

72 Inventor/es:

**OWENS, RICK, T.;
ELMO, LAURA;
LIU, MIKE y
MAO, YONG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 662 331 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

Matrices tisulares regenerativas.

5 La invención se define en las reivindicaciones. La presente descripción se refiere a métodos, mezclas y kits para el tratamiento de defectos o lesiones de tejidos u órganos, incluyendo métodos, mezclas y kits para la producción de matrices tisulares para el tratamiento de defectos tisulares.

10 Actualmente, en los procedimientos médicos y quirúrgicos se usan materiales humanos, animales y sintéticos para aumentar tejidos o corregir defectos tisulares. Para ciertos fines, se necesitan materiales con formas estables. En algunos casos, la forma de administración de tal material, p. ej., mediante procedimiento quirúrgico o mediante inyección, puede ser importante. Además, puede ser necesario que el material tenga capacidad de no migrar lejos de la ubicación que necesita tratamiento.

15 Diversos dispositivos y métodos actuales para el tratamiento de defectos de tejidos u órganos tienen ciertas desventajas. Por consiguiente, se necesitan dispositivos y métodos mejorados para el tratamiento de defectos de tejidos u órganos. El documento WO 2007/134134 desvela una matriz tisular para reparación tisular. El documento WO 2003/017826 desvela una composición de biomaterial que comprende una combinación de tejido procesado y un vehículo. Lee *et al* desvelan una matriz de material compuesto híbrido formada por poli(d,l-lactida-co-glicolida)
20 (PLGA) y una matriz de colágeno de procedencia natural para su uso en la regeneración de tejido óseo.

Ciertas formas de realización incluyen un método (p. ej., un método *ex vivo* y/o *in vivo*) que comprende la aportación de una matriz tisular acelular (ATM) particulada y una solución que comprende un polímero disuelto en un disolvente. El método puede incluir además la mezcla de la solución con la ATM particulada para crear una mezcla y
25 la puesta en contacto de la mezcla con un medio acuoso. El disolvente puede difundir desde la mezcla y se puede formar una matriz tisular.

Algunas formas de realización incluyen una mezcla de matriz tisular que comprende una matriz tisular acelular (ATM) particulada, un polímero y un disolvente miscible con agua. Cuando la mezcla se pone en contacto con un
30 medio acuoso, el disolvente miscible con agua puede ser capaz de difundir desde la mezcla para formar una matriz tisular a partir del polímero y la ATM.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento de preparación de una matriz tisular.

La Figura 2 ilustra la implantación de una matriz tisular en un defecto, de acuerdo con ciertas formas de realización.

40 La Figura 3A es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina que comprende PCL bajo una magnificación de 400x, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

45 La Figura 3B es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende PCL, pADM y dioxano bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La Figura 3C es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende PCL, pADM y NMP bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

50 La Figura 3D es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina que comprende P4HB bajo una magnificación de 400x, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

55 La Figura 3E es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y dioxano bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

60 La Figura 3F es un explante subdérmico de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y NMP bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La Figura 4A es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina que comprende PCL bajo una magnificación de 400x, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

5 La Figura 4B es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende PCL, pADM y dioxano bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

10 La Figura 4C es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende PCL, pADM y NMP bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

La Figura 4D es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina que comprende P4HB bajo una magnificación de 400x, tal y como se describe en el Ejemplo 1.

15 La Figura 4E es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y dioxano bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

20 La Figura 4F es un explante subdérmico de doce semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende P4HB, pADM y NMP bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

25 La Figura 5A es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP bajo una magnificación de 20x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

La Figura 5B es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP bajo una magnificación de 100x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

30 La Figura 5C es un explante de cóndilo femoral de cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina procedente de una matriz tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP bajo una magnificación de 400x de acuerdo con un procedimiento descrito en el Ejemplo 2.

35 La Figura 6 es una imagen de un cóndilo femoral de doce semanas después de la implantación en un defecto tisular de una matriz tisular inyectable que comprende BHA, pADM y NMP.

Descripción de formas de realización ejemplares

40 La invención se define en las reivindicaciones. 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. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitativo.

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 Se entenderá que los beneficios y ventajas descritos en el presente documento pueden referirse a una forma de realización o a varias formas de realización. Además, se entenderá que la mención de "un" elemento se refiere a uno o más de esos elementos.

50 Las etapas de los métodos descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, o simultáneamente cuando proceda.

Cuando proceda, los aspectos de cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento pueden combinarse con aspectos de cualquiera de los otros ejemplos descritos para formar ejemplos adicionales con propiedades comparables o diferentes y referidos a los mismos problemas o a problemas diferentes.

55 Se entenderá que la descripción de las formas de realización preferidas del presente documento se da únicamente a modo de ejemplo y los expertos en la materia pueden hacer diversas modificaciones. La memoria descriptiva, los ejemplos y los datos del presente documento proporcionan una descripción completa de la estructura y uso de las formas de realización ejemplares de la invención.

60

El término “matriz tisular acelular” (ATM), tal y como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que está sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. Se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., dermis) y otros tejidos, tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias, cartílago, hueso, nervios y tejidos conjuntivos para crear matrices acelulares comprendidas dentro del alcance de la presente descripción (p. ej., mediante eliminación de las células y/o los componentes celulares). Las matrices tisulares acelulares se pueden probar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias formas. Por ejemplo, los tejidos procesados se pueden inspeccionar con microscopía óptica para determinar si permanecen células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, se pueden usar ciertos ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar la presencia de restos de materiales nucleares en las matrices tisulares. Generalmente, la ausencia de restos de ADN u otros ácidos nucleicos será indicativa de una descelularización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Por último, se pueden usar otros ensayos que identifican componentes específicos de las células (p. ej., antígenos superficiales) para determinar si las matrices tisulares son acelulares.

Las matrices tisulares de la presente descripción pueden incluir una ATM con capacidad biológica para soportar la regeneración tisular. En algunas formas de realización, las matrices tisulares pueden soportar el crecimiento celular hacia el interior y la diferenciación celular. Por ejemplo, las matrices se pueden usar para el crecimiento tisular hacia el interior, la cirugía ortopédica, aplicaciones periodontales, la remodelación tisular o la restauración tisular. En una forma de realización, las matrices tisulares producen una respuesta tisular regenerativa, tal y como se demuestra mediante la presencia de células similares a los fibroblastos y vasos sanguíneos.

En diversas formas de realización, las matrices tisulares se pueden usar para el tratamiento de varios sitios anatómicos diferentes en un amplio abanico de aplicaciones. Ciertas aplicaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, apósitos absorbentes, regeneración dérmica (p. ej., para tratamientos de todo tipo de úlceras y quemaduras), regeneración de nervios, regeneración de cartílagos, regeneración o reparación de tejido conjuntivo, regeneración ósea, revestimiento de herida/espuma, apósitos con venda integrada, substrato/base para injertos cutáneos, regeneración vascular, cirugía plástica, recubrimiento de implantes metálicos y/o poliméricos (por ejemplo, para aumentar la integración y biocompatibilidad del implante) y sustitución de tejido perdido (p. ej., después de traumatismos, reducción mamaria, mastectomía, lumpectomía, parietectomía o extirpación de tumores).

Las matrices tisulares pueden provocar una respuesta inmunológica o inflamatoria reducida cuando se implantan en un animal, en comparación con el polímero o polímeros usados para producir la propia matriz. El efecto de la matriz tisular en el huésped se puede probar usando varios métodos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el efecto de la matriz tisular en el huésped se puede probar midiendo la respuesta inmunológica o inflamatoria a la matriz implantada. La respuesta inmunológica o inflamatoria a la matriz tisular se puede medir mediante varios métodos, incluyendo métodos histológicos. Por ejemplo, la matriz explantada se puede teñir y observar al microscopio para su evaluación histológica, tal y como se describe más adelante. En algunas formas de realización, la respuesta inmunológica o inflamatoria a la matriz se puede demostrar midiendo el número de células inflamatorias (p. ej., leucocitos). La respuesta inmunológica o inflamatoria atenuada a la matriz se puede asociar a un número reducido de células inflamatorias, tal y como se describe más adelante. Por ejemplo, las células inflamatorias se pueden medir por métodos de tinción inmunohistoquímica diseñados para identificar linfocitos, macrófagos y neutrófilos. Los métodos inmunohistoquímicos también se pueden usar para determinar la presencia de citoquinas inflamatorias, incluyendo interleuquina-1, TNF-alfa y TGF-beta.

En diversas formas de realización, las matrices tisulares de la presente descripción se pueden usar para tratar cualquiera de entre una amplia gama de trastornos. Los defectos tisulares se pueden producir por muchas causas, incluyendo, por ejemplo, malformaciones congénitas, lesiones traumáticas, infecciones y resecciones oncológicas. Las matrices tisulares se pueden usar para tratar defectos musculoesqueléticos, p. ej., en forma de injerto articular para soportar la regeneración de cartílago. Las matrices tisulares también se pueden usar para tratar defectos en cualquier tejido blando, p. ej., los tejidos que conectan, soportan o circundan otras estructuras y órganos del cuerpo. El tejido blando puede ser cualquier tejido no óseo.

Las matrices tisulares se pueden usar para tratar tejidos blandos en muchos sistemas de órganos diferentes. Estos sistemas de órganos pueden incluir, pero no se limitan a, el sistema muscular, el sistema genitourinario, el sistema gastroenterológico, el sistema integumentario, el sistema circulatorio y el sistema respiratorio. Las matrices tisulares también pueden ser útiles para tratar el tejido conjuntivo, incluyendo las fascias, una capa especializada que rodea los músculos, huesos y articulaciones del tórax y la pared abdominal, y para la reparación y refuerzo de debilidades tisulares en anatomía urológica, ginecológica y gastroenterológica. En algunas formas de realización, el tejido u órgano que necesita tratamiento se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en piel, hueso, cartílago,

menisco, dermis, miocardio, periostio, arteria, vena, estómago, intestino delgado, intestino grueso, diafragma, tendón, ligamento, tejido neural, músculo estriado, músculo liso, vejiga, uretra, uréter y encías.

La Figura 1 ilustra las etapas de preparación de una matriz tisular. Las matrices pueden incluir una ATM particulada (etapa 100). En algunas formas de realización, la ATM puede proceder de, por ejemplo, dermis, cartílago, hueso, hueso desmineralizado, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias o tejido conjuntivo nervioso. La preparación de ATM particuladas se describe con más detalle más adelante. En algunas formas de realización, la ATM particulada comprende partículas de tamaño uniforme. La ATM particulada puede comprender una ATM dérmica. En algunas formas de realización, la ATM dérmica es una matriz tisular humana. En algunas formas de realización, la ATM dérmica es una matriz tisular porcina. En algunas formas de realización, la ATM particulada es una matriz tisular cartilaginosa, que puede proceder de cartílago humano. En algunas formas de realización, la matriz tisular cartilaginosa procede de cartílago porcino. En algunas formas de realización, la ATM particulada comprende una matriz tisular ósea. En algunas formas de realización, la matriz tisular ósea procede de hueso humano. En algunas formas de realización, la matriz tisular ósea procede de hueso porcino.

La ATM se puede seleccionar para que proporcione varias propiedades biológicas y mecánicas diferentes. Por ejemplo, la ATM se puede seleccionar para que permita el crecimiento celular hacia el interior y el remodelado celular con el fin de permitir la regeneración del tejido normalmente encontrado en el sitio en el que se implanta la matriz. Por ejemplo, la ATM, cuando se implanta sobre o en cartílago, se puede seleccionar para que permita la regeneración del cartílago sin producir una fibrosis o formación de cicatrices excesiva. Además, la ATM se puede seleccionar para limitar una reacción inflamatoria excesiva y para producir tejido similar al tejido original del huésped. En algunas formas de realización, la ATM comprende colágeno, elastina y canales vasculares. Los ejemplos de ATM se describen más adelante.

Además, las matrices tisulares pueden incluir uno o más materiales poliméricos, que se pueden seleccionar de entre varios tipos de polímeros. Tal y como se usa en el presente documento, los materiales poliméricos pueden incluir polímeros sintéticos y/o polímeros de origen natural. Asimismo, los materiales poliméricos pueden incluir polímeros individuales y/o mezclas de polímeros (copolímeros). En algunas formas de realización, los materiales poliméricos pueden incluir poliglicolida, polilactida, polidioxano (u otros ésteres de poliéter), poli(lactida-co-glicolida) y/o polihidroxialconatos. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, el material polimérico puede incluir polihidroxialconatos tales como, por ejemplo, polihidroxibutirato (p. ej., poli-3-hidroxibutirato, poli-4-hidroxibutirato (P4HB)), polihidroxiacetoato, polihidroxihexanoato, polihidroxi octanoato, o carbonato de trimetileno. Como alternativa, o además, el material polimérico puede incluir policaprolactona (PCL) y/o derivados del ácido hialurónico (p. ej., ésteres, anhídridos, etc.) tales como, por ejemplo, un derivado del éster bencílico del ácido hialurónico (BHA). En ciertas formas de realización, los materiales poliméricos de las matrices tisulares pueden proporcionar una estructura para la ATM. La estructura puede aumentar la integración, biocompatibilidad y estabilidad del implante y puede evitar la migración del implante lejos del sitio de tratamiento. Además, la inclusión de la ATM con el polímero en las matrices tisulares puede aumentar la aceptación del polímero mediante atenuación o reducción de la respuesta inmunológica o inflamatoria, en comparación con un implante que comprende solo el polímero.

En algunas formas de realización, el polímero se puede disolver en un disolvente adecuado (etapa 120) para formar una solución polimérica. Tal y como se usa en el presente documento, el disolvente puede incluir mezclas de disolventes. En ciertas formas de realización, el disolvente se puede seleccionar en función del polímero usado y/o el ambiente en el que se mezclará o desde el que se administrará con el fin de que tenga una reactividad adecuada para evitar reacciones no deseadas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede usar cualquier disolvente en el que sea soluble el polímero en concreto. En ciertas formas de realización, el disolvente se puede seleccionar para que sea biocompatible y miscible con agua. El disolvente seleccionado también puede ser débilmente volátil. En algunas formas de realización, el disolvente puede incluir, por ejemplo, dioxano, N-metil-2-pirrolidona (NMP) y/o dimetilsulfóxido (DMSO). La disolución del polímero en el disolvente puede proporcionar una solución de viscosidad apropiada para acomodar, mediante mezcla con la ATM particulada, y facilitar la implantación de la combinación (p. ej., mediante inyección, empaquetamiento en un sitio, etc.). La concentración de polímero se puede manipular para crear una mezcla más o menos viscosa.

Como ejemplo, en algunas formas de realización, se puede disolver PCL en dioxano y/o NMP. En ciertas formas de realización, la PCL disuelta en dioxano y/o NMP puede ser de aproximadamente el 5-30 % (p/v). En una forma de realización adicional, la PCL disuelta en disolvente de dioxano y/o NMP puede ser del 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, o 30 % (p/v); del 5% al 30 % (p/v); o del 10 % al 20 % (p/v) y cualquier valor intermedio.

En otras formas de realización, se puede disolver P4HB en dioxano y/o NMP. En algunas formas de realización, el P4HB disuelto en dioxano y/o NMP puede ser de aproximadamente el 5-40 % (p/v). En una forma de realización

adicional, el P4HB disuelto en dioxano y/o NMP puede ser del 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 % o 40 % (p/v); del 5 % al 40 % (p/v); o del 10 % al 30 % (p/v) y cualquier valor intermedio.

5 En otras formas de realización, se puede disolver BHA en DMSO y/o NMP. En algunas formas de realización, el BHA disuelto en DMSO y/o NMP puede ser de aproximadamente el 5-50 % (p/v). En una forma de realización adicional, el BHA disuelto en DMSO y/o NMP puede ser del 5 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % (p/v); del 5 % al 50 % (p/v); del 5 % al 40 % (p/v); del 10 % al 40 % (p/v), o del 10 % al 30 % (p/v) y cualquier valor intermedio.

10 Cada uno de estos materiales de matriz puede otorgar diferentes propiedades al producto final permitiendo la manipulación del recambio/la persistencia, las propiedades biomecánicas y la respuesta biológica general *in vivo*.

A continuación, la solución polimérica se puede mezclar con la ATM particulada (etapa 130). En algunas formas de realización, el volumen de la solución polimérica se puede seleccionar para proporcionar una concentración final del 15 25 % (p/p) de polímero total cuando se combina con la ATM particulada. El método de mezclado de la solución con la ATM particulada se puede seleccionar en función de la ubicación prevista para la formación de la matriz tisular. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la solución se puede mezclar con la ATM particulada en cualquier recipiente adecuado. En otras formas de realización, la solución y la ATM particulada se pueden mezclar en una o más jeringas. Por ejemplo, la ATM particulada se puede colocar en una primera jeringa. Se puede introducir un 20 volumen deseado de solución polimérica en una segunda jeringa. A continuación, se pueden acoplar la primera y segunda jeringas y los materiales de cada una se pueden mezclar mediante el paso de los materiales entre las jeringas. A continuación, se puede transferir la mezcla final resultante a una única jeringa. A continuación, se puede conectar una aguja o cánula a la jeringa para facilitar la inyección de la mezcla.

25 En algunas formas de realización, algunos o todos los componentes de la mezcla de matriz tisular se pueden premezclar o preempaquetar juntos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se puede proporcionar un polímero ya disuelto en un disolvente a una concentración deseada para preparar la mezcla de matriz tisular. De forma similar, en algunas formas de realización, se puede premezclar una solución que tenga un polímero disuelto en un disolvente con una ATM particulada, empaquetar en las cantidades deseadas y almacenar para su uso 30 posterior. Por tanto, la mezcla de matriz tisular final se puede preparar de forma previa a la formación de la matriz tisular y/o antes de su almacenamiento, envío o venta.

A continuación, la mezcla final de ATM particulada, polímero y disolvente se puede poner en contacto con un medio acuoso (etapa 140), permitiendo que el disolvente difunda desde la mezcla para formar una matriz tisular a partir del 35 polímero y la ATM. En algunas formas de realización *in vivo*, la mezcla final se puede colocar en, sobre, o cerca de un sitio tisular. Tal y como se ha comentado anteriormente, las matrices tisulares se pueden usar en un abanico de aplicaciones y para el tratamiento de muchos sitios anatómicos diferentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la mezcla final se puede colocar en un defecto tisular de tejido blando. Tras colocación de la mezcla *in situ*, el disolvente puede difundir al tejido circundante o al espacio intersticial.

40 En las formas de realización *ex vivo*, la mezcla final se puede poner en contacto con un medio acuoso antes de la implantación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la mezcla final se puede colocar en un molde que tenga una forma deseada. Un molde puede incluir un tubo Eppendorf, un tubo metálico, un tubo de inyección, o un molde con la forma de un defecto de un tejido u órgano en el que se vaya a implantar la matriz tisular. En tales 45 formas de realización, la mezcla final y/o el molde se pueden exponer a un medio acuoso para facilitar la difusión del disolvente desde la mezcla. Por ejemplo, la mezcla final y/o el molde se pueden enjuagar, lavar y/o embeber en un baño para eliminar todo o parte del disolvente de la mezcla final.

La difusión del disolvente puede dejar una matriz tisular de ATM y polímero distribuida consistentemente. La matriz 50 tisular resultante puede consistir en partículas tisulares regenerativas encerradas en una matriz de soporte polimérica/sintética. En algunas formas de realización, la matriz tisular puede tener una forma tridimensional que es estable bajo estrés mecánico. Tal y como se ha comentado anteriormente, los materiales de la matriz se pueden seleccionar para conseguir una matriz tisular que tenga unas determinadas propiedades biomecánicas. Por tanto, dependiendo del uso previsto, la matriz tisular puede ser rígida, elástica, resiliente y/o viscoelástica. En algunas 55 formas de realización, los materiales de la matriz se pueden seleccionar para formar una matriz tisular que tenga una rigidez sustancialmente similar a la del tejido de la ubicación diana. Además, en algunas formas de realización, la matriz tisular también puede resistir la migración desde la ubicación diana.

La Figura 2 proporciona una ilustración ejemplar de la implantación de una matriz tisular para tratar un defecto (505) 60 en un hueso largo (500) (p. ej., fémur o húmero). En diversas formas de realización, se puede implantar una matriz

(180a) en la ubicación del defecto (505). En algunas formas de realización, la matriz tisular (180a) se puede implantar mediante inyección a través de una aguja o cánula (510) acoplada a una jeringa (515) que suministra el material de la matriz tisular.

5 Matrices tisulares acelulares

El término "matriz tisular acelular" (ATM), tal y como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier matriz tisular que está sustancialmente libre de células y/o componentes celulares. Se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias, cartílago, hueso y tejido conectivo nervioso para crear matrices acelulares comprendidas dentro del alcance de la presente descripción. Las matrices tisulares acelulares se pueden probar o evaluar para determinar si están sustancialmente libres de células y/o componentes celulares de varias formas. Por ejemplo, los tejidos procesados se pueden inspeccionar con microscopía óptica para determinar si permanecen células (vivas o muertas) y/o componentes celulares. Además, se pueden usar ciertos ensayos para identificar la presencia de células o componentes celulares. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de ADN u otros ácidos nucleicos para cuantificar la presencia de restos de materiales nucleares en las matrices tisulares. Generalmente, la ausencia de restos de ADN u otros ácidos nucleicos será indicativa de una descelularización completa (es decir, eliminación de células y/o componentes celulares). Por último, se pueden usar otros ensayos que identifican componentes específicos de las células (p. ej., antígenos superficiales) para determinar si las matrices tisulares son acelulares. Se puede usar piel, partes de la piel (p. ej., la dermis) y otros tejidos tales como vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, fascias, cartílago, hueso y tejido conectivo nervioso para crear matrices acelulares comprendidas dentro del alcance de la presente descripción.

En general, las etapas implicadas en la producción de una ATM incluyen la extracción del tejido de un donante (p. ej., un cadáver humano o una fuente animal) y la eliminación de las células en condiciones que preserven su función biológica y estructural. Por ejemplo, las funciones biológicas y estructurales deseadas incluyen la capacidad de soportar el crecimiento celular hacia el interior y la regeneración tisular para proporcionar un soporte mecánico (p. ej., a un sitio o defecto quirúrgico) y/o evitar una respuesta inmunológica, inflamación, fibrosis y/o formación de cicatrices excesivas. En ciertas formas de realización, el procedimiento incluye un tratamiento químico para estabilizar el tejido y evitar la degradación bioquímica y estructural junto con, o antes de, la eliminación de las células. En diversas formas de realización, la solución estabilizante 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/o uno o más relajantes del músculo liso.

A continuación, el tejido se coloca en una solución de descelularización para eliminar las células viables (p. ej., células epiteliales, células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar la integridad biológica y estructural de la ATM (p. ej., matriz de colágeno). La integridad de la ATM se puede probar de varias formas. Por ejemplo, se puede usar calorimetría de barrido diferencial para identificar cambios de la temperatura de transición térmica que indiquen entrecruzamiento (elevación de la temperatura de transición) o degradación del colágeno (disminución de la temperatura de transición). Además, la microscopía electrónica puede demostrar cambios en los patrones normales de colágeno y los ensayos de digestión enzimática pueden demostrar daños en el colágeno. Además, la pérdida de diversos glicosaminoglicanos (p. ej., sulfato de condroitina y ácido hialurónico) puede indicar un cambio no deseado en la matriz tisular.

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. Los métodos de producción de ATM adecuados se describen en, por ejemplo, H. Xu et al., A Porcine-Derived Acellular Dermal Scaffold That Supports Soft Tissue Regeneration: Removal of Terminal Galactose- α -(1,3)-Galactose and Retention of Matrix Structure. *Tissue Eng. Parte A*, Vol. 15, 1-13 (2009) ("Xu"). En particular, el párrafo bajo el subtítulo "Test materials" de la página 2 de Xu describe un método de producción de ATM a partir de piel porcina adecuado.

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 (DNasa). En algunas formas de realización, la muestra de tejido se trata con una solución de DNasa preparada en tampón DNasa (20 mM 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 DNasa. Se

puede usar cualquier tampón adecuado siempre y cuando el tampón proporcione una actividad DNasa adecuada.

Aunque una ATM se puede hacer a partir de uno o más individuos de la misma especie como receptores de la matriz tisular, este no es necesariamente el caso. Por tanto, por ejemplo, una ATM de la matriz tisular se puede hacer a partir de tejido porcino. Entre las especies que pueden servir como receptores de ATM y donantes de tejidos u órganos para la producción de la ATM se incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, cobayas, jerbos, hámsteres, ratas o ratones.

10 La eliminación de los epítomos Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R ("epítomos α -gal") de la ATM puede reducir la respuesta inmunitaria frente a la ATM. El epítomo α -gal se expresa en mamíferos no primates y en monos del Nuevo Mundo (monos de Sudamérica) en macromoléculas tales como las glicoproteínas 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. Los anticuerpos anti-gal se producen en humanos y primates como resultado de una respuesta inmune a estructuras de carbohidratos de epítomo 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).

20 Como los mamíferos que no son primates (p. ej., cerdos) producen epítomos α -gal, el xenotrasplante de ATM de estos mamíferos en primates deriva, con frecuencia, en activación inmunológica debido a la unión de anticuerpos anti-gal de primate a estos epítomos en la ATM. 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, en algunas formas de realización, cuando se usan como fuente de tejido animales que producen epítomos α -gal, la eliminación sustancial de los epítomos α -gal de las células y los componentes extracelulares de la ATM y la prevención de la reexpresión de epítomos α -gal celulares pueden disminuir la respuesta inmune frente a la ATM asociada a la unión del anticuerpo anti-gal a los epítomos α -gal.

30 Para eliminar los epítomos α -gal, después de lavar el tejido a fondo con solución salina para eliminar la solución de DNasa, la muestra de tejido se puede someter a uno o más tratamientos enzimáticos para eliminar ciertos antígenos inmunogénicos, si es que están presentes en la muestra. En algunas formas de realización, la muestra de tejido se puede tratar con una enzima α -galactosidasa para eliminar los epítomos α -gal, si es que están 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, se aumenta la concentración de α -galactosidasa a 400 U/L para conseguir una eliminación adecuada de los epítomos α -gal del tejido extraído. Se puede usar cualquier concentración de enzima y tampón adecuados, siempre y cuando se consiga una eliminación suficiente de los antígenos.

40 Como alternativa, en lugar de tratar el tejido con enzimas, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales que hayan sido modificados genéticamente para que carezcan de uno o más epítomos antigénicos. Por ejemplo, se pueden seleccionar como fuente de tejido animales (p. ej., cerdos) que hayan sido genéticamente modificados para que carezcan del resto α -galactosa terminal. Para consultar descripciones de los animales apropiados, véase la solicitud U.S. en tramitación de n.º de serie 10/896,594 y la patente US 6.166.288. Además, en Xu se describen ciertos métodos ejemplares de procesamiento de tejidos para producir matrices acelulares con o sin cantidades reducidas de, o exentas de, restos de alfa-1,3-galactosa.

Una vez que se ha formado la ATM, opcionalmente, se pueden sembrar células viables e histocompatibles en la ATM para producir un injerto que posteriormente pueda ser remodelado por el huésped. En algunas formas 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 puede ser por las propias células del receptor que migran a la ATM o por la infusión o inyección de células obtenidas del receptor o células histocompatibles de otro donante en la ATM in situ. Se pueden usar diversos tipos de células, incluyendo células madre embrionarias, células madre adultas (p. ej., células madre mesenquimales) y/o células neuronales. En diversas formas de realización, las células se pueden aplicar directamente en la porción interna de la ATM justo antes o después de la implantación. En ciertas formas de realización, las células se pueden colocar en el interior de la ATM que se va a implantar y cultivar antes de la implantación. En algunas formas de realización, las células viables se pueden añadir a la matriz tisular en el sitio anatómico deseado después de que el disolvente haya difundido desde la matriz.

60

En ciertas formas de realización, la ATM puede incluir ALLODERM® o STRATTICE™, LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, que son matrices dérmicas acelulares humanas y porcinas, respectivamente. Se pueden encontrar ejemplos de tales materiales en las patentes U.S. 6.933.326 y 7.358.284.

5 Matriz tisular acelular particulada

Se puede usar el procedimiento siguiente para producir matrices tisulares acelulares particuladas usando ALLODERM®, STRATTICE™, u otras matrices tisulares acelulares adecuadas. Tras su retirada del envase, la ATM se puede cortar en tiras usando un mallador Zimmer equipado con una rueda de corte "continua" sin interrupción.

10 Las tiras largas de ATM resultantes se pueden cortar a longitudes de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 centímetros de longitud.

Se puede instalar un homogeneizador y una sonda homogeneizadora esterilizada, tal como un homogeneizador LabTeck Macro disponible en OMNI International, Warrenton, Va., y enfriar a temperaturas criogénicas usando nitrógeno líquido estéril vertido en la torre de homogeneización. Una vez que el homogeneizador ha alcanzado temperaturas criogénicas, se puede añadir la ATM previamente preparada en tiras, tal y como se ha indicado anteriormente, a la torre de homogeneización que contiene el nitrógeno líquido estéril. A continuación, el homogeneizador se puede activar para que fracture criogénicamente las tiras de ATM. El tiempo y la duración de la etapa de fraccionamiento criogénico dependerán del homogeneizador utilizado, el tamaño de la cámara de homogeneización y la velocidad y el tiempo de funcionamiento del homogeneizador, y deben poderse determinar fácilmente por un experto en la materia mediante una simple variación de los parámetros con el fin de conseguir los resultados deseados.

El material de ATM particulada fracturada criogénicamente se puede clasificar por tamaño de partícula lavando el producto del homogeneizador con nitrógeno líquido a través de una serie de tamices metálicos que también se han enfriado a temperaturas del nitrógeno líquido. En el interior de la torre de homogeneización se puede utilizar una combinación de tamices del tipo descrito anteriormente, en las que, primero, se lavan y clasifican las partículas para excluir partículas con un tamaño excesivo y, a continuación, para excluir partículas con un tamaño demasiado pequeño.

30 Una vez aislada, la ATM particulada se puede retirar y colocar en un vial para su liofilización una vez que el nitrógeno líquido estéril se haya evaporado. Esto puede garantizar la eliminación de cualquier humedad residual que pueda haber sido absorbida durante el procedimiento anterior.

35 El producto final puede ser un polvo con un tamaño de partícula de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 900 micras o un tamaño de partícula de aproximadamente 30 micras a aproximadamente 750 micras. Las partículas se distribuyen en torno a una media de aproximadamente 150-300 micras. El material se rehidrata fácilmente mediante suspensión en solución salina normal u otro agente rehidratante similar adecuado. La ATM rehidratada se puede resuspender en solución salina normal o cualquier otro vehículo farmacéuticamente compatible adecuado.

40 En ciertas formas de realización, la ATM particulada puede incluir CYMETRA®, LifeCell Corporation, Branchburg, NJ, que es una forma inyectable del ALLODERM®. Se pueden encontrar ejemplos de tal material en las patentes U.S. Nos. 7.358.284 y 6.933.326.

45 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.

EJEMPLOS:

50 Ejemplo 1

Se comparó el efecto de la implantación de una matriz tisular regenerativa con ATM particulada procedente de tejido dérmico porcino (pADM) con la implantación de polímero preformado por sí solo de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

55 Se crearon matrices tisulares regenerativas a partir de la ATM particulada. La ATM se preparó a partir de tejido dérmico porcino y se liofilizó. La ATM seca se cortó en piezas de $\sim 1 \text{ cm}^2$ y se colocó en un vial para molienda criogénica. A continuación, se colocó el vial en un molino criogénico SPEX 6800, que se había enfriado previamente con nitrógeno líquido, y se sometió a un protocolo de fracturación criogénica. A continuación, se retiró la ATM
60 particulada del vial y se mantuvo en condiciones de almacenamiento en seco.

La PCL combinada con pADM y el P4HB combinado con pADM se solubilizaron cada uno en dioxano y NMP de acuerdo con el procedimiento siguiente. El polímero seleccionado se solubilizó en el disolvente seleccionado a una concentración del 10 % (p/v). A continuación, se introdujeron 0,5 ml de esta solución en una jeringa de 1 ml. Se añadieron 150 mg de pADM a una jeringa de 3 ml. Se colocó un conector en la jeringa de 1 ml y se eliminó todo el aire del cilindro. Se retiró el émbolo de la jeringa de 3 ml hasta la marca de 2 ml y se golpeó suavemente la jeringa para soltar el polvo de pADM. A continuación, se conectó la jeringa de 3 ml a la jeringa de 1 ml. La solución de la jeringa de 1 ml se inyectó lentamente en la jeringa de 3 ml, permitiendo que la pADM se humectara. Se golpeó suavemente la jeringa de 3 ml en repetidas ocasiones hasta que la pADM tuvo un aspecto completamente húmedo. El material se transfirió entre las jeringas de 1 ml y 3 ml aproximadamente 10 veces para mezclar uniformemente la solución polimérica y la pADM y, cuando se terminó, se dejó el material en la jeringa de 3 ml. Se desconectó la jeringa de 1 ml y se retrajo el émbolo de la jeringa de 3 ml. Se golpeó suavemente la jeringa de 3 ml para empaquetar el contenido contra el émbolo. Se liberó lentamente la presión sobre el émbolo, expulsando todo el aire de la jeringa de 3 ml. A continuación, se volvió a conectar la jeringa de 1 ml y se transfirió en repetidas ocasiones la mezcla de polímero-pADM, de un lado para otro, entre las jeringas durante aproximadamente 2 minutos. La mezcla de polímero-pADM se transfirió a la jeringa de 1 ml y se conectó una aguja/cánula para su suministro.

Las diversas mezclas polímero-pADM descritas anteriormente, los constructos que comprendían solo PCL y los constructos que comprendían solo P4HB se implantaron en una posición subdérmica a través de una pequeña incisión sobre la superficie dorsal de ratas inmunocompetentes (*Rattus norvegicus*; Rata Lewis). Cuatro semanas (Fig. 3A-F) y doce semanas (Fig. 4A-F) después de la implantación, se recogieron los explantes, se lavaron con PBS y se fijaron en formalina al 10 %. El tejido fijado se integró en parafina y se tiñeron secciones de muestras de matriz tisular con hematoxilina-eosina (H&E) usando procedimientos estándar. D.C. Sheehan y B.B. Hrapchak, Theory and Practice of Histotechnology, 2ª edn., Columbus, OH, Battelle Press (1987).

A continuación se observaron las muestras al microscopio con una magnificación de 400x (Fig. 3A-F y 4A-F). Las Figuras 3A-C representan los resultados de la PCL por sí sola, con pADM y dioxano, y con pADM y NMP, respectivamente, tras 4 semanas. Las Figuras 3D-F representan los resultados del P4HB por sí solo, con pADM y dioxano, y con pADM y NMP, respectivamente, tras 4 semanas. De forma similar, las Figuras 4A-C representan los resultados de la PCL por sí sola, con pADM y dioxano, y con pADM y NMP, respectivamente, tras 12 semanas. Y las Figuras 4D-F representan los resultados del P4HB por sí solo, con pADM y dioxano, y con pADM y NMP, respectivamente, tras 12 semanas. El análisis histológico de los explantes mostró que la PCL y el P4HB en presencia de pADM, cuando se solubilizaban en dioxano o en NMP, tenían una respuesta inflamatoria atenuada en comparación con los explantes de PCL y P4HB por sí solos.

Ejemplo 2

Se evaluó la implantación de una matriz tisular regenerativa en el cóndilo femoral de un conejo. Se preparó un implante que comprendía BHA, pADM y NMP de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El BHA se mezcló con pADM en un disolvente de NMP y se inyectó en un defecto osteocondral de aproximadamente 3,5 x 3 mm creado en el cóndilo femoral de un conejo. Se retiraron las muestras tras 4 semanas y se evaluaron las respuestas celulares usando tinción histológica rutinaria con hematoxilina-eosina. Las muestras se observaron al microscopio con una magnificación de 20x, 100x y 400x (Fig. 5a-c, respectivamente). También se tomó una fotografía del cóndilo femoral que mostraba el implante de matriz tisular (180b) a las 12 semanas (Fig. 6). Los resultados mostraron la persistencia del implante y una respuesta de regeneración tisular demostrada por la deposición de cartílago similar al hialino en el sitio del defecto.

REIVINDICACIONES

1. **Una** mezcla de matriz tisular que comprende:
- 5 una matriz tisular acelular particulada (ATM); un disolvente miscible con agua y un polímero disuelto en el disolvente;
donde el disolvente miscible con agua es capaz de difundir en un medio acuoso puesto en contacto con la mezcla para permitir que el polímero y la ATM formen una matriz tisular.
- 10 2. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 1, donde la matriz tisular tiene una forma tridimensional estable.
3. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polímero comprende policaprolactona.
- 15 4. **La** mezcla de matriz tisular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el polímero comprende poli-4-hidroxibutirato.
5. **La** mezcla de matriz tisular de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el polímero comprende un derivado del éster bencílico del ácido hialurónico.
- 20 6. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la ATM particulada comprende partículas de tamaño uniforme.
7. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la ATM particulada comprende una ATM dérmica, una matriz tisular cartilaginosa, una matriz tisular ósea, o una combinación de las mismas.
- 25 8. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la ATM particulada comprende ATM procedente de dos o más tipos diferentes de tejidos.
- 30 9. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 8, donde los dos o más tipos diferentes de tejidos comprenden dermis y cartílago, cartílago y hueso, matrices tisulares humanas, matrices tisulares porcinas, o matrices tisulares humanas y matrices tisulares porcinas.
10. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el disolvente es biocompatible.
- 35 11. **La** mezcla de matriz tisular de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el disolvente comprende al menos uno de entre dioxano, N-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido o combinaciones de los mismos.
- 40 12. **Una** mezcla de matriz tisular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en implantación en un animal, donde el disolvente miscible con agua es capaz de difundir desde la mezcla para permitir que la mezcla forme una matriz tisular a partir del polímero y la ATM.
13. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 12 para tratamiento de un sitio tisular.
- 45 14. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 13, donde el tejido es hueso, cartílago o mama.
15. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 12 o 13, donde la puesta en contacto de la mezcla con un medio acuoso comprende la colocación de la mezcla en, sobre, o cerca de un sitio tisular.
- 50 16. **La** mezcla de matriz tisular de la reivindicación 15, donde la puesta en contacto de la mezcla con un medio acuoso comprende la inyección de la mezcla en el sitio tisular, sobre el sitio tisular, o una combinación de las mismas.

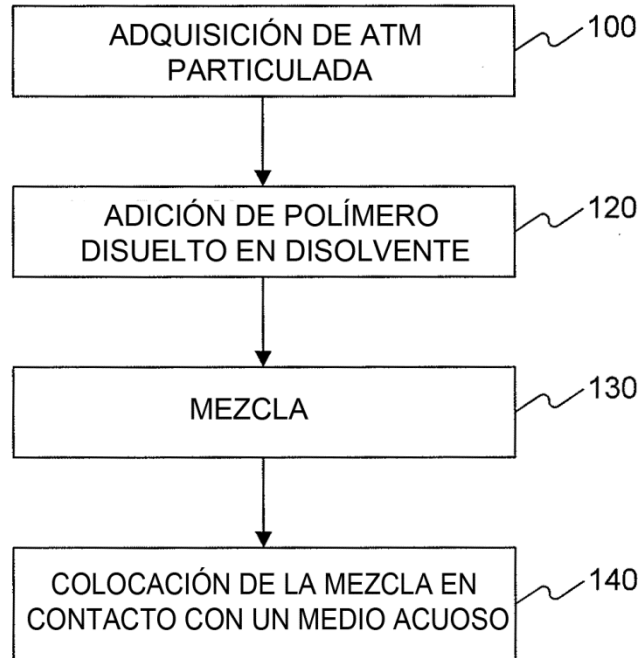


FIG. 1

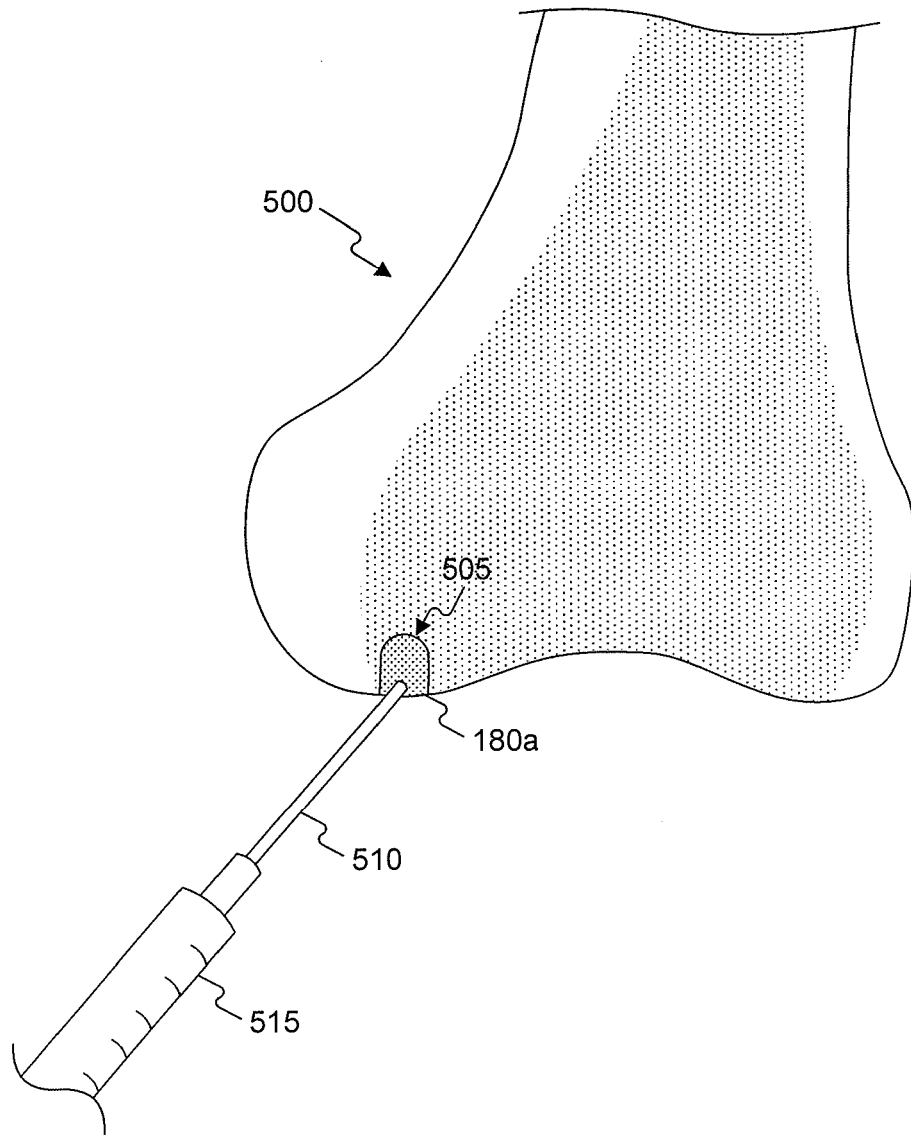


FIG. 2

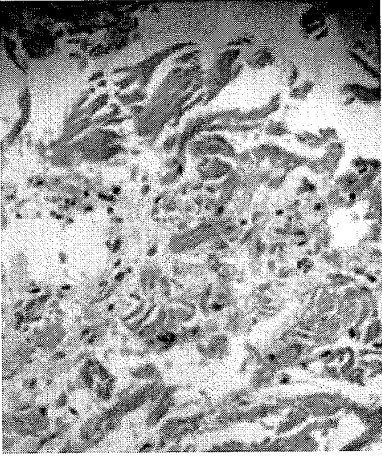


FIG. 3C

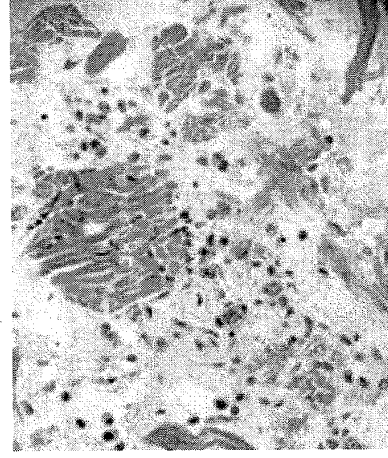


FIG. 3F

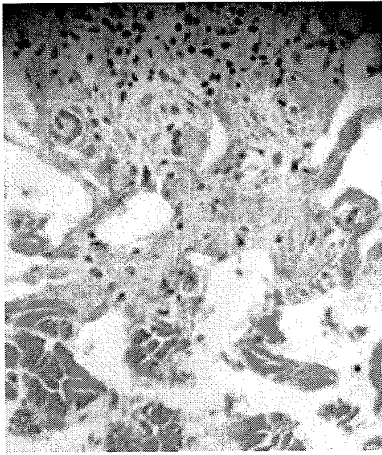


FIG. 3B

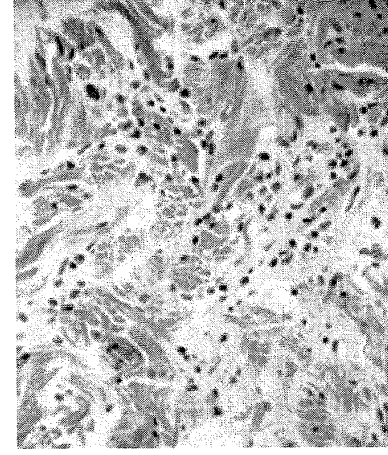


FIG. 3E

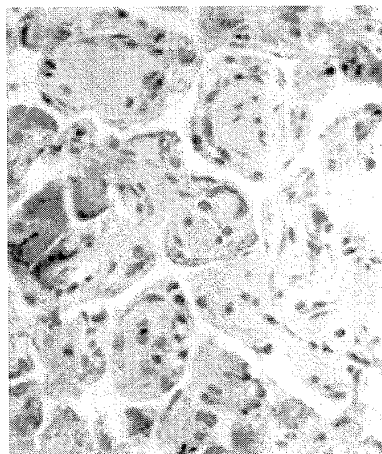


FIG. 3A

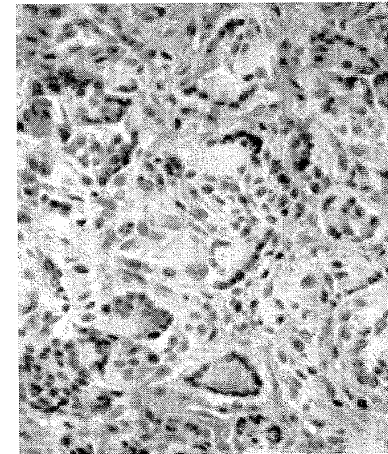


FIG. 3D

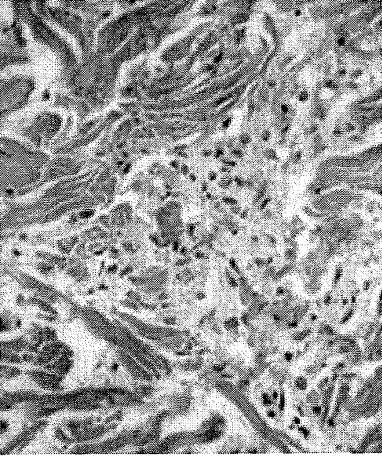


FIG. 4C



FIG. 4F

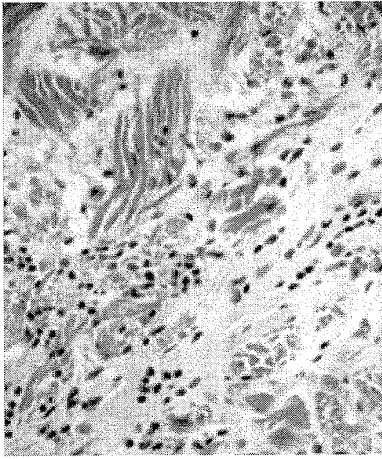


FIG. 4B

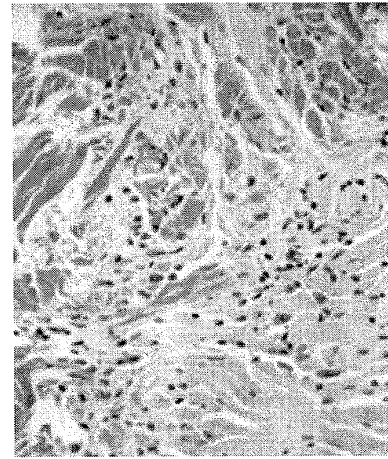


FIG. 4E

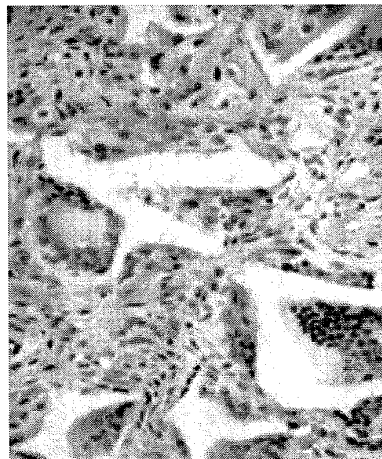


FIG. 4A

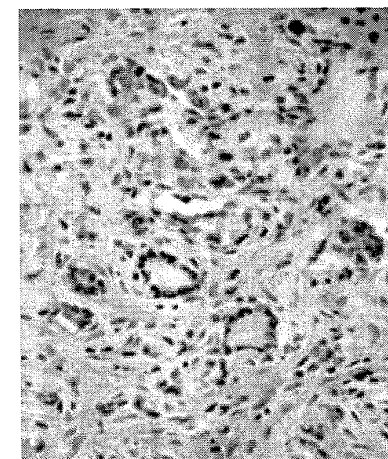


FIG. 4D

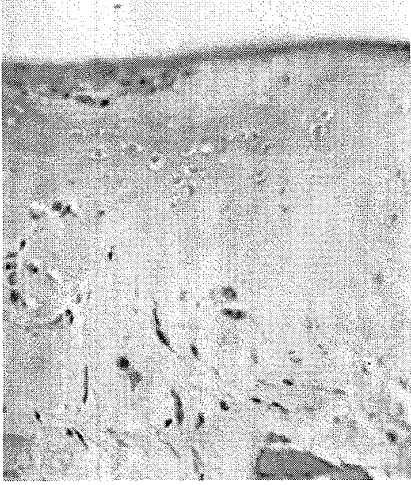


FIG. 5C



FIG. 5B



FIG. 5A

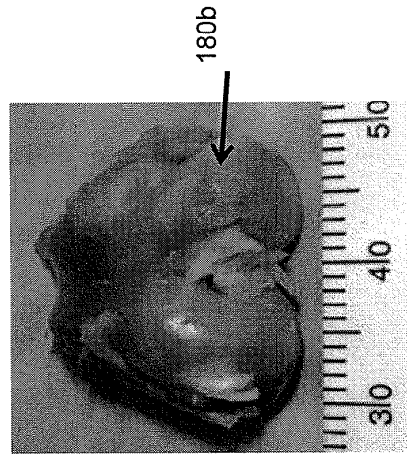


FIG. 6