



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 995**

51 Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01975255 .9**

86 Fecha de presentación : **18.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1320391**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Método para el tratamiento de un paciente que utiliza una construcción de tejido conjuntivo cultivado.**

30 Prioridad: **18.09.2000 US 233401 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **ORGANOGENESIS Inc.**
150 Dan Road
Canton, Massachusetts 02021, US

72 Inventor/es: **Parenteau, Nancy, L. y**
Robertson, James, T.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Método para el tratamiento de un paciente que utiliza una construcción de tejido conjuntivo cultivado.

5 **Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de la ingeniería de tejidos, particularmente al uso de una construcción de tejido conjuntivo cultivado y vivo en indicaciones de reparación quirúrgica.

10 **Antecedentes de la invención**

Las lesiones de discos intervertebrales son dolorosas, debilitantes y costosas para el paciente. El disco intervertebral se extiende entre las superficies articulares de cuerpos vertebrales adyacentes. El disco consiste en capas concéntricas de fibras de colágeno, en el *annulus fibrosis* o anillo de fibrosis, y en *nucleus pulposus* o núcleo pulposo central, al que rodea. El núcleo pulposo consiste en una matriz de tejido conjuntivo, fluido y viscoso, y en células. Las células del núcleo pulposo, las células fialiforosas, se encuentran esparcidas en agregados irregulares a través de la matriz extracelular, que consiste en una sustancia de fondo o base. En el exterior de las vértebras, el anillo de fibrosis y las vértebras están soportados periféricamente por ligamentos longitudinales que discurren paralelamente a la espina dorsal.

El disco intervertebral funciona a la manera de un absorbedor hidráulico de impactos, de tal manera que el núcleo pulposo actúa como fluido hidráulico. Al avanzar la edad, las fibras de colágeno del anillo de fibrosis se hacen más finas y se debilitan. El núcleo pulposo puede romperse a través del anillo en posición posterior y comprimir las raíces nerviosas, un estado comúnmente conocido como “disco desplazado” o hernia de disco. Los discos implicados en las lesiones cervicales se encuentran entre las vértebras quinta y sexta (C5-C6) y las vértebras sexta y séptima (C6-C7); y en las lesiones de la espalda baja, las vértebras lumbares cuarta y quinta (L4-5) o la quinta vértebra lumbar y la primera vértebra sacra (L5-S1) se ven afectadas de forma más frecuente. En los casos en que el disco no se rompe, la compresión del nervio puede provocarse por la formación de un osteofito con origen en la enfermedad degenerativa del disco. El osteofito sobresale penetrando en el foramen intervertebral y comprime la raíz del nervio, lo que da lugar a un dolor crónico continuo o intermitente.

Cuando un cirujano extrae de la espalda la totalidad o parte de un disco roto, agranda el orificio del anillo de fibrosis practicado para extraer a través de él el disco roto y aflojar o soltar el tejido del disco existente en el espacio intermedio. El orificio formado nunca cicatriza, lo que permite la susceptibilidad del disco a una ruptura adicional a través del orificio que queda, así como a una cadena o episodio inflamatorio que resulta de la exposición del interior del disco al espacio epidural. La inflamación y la fibrosis se producen en el espacio intervertebral, lo que frecuentemente da lugar a cambios en los tejidos circundantes, que incluyen las vértebras, las placas de hialina, la *dura mater* o materia dura y la médula espinal.

Cada año se realizan aproximadamente 200.000 disectomías. La reparación biológica del orificio o defecto anular es esencial para hacer avanzar la práctica convencional de los cuidados del paciente con lesión de disco intervertebral. El documento WO 98/40111 describe un implante biomecánico que comprende al menos dos componentes de matriz, de manera que el primer componente de matriz está compuesto de colágeno con una macro-estructura porosa que tiene la capacidad de soportar fuerzas de tracción y de corte o cizalladura, y el segundo componente de matriz es un gel de alginato hidratado que llena sustancialmente la macro-estructura porosa del primer componente y ejerce una presión de llenado, comprendiendo adicionalmente el implante una población de células que comprende condrocitos, fibrocondrocitos, fibroblastos u osteoblastos, o bien precursores de los mismos. El documento WO 91/16867 describe un disco intervertebral protésico que puede ser implantado en el esqueleto humano y que puede actuar como almacén para un nuevo crecimiento del material del disco intervertebral. El documento WO 99/04720 describe un método para utilizar una suspensión de hidrogel con contenido de células para el tratamiento de un disco intervertebral herniado por medio de la implantación de una suspensión de células en un paciente, con lo que se forma un hidrogel con contenido de células que es adherente a al menos una de las superficies del anillo de fibrosis del disco herniado, en el cual las células son condrocitos, fibroblastos u osteoblastos. La presente invención está encaminada a esta reparación de la fibrosis anular mediante el uso de una construcción de tejido conjuntivo cultivado que, cuando se aplica quirúrgicamente al defecto existente en el anillo, cierra el orificio para formar una barrera que evite la inflamación y una rotura adicional del disco.

Sumario

La invención consiste en un método para reparar un disco intervertebral dañado de un paciente, utilizando una construcción de tejido conjuntivo cultivado. El método incluye modificar la abertura del anillo de fibrosis del disco intervertebral creado por la hernia del disco y retirar selectivamente el núcleo pulposo, para después injertar en la abertura una construcción de tejido conjuntivo cultivado. El cierre del anillo de fibrosis es importante para la prevenir el herniado del disco y para mitigar la respuesta inflamatoria y la fibrosis epidural en la cavidad, que puede dar lugar al daño de un nervio. La construcción de tejido conjuntivo cultivado consiste en un tejido cultivado y vivo que contiene células de tejido conjuntivo y una matriz extracelular, tal como colágeno. Debido a las propiedades similares a las de un tejido de la construcción de tejido cultivado, éste es bio-remodelable, lo que significa que es susceptible de experimentar la repoblación de las células mediante el crecimiento interior de células anfitrionas, la vascularización, y

la reorganización y el reemplazo de componentes de matriz de la construcción implantada mediante células anfitrionas y enzimas.

Descripción de las figuras

5

La Figura 1 ilustra un aparato para formar un equivalente de tejido conjuntivo.

Descripción detallada

10 La invención está dirigida a un método de reemplazo y reparación de tejido que utiliza una construcción de tejido conjuntivo cultivado. La construcción de tejido conjuntivo comprende colágeno y células vivas y es, por tanto, bio-remodelable, o susceptible de remodelarse biológicamente, lo que significa que, cuando se injerta en un paciente que necesita del reemplazo y la reparación de un tejido, inmediatamente funciona como tejido de reemplazo, en tanto que, al mismo tiempo, comienza a integrarse en el tejido del paciente, en el lugar del implante, para formar un nuevo tejido.

15 En la realización más preferida, la invención está dirigida a un método para reparar el anillo de fibrosis del disco intervertebral, tras una cirugía de disectomía en la que el anillo de fibrosis ha sido abierto, con una construcción de tejido conjuntivo cultivado.

La construcción de tejido conjuntivo cultivado se utiliza para cerrar la pared anular tras la extracción del tejido del disco intervertebral dañado, de tal modo que el núcleo pulposo y el anillo de fibrosis, tras una disectomía a múltiples niveles para la corrección de deformidades espinales, una cirugía reconstructiva espinal o la extracción parcial de un disco dañado como consecuencia de una lesión tal como un desgarramiento anular, una lesión, una rotura, un prolaps, una hernia o una perforación. El cierre del anillo por este método obtura la cavidad con el fin de aminorar la respuesta inflamatoria y mitigar la fibrosis epidural postoperatoria que naturalmente sigue a la extracción del tejido de la cavidad. Este cierre del anillo de fibrosis evita también el prolaps subsiguiente del disco por el resto del tejido de disco intervertebral que queda en el espacio intervertebral, y ralentiza una degeneración adicional del disco.

El método también incluye el cierre del anillo de fibrosis utilizando una construcción de tejido conjuntivo cultivado tras la implantación de un elemento de reemplazo del disco. El soporte de las vértebras con un elemento de reemplazo o separador de disco, tras la retirada del disco, se lleva a cabo en ocasiones para mantener el disco intervertebral de forma que conserve su función, y para evitar daños en los nervios. El elemento de reemplazo se proporciona al espacio intervertebral a través de una abertura practicada en el anillo de fibrosis, que, bien es la misma que se ha utilizado para acceder al disco dañado, o bien es una abertura adicional. Se utilizan elementos de reemplazo de disco para mantener la altura normal del espacio de disco con el fin de evitar la incidencia de las juntas de unión de las caras o facetas posteriores. La presión sobre los nervios espinales puede causar dolor o parálisis en la zona en la que están distribuidos. Los implantes separadores funcionales transmiten y atenúan las fuerzas compresivas y de torsión, y estabilizan la junta de unión. Los materiales de los elementos de reemplazo de disco pueden incluir metales, aleaciones metálicas, sólidos y mallas sintéticos, así como hidrogeles, siempre y cuando sean biocompatibles con los tejidos del paciente.

40 Con el fin de extraer el disco dañado, puede emplearse cualquiera técnica conocida en la práctica de la extracción de discos intervertebrales, incluyendo los procedimientos de disectomía, de laminectomía o de laminotomía, pero sin estar limitada a ellos. Dependiendo del tipo y del grado de la lesión del disco, puede accederse al disco intervertebral de un cierto número de maneras, incluyendo anteriormente, posteriormente o de forma postero-lateral. El método para acceder al disco intervertebral incluye técnicas de disectomía de laparotomía. El acceso a través del anillo de fibrosis incluye soluciones a través de un único acceso y de varios accesos, en las que se realizan una o más aberturas en el anillo de fibrosis para retirar el material de disco y para implantar y colocar una prótesis separadora intervertebral.

Una vez que se ha llevado a cabo la disectomía en el paciente, se inserta la construcción de tejido conjuntivo cultivado en el interior del orificio creado en el anillo de fibrosis, generado por el procedimiento quirúrgico con el fin de obturar la región interna del disco intervertebral. Dependiendo del tamaño del paciente y del tamaño del orificio existente en el anillo, pueden utilizarse una o más piezas para taponar el orificio, de tal forma que las piezas se mantienen en su lugar por la presión impuesta por los tejidos circundantes. Opcional o adicionalmente, se aplica una construcción de tejido conjuntivo cultivado sobre la abertura y se asegura en su lugar a lo largo del contorno del tejido de la abertura y de la construcción. Cuando la construcción es aplicada sobre la abertura existente en el anillo, la construcción puede asegurarse en su lugar por sutura o mediante adhesivo quirúrgico, tal como pegamento de fibrina u otros adhesivos biológicamente compatibles utilizados en los procedimientos quirúrgicos.

Una vez que el procedimiento para injertar la construcción se ha completado, la construcción asume inmediatamente la función de barrera entre el interior de la cavidad del núcleo pulposo y el exterior del anillo de fibrosis.

60

En otro método preferido de la invención, la construcción de tejido conjuntivo cultivado se utiliza en la reparación quirúrgica del sistema nervioso central. La construcción de tejido conjuntivo cultivado se utiliza para obturar la materia dura que cubre el cerebro y la médula espinal. La construcción en lámina es una forma apropiada de cerrar los defectos de la materia dura después de una lesión o de cirugía espinal o craneal, a fin de mantener la separación del interior del sistema nervioso central con respecto a otras células y tejidos corporales.

65

La construcción de tejido conjuntivo cultivado es bio-remodelable, o susceptible de remodelarse biológicamente, lo que significa que es susceptible de experimentar una repoblación de células mediante el crecimiento interior de

células anfitrionas, la vascularización, y la reorganización y el reemplazo de componentes de matriz de la construcción implantada mediante células anfitrionas y enzimas. La prótesis de injerto conserva sus características funcionales mientras las células del paciente remodelan toda o sustancialmente toda la construcción para integrarla con tejido anfitrión, y, como tal, es funcional como elemento análogo del tejido que repara o reemplaza.

La construcción de tejido conjuntivo cultivado comprende células de tejido conjuntivo unidas o ligadas por una matriz extracelular, fundamentalmente de colágeno. El aspecto de matriz extracelular de la construcción puede variar en su organización y composición, y seguir catalogándose de construcción de tejido conjuntivo para uso en el método de la invención. La construcción de tejido conjuntivo puede consistir en una red de colágeno contraída que contiene fibroblastos, según se describe por Bell en la Patente norteamericana N° 4.485.096, o por Kemp *et al.* en la Patente norteamericana N° 5.536.656, en las que la red de colágeno contraída se dispone en un gel de colágeno acelular o carente de células. Sin embargo, esta realización no forma parte de la presente invención, sino que representa meramente una técnica anterior de utilidad para comprender la invención. Otra construcción para uso en el método es una construcción de tejido concebido por bioingeniería de células cultivadas y componentes de matriz extracelular producidos de forma endógena, sin el requisito de componentes de matriz exógenos ni de soporte de red ni de miembros de armazón tales como los que se describen en la publicación de PCT N° 00/29553, de Murphy *et al.*

Pueden utilizarse también construcciones de tejido conjuntivo tales como las que incorporan un miembro de malla sintético o bio-reabsorbible que tiene fibroblastos cultivados, fijados de forma que la envuelven por su borde, con una matriz producida de forma endógena, tales como las descritas en las Patentes norteamericanas Nos. 5.580.781, 5.443.950, 5.266.480, 5.032.508, 4.963.489, de Noughton *et al.*, así como una matriz de colágeno fibrilosa que contiene células cultivadas en su interior, según se describe en la Patentes norteamericanas Nos. 4.505.266 y 4.280.954, de Llanas *et al.* Pueden utilizarse materiales xeno-génicos, tales como dermis desprovista de epidermis y de células, así como otros tejidos laminares planos que se hayan limpiado de determinantes antígenos y de residuos celulares, como componentes de matriz que se cultivan como células no-alógenas para repoblar la construcción.

Los tipos de células para uso en esta invención son los fibroblastos, o, como en la realización más preferida, los fibroblastos humanos. Pueden obtenerse cadenas de células de fibroblastos humanos de un cierto número de fuentes, que incluyen el prepucio, la dermis, el tendón, el pulmón, los cordones umbilicales, el cartílago, la uretra, el estroma corneal, la mucosa oral y el intestino, aunque no se limitan a éstas. Un tipo de fibroblasto preferido es el obtenido de la dermis. Las células humanas pueden incluir, si bien no tienen por qué estar limitadas a éstas: fibroblastos, células musculares lisas, condrocitos y otras células de tejido conjuntivo de origen mesenquimático. Pueden utilizarse en la invención células progenitoras de embriones, tales como las células de estema mesenquimático, a fin de preparar la construcción cultivada, e inducirse, ya sea *in vitro* o *in vivo*, para su diferenciación con vistas a desarrollarse en el interior del tejido deseado. Se apreciará por el experto de la técnica que la construcción de tejido conjuntivo cultivado puede contener, bien por adición intencionada o bien como resultado del cultivo de fibroblastos a partir de fuentes primarias, otras células que se encuentran en el tejido conjunto y en otros componentes de matriz extracelular. Se prefiere, aunque no es necesario, que el origen de la célula de producción de matriz que se emplea para la producción de una construcción de tejido, se obtenga de un tipo de tejido al que se ha de parecer o al que ha de imitar tras el empleo de los métodos de cultivo de la invención. Por ejemplo, se cultiva una construcción con fibroblastos para formar una construcción de tejido conjuntivo vivo; o bien con mioblastos, para una construcción de músculo de esqueleto. Es posible utilizar más de un tipo de célula para fabricar una construcción de tejido.

Si bien se prefieren las células humanas para uso en la invención, las células que se utilizarán en el método de la invención no están limitadas a células procedentes de fuentes humanas. Pueden utilizarse células procedentes de otras especies de mamíferos, incluyendo las fuentes equina, canina, porcina, bovina, felina, caprina y ovina, aunque no se limitan a éstas. Es posible utilizar también células murinas, células que procedentes de fuentes de roedores. Los donantes de células pueden variar con respecto a su desarrollo y edad. Las células pueden obtenerse de tejidos donantes pertenecientes a embriones, neonatos o individuos de más edad, incluyendo adultos.

Además, pueden también utilizarse en esta invención células concebidas por ingeniería genética que sean transmutadas química o viralmente. Para las realizaciones que incorporan más de un tipo de célula, pueden utilizarse mezclas de células normales y modificadas genéticamente o transmutadas, así como mezclas de células de dos o más especies o fuentes de tejido, o ambas cosas. Es posible utilizar células recombinatorias o concebidas por ingeniería genética en la producción de construcción de tejido, a fin de crear una construcción de tejido que actúa como un injerto de suministro de medicación para un paciente que necesita niveles incrementados de productos celulares naturales o un tratamiento con una sustancia terapéutica. Las células pueden producir productos celulares recombinatorios, factores de crecimiento, hormonas, péptidos o proteínas durante un intervalo de tiempo continuo o según se necesite cuando se indique biológica, química o térmicamente debido a las condiciones presentes en el cultivo. Las células pueden concebirse también por ingeniería genética para la expresión de proteínas o diferentes tipos de componentes de matriz extracelular que, bien son "normales" pero se encuentran expresados a altos niveles, o bien están modificados de alguna manera para hacer un dispositivo de injerto que comprende matriz extracelular y células vivas y que resulta terapéuticamente ventajoso para una cicatrización o una neovascularización facilitada o dirigida para una cicatrización mejorada de las heridas. Estos procedimientos se conocen generalmente en la técnica y se han descrito en la divulgación de Sambrook *et al.*: "Clonación molecular, un manual de laboratorio" ("Molecular Cloning, A Laboratory Manual"), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), la cual se incorpora aquí como referencia. Todos los tipos anteriormente mencionados de células pueden utilizarse en esta invención para la producción de una construcción de piel cultivada que sintetice el medio acondicionado que contiene citoquinas.

Si bien el colágeno es la composición de matriz extracelular más preferida para uso en la producción de equivalentes de piel que producen y segregan citoquinas para el acondicionamiento del medio de cultivo, es posible utilizar otros componentes de matriz extracelular. Estos componentes de matriz extracelular pueden utilizarse solos o, de preferencia, estar incluidos con el colágeno para imitar la matriz dérmica nativa u original. Estos componentes de matriz extracelular pueden incluir: otros colágenos, colágeno tanto fibrilar como no fibrilar originario de la familia de colágenos tal como los tipos de colágenos II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, otras proteínas de matriz que pueden incluir elastina, proteoglicanos tales como la decorina o el biglicano, o bien glicoproteínas tales como la tenascina, la vitronectina, la fibronectina, la laminina, el trombospondinilo y los glicosaminoglicanos (GAG), tales como el ácido hialurónico (HA -“hyaluronic acid”). La matriz dérmica puede variar en composición y estructura. Puede consistir en esponjas de colágeno, en dermis biocompatible, bio-remodelable o carente de células, o en geles de colágeno. En lugar de proporcionar componentes de matriz extracelular a las células dérmicas, éstos pueden ser cultivados en miembros de malla biodegradable (tales como nilón o poligalactina (PGA)) con el fin de proporcionar un soporte para el cultivo, y cultivarse para producir matriz extracelular hasta que las células y su matriz envuelvan el soporte. En la realización preferida, la construcción de tejido conjuntivo cultivado consiste en un gel de colágeno contraído, que se ha contraído por medio de fibroblastos tales como los que se describen en la Patente norteamericana N° 4.485.096, de Bell. En una realización alternativa, el gel de colágeno contraído puede haberse dispuesto sobre una capa de colágeno acelular, o sin células, y en masa, sobre una membrana porosa, a fin de anclar o enclavar el gel en la membrana y evitar una contracción radial excesiva del gel. En la Patente norteamericana N° 5.536.656, de Kemp *et al.*, se describen métodos para incorporar una capa de colágeno sin células y en masa.

Sin embargo, esta realización no forma parte de la presente invención, sino que representa simplemente técnica anterior de utilidad para comprender la invención.

El equivalente de tejido de acuerdo con la presente invención puede prepararse utilizando colágeno obtenido de piel y tendón, incluyendo tendón de cola de rata, colágeno de piel de la pantorrilla y tendón de extensor de la pantorrilla. Serán adecuadas otras fuentes de colágeno. Una composición de colágeno particularmente preferida es la que se obtiene del tendón extensor digital común de la pantorrilla, y en la Patente norteamericana N° 5.106.949, de Kemp, se describen métodos de obtención de tales composiciones de colágeno.

Un equivalente dérmico se obtiene por deposición directamente sobre la superficie de fondo de un plato de cultivo de tejido; o bien directamente sobre un miembro poroso, tal como una membrana permeable al líquido; mediante el uso de procedimientos de acuerdo con las técnicas anteriormente mencionadas de Kemp *et al.*, y según se describe aquí más adelante. Se añade una mezcla de deposición que contiene colágeno y fibroblastos a un recipiente interior 20, y se mantiene bajo condiciones que permiten que se forme el equivalente de tejido. La concentración de colágeno, el número de células y el volumen de la mezcla de deposición pueden controlarse para optimizar el diámetro y el espesor del tejido vivo equivalente. La mezcla de deposición comprende células en una concentración de entre $1,25 \times 10^4$ y 5×10^4 células/ml, y colágeno en entre 0,5 y 2,0 mg/ml, en un medio nutriente. Una concentración de células preferida es $2,5 \times 10^4$ células / ml. Los cultivos se mantienen en una incubadora para garantizar las condiciones medioambientales suficientes de temperatura, humedad y mezcla de gases controladas para el cultivo de las células. Condiciones preferidas se encuentran entre 34°C y 38°C, más preferiblemente en $37 \pm 1^\circ\text{C}$, con una atmósfera del 5-10 $\pm$ 1% de CO₂ y una humedad relativa (Rh -“relative humidity”) entre el 80% y el 90%. Una vez que se han contraído las redes de colágeno, éstas pueden ser utilizadas para aplicaciones quirúrgicas, al objeto de tratar un paciente con necesidad de reparación o reemplazo de tejido.

En una realización alternativa, puede formarse sobre el sustrato de cultivo un gel de colágeno acelular, o carente de células, antes de la formación de la construcción de tejido conjuntivo, con el fin de proporcionar unos medios de enclavamiento al sustrato. En algunos casos, el sustrato requiere estos medios de enclavamiento y, en otros casos, éstos no son necesarios. Cuando el componente de gel de colágeno carente de células se utiliza en la fabricación de la construcción de tejido conjuntivo cultivado, se ha encontrado que la proporción entre el volumen de la mezcla de deposición para el equivalente de tejido, y el volumen de la mezcla de deposición para el gel de colágeno hidratado acelular, o carente de células, tiene su efecto en la viabilidad de las células y la diferenciación. Proporciones útiles, en volumen con respecto a volumen (v/v), de mezcla de deposición de equivalente de tejido con respecto a mezcla de deposición de gel de colágeno, se encuentran entre 3:1 y 1:3. Una proporción preferida en la que la concentración de células en la red de colágeno es $2,5 \times 10^4$ células/ml, es 3:1. El gel de colágeno hidratado, carente de células, 25 se prepara a partir de una composición de colágeno que comprende colágeno a entre 0,5 y 2,0 mg/ml, preferiblemente entre 0,9 y 1,1 mg/ml aproximadamente, y medio nutriente. Esta composición de colágeno se añade al recipiente interior 20 y se mantiene en condiciones que permiten que la composición de colágeno se asiente y forme un gel de colágeno hidratado y carente de células, de dimensiones adecuadas, típicamente de 1 mm a 5 mm de espesor, con un intervalo de espesores preferido de 2 mm a 3 mm. Un gel de colágeno 25 hidratado y carente de células es, de preferencia, lo suficientemente grueso como para que una porción permanezca sin células conforme las células migran desde el equivalente de tejido al seno de un gel de colágeno hidratado y carente de células, y lo suficientemente delgado como para que el equivalente de tejido no se elimine de forma no deseada de la fuente de nutriente que se proporciona en el recipiente exterior 10. Sin embargo, esta realización no forma parte de la presente invención, sino que representa simplemente una técnica anterior de utilidad para comprender la invención.

En otra realización alternativa, la construcción de tejido conjuntivo cultivado se forma a partir de células que se hacen crecer en condiciones encaminadas a producir una capa de matriz extracelular que es sintetizada y ensamblada por las células de fibroblasto cultivadas, de tal manera que las células de fibroblasto cultivadas están contenidas en el

seno de la capa de matriz extracelular sintetizada, y de modo que la matriz extracelular es producida por las células de fibroblasto cultivadas en ausencia de componentes de matriz exógenos o de miembros sintéticos en el curso de las condiciones de cultivo. En la publicación de PCT N° WO 00/29553, de Murphy *et al.*, se describen procedimientos para la fabricación de estas construcciones de tejido conjuntivo cultivado.

Una vez que se han obtenido números de células suficientes tras el aislamiento y la ampliación de la escala, las células son cosechadas e implantadas en una superficie de cultivo adecuada, y se cultivan bajo condiciones de crecimiento adecuadas con el fin de formar una lámina confluyente de células. En la realización preferida, las células se implantan en una membrana porosa que se sumerge para permitir que el medio entre en contacto desde abajo con el cultivo a través de los poros, y de forma directa por encima. Preferiblemente, las células están suspendidas en un medio, ya sea de base o de crecimiento, y se implantan en la superficie de cultivo de las células con una densidad entre 1×10^5 células/cm² y $6,6 \times 10^5$ células/cm², más preferiblemente entre 3×10^5 células/cm² y $6,6 \times 10^5$ células/cm², y, de la forma más preferida, de $6,6 \times 10^5$ células/cm² (células por centímetro cuadrado de área de la superficie). Los cultivos se cultivan en un medio de crecimiento para que se establezca el cultivo, y son cultivados hasta entre aproximadamente el 80% y el 100% de confluencia, instante en el cual son inducidos químicamente cambiando el medio a un medio de producción de matriz con el fin de regular en sentido creciente la síntesis y la secreción de matriz extracelular. En un método alternativo, las células se implantan directamente en el seno de un medio de producción con el fin de suprimir la necesidad de cambiar del medio básico al medio de producción, pero es éste un método que requiere densidades de implantación superiores.

Durante el cultivo, los fibroblastos organizan las moléculas de matriz segregada para formar una estructura tridimensional similar al tejido, pero que no exhibe fuerzas contractivas lo suficientemente significativas como para provocar que la construcción de matriz de células en formación se contraiga y se desprenda por sí misma del sustrato de cultivo dejándolo al descubierto. Se realizan cambios del medio cada dos a tres días por medio de producción de matriz fresco y, con el tiempo, la matriz segregada aumenta en espesor y organización. El tiempo necesario para crear una construcción de matriz de células depende de la capacidad de la densidad de la implantación inicial, del tipo de células, de la edad de la línea de células y de la capacidad de la línea de células para sintetizar y segregar la matriz. Cuando están completamente formadas, las construcciones de la invención presentan espesores en masa debido a la matriz fibrosa producida y organizada por las células; no son cultivos de células ordinariamente confluentes o excesivamente confluentes, en los que las células puedan ser adherentes de forma suelta unas con otras. La calidad fibrosa proporciona a las construcciones propiedades de cohesión similares a las del tejido, a diferencia de los cultivos ordinarios, debido a que resisten daños físicos tales como el rasgado o el agrietamiento asociados al manejo rutinario en un establecimiento clínico. En la fabricación de una construcción dérmica cultivada, las células formarán sobre la superficie del cultivo celular una matriz organizada en torno a ellas mismas con un espesor de, preferiblemente, al menos 30 micras o más, y, más preferiblemente, de entre 60 micras y 120 micras, a través de la superficie de la membrana; sin embargo, se han obtenido espesores de más de 120 micras, que resultan adecuados para uso en ensayos o aplicaciones clínicas en las que se necesitan espesores tan superiores.

En aún otra realización alternativa, las construcciones de tejido conjuntivo cultivado pueden también ser tratadas antes de su aplicación en un paciente con el fin de mejorar la tolerancia al injerto o la cicatrización, o ambas, en el lugar de aplicación en el paciente. Las construcciones pueden tratarse con otros componentes poniéndolas en contacto con una solución que contenga los componentes, tal como por inmersión. Componentes para el tratamiento de una construcción antes de ser aplicada comprenden componentes de matriz extracelular tales como ácido hialurónico, colágeno, proteoglicano, orglicosaminoglicanos; o citoquinas, incluyendo factores de crecimiento tales como: factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF -“basic fibroblast growth factor”), factor de crecimiento epidérmico (EGF -“epidermal growth factor”), factor de crecimiento de queratinocito (KGF -“keratinocyte growth factor”), factor de crecimiento de transformación alfa (TGF α -“transforming growth factor alpha”), factor de crecimiento de transformación beta (TGF β -“transforming growth factor beta”), que incluye factor de crecimiento de transformación beta-1 (TGF β 1 -“transforming growth factor beta-1”) y factor de crecimiento de transformación beta-2 (TGF β 2 -“transforming growth factor beta-2”), factor de estimulación de colonia granulosa (GCSF -“granulocyte colony stimulating factor”), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF -“insulin-like growth factor”), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF -“vascular endothelial growth factor”) y factor de necrosis de tumores (TNF -“tumor necrosis factor”). Ha de apreciarse que los términos anteriormente mencionados entre paréntesis son abreviaturas comúnmente conocidas y que se emplean en la técnica para la nomenclatura formal que las precede.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar mejor la práctica de la presente invención, y no deberán interpretarse de ningún modo como limitativos del ámbito de la presente invención. Los expertos de la técnica constatarán que pueden realizarse diversas modificaciones en los métodos aquí descritos sin apartarse del ámbito de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Preparación de una construcción de tejido conjuntivo que comprende una red de colágeno contraída

Se implantaron fibroblastos de piel de neonato humano (con origen en la Organogenesis, Inc., de Canton, MA) en un frasco tratado con cultivo de tejido de 5×10^5 células/162 cm², y se hicieron crecer en un medio de crecimiento. El

medio de crecimiento consistía en: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM -“Dulbecco’s Modified Eagle’s medium”) (alta formulación de glucosa, sin L-glutamina, de BioWhittaker, Walkersville, MD), complementado con el 10% de suero de pantorrilla de neonato (NBCS -“newborn calf serum”) (de HyClone Laboratories, Inc., Logan, UTA) y 4 mM (milimolar) de L-glutamina (de BioWhittaker, Walkersville, MD). Las células se mantuvieron en una incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, con una atmósfera del $10 \pm 1\%$ de CO_2 . El medio fue reemplazado por medio recién preparado cada dos a tres días. Tras 8 días de cultivo, las células habían crecido hasta la confluencia, esto es, las células habían formado una única capa compacta a lo largo del fondo del frasco de cultivo de tejido, y el medio fue aspirado del frasco de cultivo. Con el fin de aclarar la capa única, se añadió al fondo de cada frasco de cultivo una solución salina regulada o amortiguada con fosfato filtrado de forma estéril, y se aspiró a continuación de los frascos. Las células se liberaron del frasco al añadir 5 ml de tripsin-verseno glutamina (de BioWhittaker, Walkersville, MD) a cada frasco y al sacudir suavemente para garantizar una cobertura completa de la capa única. Los cultivos fueron devueltos entonces a la incubadora. Tan pronto como fueron liberadas las células, se añadieron 5 ml de SBTI (inhibidor de soibeano tripsina -“Soybean Trypsin Inhibitor”) a cada frasco y se mezclaron con la suspensión para detener la acción del tripsin-verseno. La suspensión de células se retiró del frasco y se dividió a partes iguales entre unos tubos estéril, cónico y centrífugo. Las células se recogieron por centrifugación a entre aproximadamente 800 y $1.000 \times g$ durante 5 minutos.

Se utilizó un aparato similar al que se muestra en la Figura 1 para llevar a cabo el trabajo anteriormente descrito. La tapa se quitó para llevar a cabo la operación, pero, de otro modo, se mantiene en su lugar para conservar la esterilidad. Se relaciona la información pertinente referente al aparato: El recipiente exterior 10 tiene un diámetro de 100 mm o más. El recipiente interior 20 tiene un diámetro de 75 mm. El miembro permeable 24 consiste en una membrana de policarbonato con un tamaño de los poros de aproximadamente $3 \mu\text{m}$ (micras) y un espesor de $5 \mu\text{m}$ (micras).

Se formó una solución de “mezcla previa” de 16,2 ml de 10X Medio Esencial Mínimo (MEM -“Minimum Essential Medium”), 1,6 ml 200 mM (milimolar) de L-glutamina, 0,2 ml de gentamicina de 50 mg/ml, 18,0 ml de suero bovino fetal, y 5,0 ml de bicarbonato sódico de 71,2 mg/ml. Las soluciones almacenadas se combinaron asépticamente en la secuencia anterior, y se guardaron a 4°C durante aproximadamente 30 minutos en un tubo estéril de 50 ml. Se pesaron e introdujeron en un tubo de 50 ml aproximadamente 27,44 ml de solución de colágeno de 2,2 mg/ml (extraído mediante ácido de tendón extensor digital común de la pantorrilla) en ácido acético al 0,05% en proporciones volumétricas (v/v), y se almacenaron a 4°C durante 30 minutos. Se añadió Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM -“Dulbecco’s Minimum Essential Medium”) completo (con contenido del 10% de FBS, 4 mM de L-glutamina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina) y se transvasó con una pipeta 1 ml de parte alícuota sobre la membrana del recipiente interior 20, donde se dejó gelificar a temperatura ambiental.

La capa de tejido conjuntivo, un gel de colágeno hidratado con contenido de células, se depositó con fibroblastos dérmicos humanos. Puede encontrarse también una descripción general de los procedimientos y reactivos en la Patente norteamericana N° 4.485.096, de Bell, en la Patente norteamericana N° 5.536.656, de Kemp *et al.*, y en la Patente norteamericana N° 5.712.163, de Parenteau. La mezcla de deposición para la preparación de cada construcción de tejido conjuntivo incluía aproximadamente 12,5 ml de la mezcla previa anteriormente descrita, a los que se añadieron 27,44 ml de una solución de colágeno de 22 mg/ml en ácido acético al 0,05% en proporciones volumétricas (v/v), que también se ha descrito anteriormente, y $6,25 \times 10^5$ fibroblastos dérmicos humanos. Una vez que los componentes se mezclaron en un volumen total de aproximadamente 40 ml, éste se dispensó dentro del recipiente 20 y se dejó gelificar. El colágeno gelificado que contenía los fibroblastos en suspensión, se sumergió en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) completo, añadido al recipiente exterior 20, y se incubó a 36°C y un 10% de CO_2 durante 4 a 8 días, para permitir que las células contrajeran el colágeno con el fin de formar una red de colágeno contraída que constituye una construcción 52 de tejido conjuntivo cultivado.

Ejemplo 1

Preparación de una construcción de tejido conjuntivo de células cultivadas y componentes de matriz extracelular producidos de forma endógena, sin que requieran componentes de matriz exógenos ni soporte de red ni miembros de armazón

Se preparó una construcción de tejido conjuntivo de células cultivadas y componentes de matriz extracelular producidos de forma endógena, de acuerdo con las enseñanzas de Murphy *et al.* descritas en la publicación de PCT N° WO 00/29553. Se cultivaron fibroblastos de prepucio de neonato humano para expandir su número, con el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero en un medio definido químicamente, es decir, que no contenía suero ni extractos de órganos obtenidos de animales. Las células se volvieron a suspender entonces hasta alcanzar una concentración de 3×10^6 células/ml, y se implantaron en piezas de inserción de membrana tratadas con cultivo de tejido, con un tamaño de los poros de 0,4 micras y 24 mm de diámetro, situadas dentro de una bandeja de seis pozos o cavidades, con una densidad de $6,6 \times 10^5$ células/ cm^2 ($3,0 \times 10^6$ células/TW). Las células de este ejemplo se cultivaron, en todo momento, en un medio definido químicamente.

El medio contenía: una mezcla de base en proporción de 3:1 de DMEM, medio Hams F-12 (de Quality Biologicals, Gaithersburg, MD), 4 mM (milimolar) de GlutaMAX (de Gibco BRL, Grand Island, NY), y aditivos: 5 mg/ml de factor de crecimiento epidérmico de recombinación humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 1×10^{-4} M (molar) de etanolamina (de Fluka, Ronkonkoma, NY, cat. #02400, grado ACS), 1×10^{-4} M de o-fosforil-etanolamina (de Sigma, St. Louis, MO), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrina (de Sigma, St. Louis, MO), 20 pM de triyodotironina (de Sigma, St. Louis, MO), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de insulina (de Sigma, St. Louis, MO), 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hidrocortisona (de Sigma, St. Louis, MO).

ES 2 288 995 T3

MO), 6,78 ng/ml de selenio (de la Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (de la WAKO Chemicals USA, Inc.), 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de L-prolina (de Sigma, St. Louis. MO), y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de glicina (de Sigma, St. Louis. MO).

Se tomaron muestras para análisis histológico en los días 7, 14 y 21, y se fijaron en formalina, para embeberse a continuación en parafina para su tinción con hematoxilina y eosina, con vistas a un análisis con microscopio de luz. Un análisis bioquímico para la medida del contenido de colágeno de la construcción arrojó $170,88 \pm 9,07 \mu\text{g/cm}^2$. Además del colágeno fibrilar producido de forma endógena, estaban también presentes decorina y glicosaminoglicano en las construcciones de matriz de células. Las construcciones dérmicas cultivadas que se formaron comprenden fibroblastos dérmicos y matriz producida de forma endógena. Todos tienen fibrillas de colágeno completamente formadas según una organización en paquetes y dispuestas entre las células. Las cualidades fibrilares, el espesor y la integridad cohesiva proporcionan a la construcción una resistencia considerable como para permitir que ésta sea retirada por desprendimiento o pelado de la membrana de cultivo, y manipulada en el momento en que se transfiere a un paciente que se ha de tratar con la construcción, tal como en un injerto o un implante.

Ejemplo 2

Uso de una construcción de tejido conjuntivo para reparar el anillo de fibrosis tras una disectomía parcial

Con el fin de observar la persistencia de los fibroblastos de injerto en la construcción de tejido conjuntivo cultivado, se implantan en un sujeto porcino construcciones que contienen fibroblastos porcinos, etiquetadas o marcadas con Proteína Fluorescente Verde (GFP -“Green Fluorescent Protein”).

Se estabulan individualmente seis cerdos jóvenes de ambos sexos y de hasta 50 kg, durante un mínimo de dos días antes de someterse a cirugía, tiempo durante el cual se alimentan con comida convencional para cerdos.

Los animales del experimento se anestesian previamente con Telazol y atropina, y son entubados. Se someten a inhalación de gas de isoflurano y oxígeno y se mantienen en condiciones quirúrgicas de anestesia. Se les administra también un antibiótico.

Se crean los defectos en los discos realizando una incisión de 5×10 mm en el anillo, seguida de una discotomía convencional con una retirada de núcleo igual en cada espacio. Se operan un total de tres discos en cada cerdo. Dos lugares son tratados con construcciones de tejido conjuntivo cultivado que tienen fibroblastos marcados con GFP, y el lugar restante sirve como control o referencia. Para aplicar la construcción de tejido conjuntivo, ésta se corta en primer lugar dividiéndola en tres o cuatro piezas más pequeñas, y se inserta a continuación en la abertura del orificio anular. Se sacrifican dos animales en cada una de las semanas 2, 4 y 6, y se retiran los lugares de la cirugía. Los discos se colocan en formalina y, a continuación, en el 70% de etanol, antes de su tratamiento histológico. Los discos son seccionados en serie y examinados bajo fluorescencia buscando la evidencia de fibroblastos marcados con GFP.

Ejemplo 3

Uso de una construcción de tejido conjuntivo con un separador de disco intervertebral para mantener el espacio intervertebral

Con el fin de observar la persistencia de los fibroblastos de injerto en la construcción de tejido conjuntivo cultivado, se implantan en un sujeto porcino construcciones que contienen fibroblastos.

Se estabulan individualmente seis cerdos jóvenes de ambos sexos y de hasta 50 kg, durante un mínimo de dos días antes de someterse a cirugía, tiempo durante el cual se alimentan con comida convencional para cerdos.

Los animales del experimento se anestesian previamente con Telazol y atropina, y son entubados. Se someten a gas de inhalación de isoflurano y oxígeno y se mantienen en condiciones quirúrgicas de anestesia. Se les administra también un antibiótico.

Se crean los defectos en los discos realizando una incisión de 5×10 mm en el anillo de fibrosis, seguida de una discotomía convencional con una retirada de núcleo igual en cada espacio. Se operan un total de tres discos en cada cerdo.

A través del orificio practicado en anillo de fibrosis, se abre el espacio intervertebral y se extrae el disco, limitado a las porciones anterior y tercera media. El separador de disco intervertebral, que comprende malla Dacron e hidrogel, se coloca dentro de la cavidad torácica haciéndolo pasar a través del orificio existente en el anillo de fibrosis. Se asegura una buena posición del implante utilizando procedimientos radiológicos, y, a continuación, el separador se fija entonces en su lugar. Se aplica entonces la construcción de tejido conjuntivo cultivado a la abertura anular, recortando primeramente la construcción hasta el tamaño de la abertura del orificio anular, y suturándola entonces al tejido que rodea la abertura del espacio, con el uso de suturas susceptibles de reabsorberse. En tanto que los tres lugares se han dotado de un separador de disco intervertebral, dos lugares han sido tratados con construcciones de tejido conjuntivo cultivado, y el lugar restante se destina servir como control o referencia.

ES 2 288 995 T3

Se sacrifican dos animales en cada una de las semanas 2, 4 y 6, y se retiran los lugares de la cirugía. Los discos se colocan en formalina y, a continuación, en el 70% de etanol, antes de su tratamiento histológico. Los discos son seccionados en serie y examinados bajo fluorescencia buscando la evidencia de fibroblastos marcados con GFP.

En todos los especímenes, el separador de disco intervertebral mantenía su colocación inicial. En los especímenes de control, el núcleo pulposus mostraba una pérdida significativa de proteoglicanos y colágeno, así como un incremento de otras proteínas no colagenosas en la cavidad. En los especímenes del experimento, la construcción de tejido conjuntivo forma una cicatriz completa sobre la abertura practicada en la fibrosis anular. La constitución biomédica de la cavidad había cambiado algo, pero era más cercana a la composición de los especímenes de control negativos, lo que indicaba que la fibrosis de la cavidad había sido sustancialmente evitada por el cierre del anillo tras la lesión en el disco.

Ejemplo 4

Estudio a lo largo del tiempo con el uso de construcciones de tejido conjuntivo en la reparación del anillo de fibrosis en cerdos

La disectomía para la retirada del núcleo pulposus roto y expulsado es una práctica clínica común para aliviar el dolor y la perturbación neurológica. El procedimiento crea un defecto en el anillo de fibrosis que se llena a menudo con tejidos fibróticos, una situación que conduce eventualmente al colapso o aplastamiento del disco intervertebral y requiere la fusión de los segmentos vertebrales adyacentes.

Se prepararon construcciones de tejido conjuntivo porcino utilizando fibroblastos dérmicos porcinos transmutados para expresar la proteína (GFP) de acuerdo con los métodos del Ejemplo de referencia 1. Cada construcción estaba constituida por colágeno bovino de tipo I que contenía entre 20 y 30 millones de fibroblastos dérmicos porcinos transmutados para GFP y viables, y era de aproximadamente 2 mm de espesor. El propósito de este estudio era evaluar la factibilidad de construcciones de tejido conjuntivo en la reparación del anillo de fibrosis de un sujeto porcino, y determinar la biocompatibilidad, la persistencia y la remodelación de las construcciones en este sujeto.

Se utilizaron para el estudio seis cerdos de entre 3 y 4 meses. Se dejaron expuestos o al descubierto, en posición posterior, tres discos vertebrales consecutivos mediante la práctica de una laminotomía para cada animal. Se creó un defecto anular quirúrgico en cada disco expuesto. Se implantaron varias piezas de construcción de tejido conjuntivo, cada una de entre aproximadamente 2 y 5 mm de diámetro, dentro de los dos defectos de cada animal. El otro defecto de disco se dejó vacío a modo de control o referencia. Los cerdos se sacrificaron, en grupos de dos, a las dos, cuatro y seis semanas tras el implante. Las columnas vertebrales que contenían los discos operados se extrajeron y fijaron en formalina amortiguada neutral al 10%. Se realizó una microscopia de campo brillante en secciones tintadas con hematoxilina y eosina para una evaluación general, y se efectuó una microscopia fluorescente en secciones no tintadas, para identificar células marcadas con proteína fluorescente verde.

La microscopia reveló una clara evidencia de remanentes de construcción de tejido conjuntivo implantada, incluyendo fibroblastos fluorescentes viables, en varios de los anillos tratados de los dos grupos de animales sacrificados a las dos y a las cuatro semanas. Existía también una remodelación identificable de los remanentes de construcción de tejido conjuntivo por parte del tejido anfitrión. Los defectos implantados mostraban menos inflamación y una cicatrización más avanzada que los controles en todos los instantes de tiempo. Los defectos implantados tenían tejido cartilaginoso formando un puente en la abertura, en tanto que los defectos de los controles aún tenían una cantidad significativa de tejido fibrótico. Los resultados obtenidos de este estudio de factibilidad indicaban que la construcción de tejido conjuntivo de cerdo implantada era biocompatible con el tejido anfitrión, podía persistir hasta 4 semanas y mejoraba las actividades de reparación del anillo en 4 semanas.

Si bien la anterior invención se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con propósitos de claridad y comprensión, resultará obvio para un experto de la técnica que es posible poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del ámbito de las reivindicaciones que se acompañan.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de una construcción de tejido conjuntivo cultivado en la fabricación de un medicamento para uso en la reparación de un disco intervertebral dañado, en el que la construcción de tejido conjuntivo es bio-remodelable o susceptible de remodelarse biológicamente y se integra con tejido anfitrión; y en el cual la construcción de tejido conjuntivo cultivado consiste en una capa de matriz extracelular que es sintetizada y ensamblada por las células de fibroblasto cultivadas, de tal manera que las células de fibroblasto cultivadas están contenidas en el seno de la capa de matriz extracelular sintetizada y dicha matriz es producida por las células de fibroblasto cultivadas, en ausencia de compuestos de matriz exógenos o miembros sintéticos, en el curso de las condiciones de cultivo.

10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la capa de matriz extracelular contiene colágeno.

15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la construcción de tejido conjuntivo cultivado consiste en una red de colágeno contraída que contiene fibroblastos.

20 4. Un tejido conjuntivo cultivado para uso en la reparación quirúrgica, que comprende células de fibroblasto cultivadas en una matriz de colágeno, de tal manera que la construcción de tejido conjuntivo cultivado consiste en una capa de matriz extracelular que es sintetizada y ensamblada por las células de fibroblasto cultivadas, de tal manera que las células de fibroblasto cultivadas están contenidas en el seno de la capa de matriz extracelular sintetizada y dicha matriz es producida por las células de fibroblasto cultivadas, en ausencia de compuestos de matriz exógenos o miembros sintéticos, en el curso de las condiciones de cultivo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

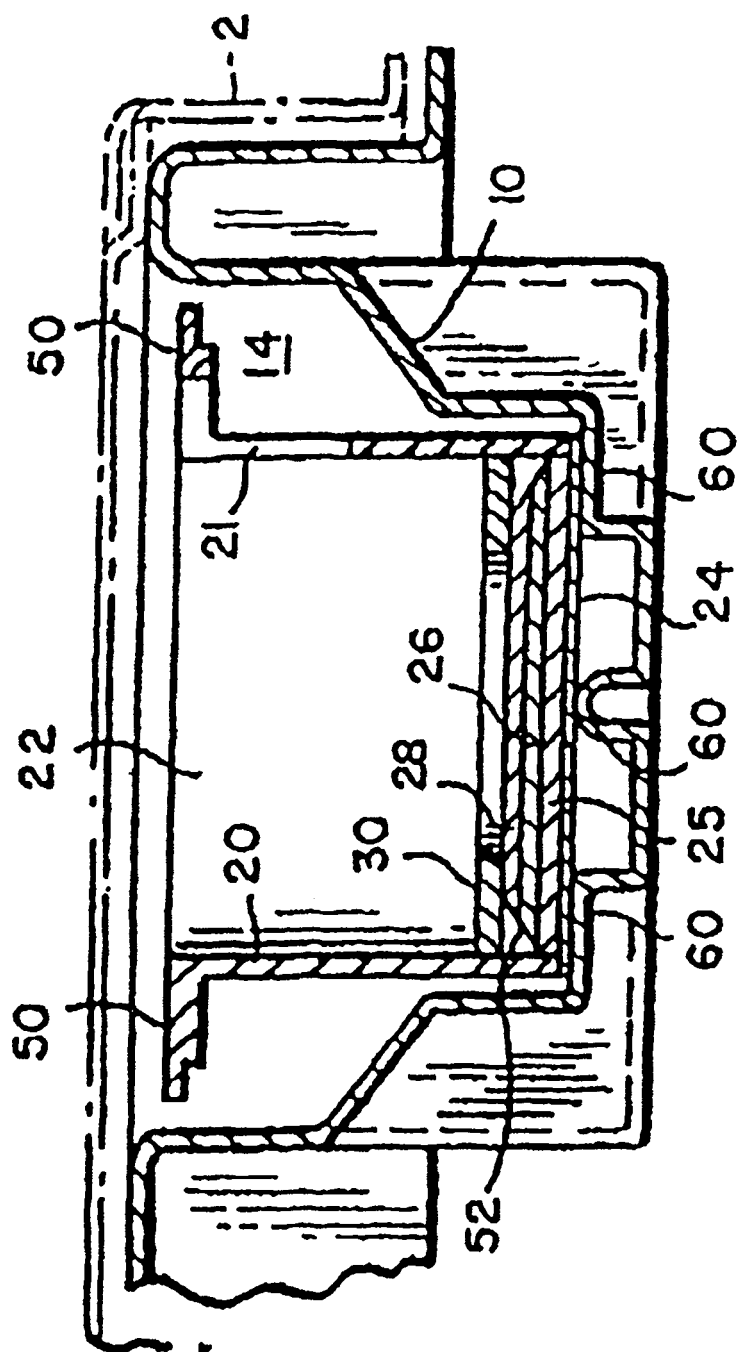


FIG. 1