

(11) Número de Publicação: **PT 1384452 E**

(51) Classificação Internacional:  
**A61F 2/30** (2007.10) **A61L 27/00** (2007.10)  
**A61B 17/32** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>1997.08.29</b>	(73) Titular(es): <b>VERIGEN AG</b> <b>SIEMENSSTRASSE 5B 63263 NEU-ISENBURG</b> <b>DE</b>
(30) Prioridade(s): <b>1996.08.30 US 704891</b> <b>1997.05.15 US 857090</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2004.01.28</b>	(72) Inventor(es): <b>KURT B. OSTHER</b> <b>US</b> <b>HENRIK VIBE-HANSEN</b> <b>DK</b> <b>AHMED IDOURAINE</b> <b>US</b> <b>CHARLOTTE LUNDGAARD</b> <b>DK</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2009.04.15</b> <b>126/2009</b>	(74) Mandatário: <b>JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO</b> <b>R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE FORNECIMENTO DE UM KIT PARA TRANSPLANTAÇÃO AUTÓLOGA**

(57) Resumo:

## **DESCRIÇÃO**

### **PROCESSO, INSTRUMENTOS E KIT PARA TRANSPLANTAÇÃO AUTÓLOGA**

#### **Domínio da invenção**

A presente invenção tem por objecto o domínio da transplantação de condrócito, enxerto de osso e de cartilagem, tratamento e reparação da articulação e a prevenção de patologias artríticas. Em particular, processos para a transplantação autóloga de células para o sítio preparado para o enxerto.

#### **Antecedentes da invenção**

Mais do que 500.000 processos artroplásticos e substituições totais da articulação são realizados todos os anos nos Estados Unidos. Realiza-se na Europa aproximadamente o mesmo número de processos semelhantes. Incluídos nestes números estão cerca de 90.000 substituições totais do joelho e cerca de 50.000 processos para reparar defeitos no joelho, por cada ano, na Europa. O número de processos é praticamente o mesmo nos EUA (em: Praemer, A., Furner, S., Rice, D. P., Musculoskeletal conditions in the United States, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, III, 1992, 125). Um método para o tratamento de regeneração da cartilagem será muito útil e pode ser realizado num estado preliminar dos danos da articulação, reduzindo assim o número de pacientes que necessitam de cirurgia de substituição da articulação artificial. Com esses processos preventivos de tratamento, o número de pacientes que desenvolvem osteoartrite também diminuirá.

As técnicas utilizadas para recobrir a superfície da estrutura da cartilagem nas articulações, têm tentado induzir principalmente a reparação da cartilagem utilizando a perfuração sub-côndrica, a abrasão e outros processos em que esta excisão da cartilagem doente e do osso sub-côndrico, deixando exposto o osso vascularizado a retirar (Insall, J., Clin. Orthop. 1974, 101, 61; Ficat, R. P. e outros, Clin. Orthop., 1979, 144, 74; Johnson, L. L., em: Operative Arthroscopy, McGinty, J. B., Ed., Raven Press, New York, 1991, 341).

Coon e Cahn (Science 1966, 153, 1116) descreveram uma técnica para a realização de uma cultura de células de sintetização de cartilagem a partir de somitos do embrião de galinha. Mais tarde, Cahn e Lasher (PNAS, EUA 1967, 58, 1131) utilizaram o sistema para análise do envolvimento da síntese de ADN como um pré-requisito para a diferenciação da cartilagem. Os condrócitos respondem tanto a EFG como a FGF por meio de crescimento (Gospodarowicz e Mescher, J. Cell Physiology, 1977, 93, 117) mas, em última análise, perdem a sua função de diferenciação (Benya e outros, Cell, 1978; 15, 1313). Os processos para o crescimento dos condrócitos estavam descritos e estão a ser utilizados, principalmente, com ajustamentos mínimos, por Brittberg, M. e outras (New Engl. J. Med. 1994, 331, 889). As células que crescem utilizando estes processos, foram utilizadas como transplantes autólogos nas articulações do joelho dos pacientes. Adicionalmente, Kolettas e outras (J. Cell Science, 1995, 108, 1991) examinaram a expressão de moléculas específicas da cartilagem tais como colagéneos e proteoglicanos sob cultura prolongada de células. Verificaram que, apesar das alterações morfológicas durante a cultura em culturas de mono-camadas (Aulthouse, A. e outros, In vitro cell Dev. Biol., 1989, 25, 659; Archer, C. e outros, J. Cell

Sci., 1990, 97, 361; Hanselmann, H. e outros, J. Cell Sci., 1994, 107, 17; Bonaventure, J. e outras, Exp. Cell Res. 1994, 212, 97) quando comparado com o crescimento de culturas em suspensão em gel de agarose, pérolas de alginato ou como culturas em frascos do tipo "spinner" (retendo uma morfologia de células redondas) analisado por vários cientistas não muda os marcadores que expressam condrócitos tais como os colagêneos dos tipo II e IX e os proteoglicanos de grande agregação, agrecanos, versicanos e a ligação às proteínas não muda (Kolettas e outras, J. Cell Science, 1995, 108, 1991).

Os condrócitos articulares são células especializadas derivadas de mesênquima, encontradas exclusivamente na cartilagem. A cartilagem é um tecido não vascular cujas propriedades físicas dependem da matriz extracelular produzida pelos condrócitos. Durante a ossificação endocôndrica sofre uma maturação que conduz à hipertrofia celular, caracterizada pelo início da expressão do colagêneo do tipo X (Upholt, W. B. e Olsen, R. R., em: Cartilage Molecular Aspects (Hall, B & Newman, S, Eds.) CRC Boca Raton, 1991, 43; Reichenberger, E. e outras, Dev. Biol. 1991, 148, 562; Kirsch, T. e outros, Differentiation, 1992, 52, 89; Stephens, M. e outros, J. Cell Science, 1993, 103, 1111).

A degradação excessiva do colagêneo do tipo II nas camadas externas ou nas superfícies articulares das articulações é também causada por osteoartrite. A rede de colagêneo fica, de acordo com isto, enfraquecida, desenvolve, em consequência, fibrilhação em que as substâncias da matriz tais como os proteoglicanos são perdidas e, eventualmente, são completamente deslocados. Essa fibrilhação de cartilagem osteoartrítica enfraquecida pode atingir, por baixo da cartilagem calcificada e dentro do osso sub-côndrico (Kempson, G. E. e outras, Biochim. Biophys. Acta, 1976, 428,

741; Roth, V. e Mow, V. C., J. Bone Joint Surgery, 1980, 62A, 1102; Woo, S. L.-Y. e outros em Handbook of Bioengineering (R. Skalak e S. Chien eds.), McGraw-Hill, New York, 1987, p. 4.1-4.44).

Descrições do desenvolvimento básico, da anatomia histológica e microscópica do osso, da cartilagem e de outras tais como tecidos conjuntivos podem ser encontradas, por exemplo, em Wheater, Burkitt e Daniels, Functional Histology, 2ª edição, (Churchill Livingstone, Londres, 1987, Cap. 4). As descrições da anatomia histológica básica de defeitos nos ossos, cartilagem e outro tecido conjuntivo, podem ser encontrados, por exemplo, em Wheater, Burkitt, Stevens e Lowe, Basic Histopathology, (Churchill Livingstone, Londres, 1985, Cap. 21).

A despeito dos avanços na cultura dos condrócitos e na manipulação dos ossos e cartilagem, não houve grande sucesso nas tentativas para transplantar cartilagem ou condrócitos para reparar as superfícies de articulação danificadas. Os ensinamentos da presente invenção providenciam meios efectivos e eficientes de promoção da transplantação da cartilagem e/ou de condrócitos numa junta da articulação defeituosa ou noutras superfícies do osso cobertas com cartilagem, em que a cartilagem é regenerada para corrigir o defeito. A presente invenção também tem por objecto instrumentos cirúrgicos que se destinam a preparar o sítio do enxerto de modo a facilitar a integração eficiente de material enxertado no sítio do enxerto.

### **Breve sumário da invenção**

A presente invenção tem por objecto um processo in vitro para fazer aderir os condrócitos a um componente isento de

células tal como definido na reivindicação 1. O produto deste processo pode ser utilizado no tratamento da cartilagem da superfície da junta de articulação pela transplantação de condrócitos numa matriz apropriada, para uma superfície a ser tratada, com uma barreira hemostática e coberta por um adesivo isento de células. Uma barreira hemoestática, como será melhor descrito a seguir, é uma barreira que inibe ou previne a penetração de células e de tecido de vascularização no material enxertado. Isento de células, é utilizado aqui, como na técnica e significa um material que é praticamente isento de células intactas que são capazes de mais uma divisão das células, promulgação ou actividade biológica. Num enquadramento preferido, um material isento de células é isento de todas as células nucleadas intactas.

### **Breve descrição dos desenhos**

A presente invenção será melhor compreendida pela análise das figuras que se seguem que ilustram algumas propriedades da presente invenção em que:

A figura 1A é um desenho que mostra um terminal de articulação típico de um osso. Normalmente, o material do osso está coberto na superfície da articulação com uma cartilagem.

A figura 1B mostra um exemplo de onde ocorre um defeito ou um traumatismo da cobertura cartilaginosa (interrupção da cartilagem); e esse defeito pode ser tratado directamente, alargado ligeiramente ou esculpido para aceitar o material enxertado por processos cirúrgicos antes do tratamento.

A figura 1C mostra como a barreira hemoestática (com o número 1) é colocada dentro do defeito na cobertura da cartilagem

para inibir ou prevenir a vascularização na cartilagem em regeneração, a partir do osso subjacente. Os condrócitos a ser implantados na cavidade com defeito são então postos em camadas no topo da barreira hemoestática.

A figura 2 é um desenho que mostra o defeito tratado (interrupção na cartilagem) na cobertura cartilaginosa coberta por um material semi-permeável isento de células (com o número 2) que é utilizado para formar uma cobertura/adesivo ou ligadura sobre o sítio do defeito. Esta cobertura é fixada no lugar, quer suturada na borda da cavidade em cartilagem saudável, quer ligada a outro sítio qualquer. Esta cobertura cobre a área defeituosa da junta em que foram colocados os condrócitos/transplante de cartilagem ou será colocada sobre a cobertura parcialmente ligada.

A figura 3A é um diagrama que ilustra a resposta diferencial à compressão e às forças de corte por cartilagem mais dura ou mais macia com a subsequente zona de demarcação.

A figura 3B ilustra o sítio do enxerto depois do defeito ter sido esculpido para ter paredes onduladas.

A figura 3C ilustra o sítio do enxerto esculpido com a barreira homeoestática (1), o material transplantado (3) e o adesivo de cobertura isento de células (2) num lugar dentro da cartilagem da superfície articular (4).

A figura 4A ilustra um enquadramento do dispositivo cirúrgico da presente invenção, mostrando os dentes de corte (5) e o alfinete de colocação e projecção (6). As ilustrações da secção transversal à direita mostram duas configurações possíveis das lâminas de corte.

A figura 4B ilustra um segundo enquadramento do dispositivo cirúrgico da presente invenção.

A figura 5 representa um diagrama que ilustra a resposta diferencial modificada à compressão e forças de corte pela cartilagem mais dura e pela cartilagem mais mole, depois de se esculpir o sítio do enxerto.

A figura 6A representa uma imagem de IMR de um joelho de porco mostrando o defeito da cartilagem no côndilo (mediano) esquerdo.

A figura 6B representa uma imagem de IRM do mesmo joelho de porco três meses após o tratamento.

### **Descrição detalhada da invenção**

A presente invenção tem por objecto a utilização de certos produtos que inibem a formação de tecido vascular, por exemplo, tal como o estabelecimento da projecção de anéis capilares na cartilagem, durante o processo de transplantação autóloga de condrócitos nos defeitos da cartilagem. A formação de tecido vascular do osso subjacente tenderá a projectar-se na nova cartilagem a ser formada conduzindo ao aparecimento de células diferentes dos condrócitos desejados específicos do mesênquima.

As células contaminantes introduzidas pela vascularização podem dar origem ao enrocamento e a um sobre-crescimento na cartilagem a ser formada pelos condrócitos implantados. Um dos tipos de produtos comerciais que podem ser utilizados na presente invenção é o Surgicel® (Ethicon Ltd., RU) que pode ser adsorvível após um período de 7 - 14 dias. A utilização deste material no processo da presente



invenção é contrária à utilização normal de um dispositivo hemoestático, tal como o Surgicel®, tal como está descrito na embalagem inserida pela Ethicon Ltd.

Surpreendentemente, os requerentes verificaram que, numa situação em que se deseja inibir a re-vascularização na cartilagem, um material hemoestático actuará como um coágulo artificial semelhante a um gel. Se as células dos glóbulos vermelhos do sangue têm que estar presentes dentro de toda a espessura do defeito da cartilagem articular que está revestida por essa barreira hemoestática, esses glóbulos vermelhos do sangue serão modificados quimicamente para hematina e assim tornam-se incapazes de induzir o crescimento vascular. Assim, um produto hemoestático utilizado como uma barreira inibidora da re-vascularização com ou sem adesivos de fibrina, tal como, por exemplo, Surgicel®, é eficaz. De acordo com a presente invenção, utiliza-se um componente isento de células que é utilizado como um adesivo que cobre a área defeituosa da junta para a qual os condrócitos/cartilagem estão a ser transplantados, utilizando condrócitos autólogos para a transplantação. O processo da presente invenção também contempla a utilização de condrócitos alogénicos ou condrócitos xenogénicos apropriados.

Os processos para a reparação ou o tratamento efectivo dos defeitos da cartilagem em superfícies do osso da junta articular podem compreender a administração de um agente ou de um dispositivo para bloquear a invasão vascular no sítio da cartilagem a ser reparado e também providencia uma barreira isenta de células que isolará o sítio a reparar e que manterá as células a transplantar no lugar. Estes processos podem envolver um kit que compreende uma componente de barreira hemoestática para inserção no sítio a ser

reparado de tal modo que haja uma inibição efectiva da vascularização no sítio a ser reparado; e, logo que os condrócitos a ser transplantados estão colocados no sítio a ser reparado, recobre-se o sítio a reparar com uma barreira semi-permeável, isenta de células, de tal modo que os condrócitos transplantados são mantidos no lugar, mas são ainda capazes de ter acesso a nutrientes.

Certos aspectos da presente invenção têm sido exemplificados utilizando um sistema *in vitro* para estudar o comportamento dos condrócitos quando em contacto com um certo produto ou uma combinação de certos produtos que inibem a formação do tecido vascular. Este ensaio *in vitro* prevê a capacidade de certos materiais ensaiados para inibir a vascularização, tal como ela ocorrerá *in vivo* em que os anéis capilares se projectam para a cartilagem a ser estabelecida durante o processo de transplantação autóloga de condrócitos nos defeitos da cartilagem.

Os produtos hemoestáticos apropriados serão caracterizados por terem a capacidade de inibir o crescimento ou a invasão de tecido vascular, osteócitos, fibroblastos, etc., no desenvolvimento da cartilagem. Um material hemoestático apropriado atingirá o objectivo de que a invasão vascular e celular no desenvolvimento da cartilagem deve ser evitado, de modo a otimizar a formação de cartilagem e conseguir a reparação de toda a espessura de qualquer defeito na cartilagem articular. Idealmente, a barreira hemoestática será estável por um período longo de tempo, suficiente para permitir que toda a cartilagem seja reparada e que então seja capaz de ser reabsorvida ou de algum modo ser quebrada com o tempo. Um material identificado como apropriado é chamado Surgicel® W1912 (uma celulose absorvível, esterilizada, regenerada, oxidada, contendo hemoestato; Lote GG3DH, Ethicon

Ltd. RU). Outro exemplo de um material apropriado é o BioGide® (uma almofada com uma matriz de colagénio do tipo I, disponível comercialmente; Geistlich Söhne, Suíça).

Pode-se encontrar no mercado material apropriado de cola orgânica, tal como, por exemplo, Tisseel® ou Tissucol® (adesivo à base de fibrina; Immuno Ag, Áustria), Adhesive Protein (Cat. #A-2707, Sigma Chemical, EUA) e Dow Corning Medical Adhesive B (Cat. #895-3, Dow Corning, EUA).

Os instrumentos cirúrgicos podem ser fabricados a partir de metal e/ou de plástico apropriados para produzir instrumentos cirúrgicos para uma única utilização e descartáveis ou instrumentos re-utilizáveis várias vezes. O instrumento de corte pode conter dentes cortantes que são completamente circulares ou planos ou qualquer coisa entre as duas possibilidades. Como a cartilagem é um material relativamente macio, pode ser vantajoso fabricar as bordas de corte em plástico endurecido que serão capazes de esculpir a cartilagem sem danificarem o osso. Esses instrumentos de corte podem ser produzidos de modo a incorporarem aberturas para administração de fluido, remoção por sucção de resíduos do corte e fluidos e extremidades de fibras ópticas para iluminação e visualização do sítio defeituoso.

Alguns aspectos da presente invenção podem ser melhor compreendidos como se ilustra pelos exemplos que se seguem, que têm um significado de ilustração e não de limitação.

### **Exemplo 1**

Para se utilizar o Surgicel® de acordo com a presente invenção para prevenir o desenvolvimento de vasos sanguíneos na cartilagem autóloga implantada ou nos condrócitos, tratou-

se primeiro o Surgicel® com um fixador, tal como aldeído glutárico. Em resumo, tratou-se o Surgicel® com aldeído glutárico a 0,6 %, durante 1 minuto, seguido de várias lavagens para eliminar os resíduos de aldeído glutárico que pode, de alguma forma, ser tóxico para o tecido. Alternativamente, o Surgicel® é tratado com um adesivo de fibrina designado por Tisseel® antes do tratamento com aldeído glutárico tal como se descreveu no exemplo 2. Verificou-se que o Surgicel® fixado, por exemplo, com um fixador tal como ácido glutárico, lavado com uma solução salina fisiológica, esterilizada (0,9 %) e armazenada num frigorífico, não se dissolve durante 1 a 2 meses. Geralmente, o Surgicel é reabsorvido num período entre 7 e 14 dias. Este tempo será demasiado curto, porque é necessário um período de tempo mais prolongado para a prevenção do desenvolvimento de vasos sanguíneos ou vascularização tal como na estrutura do osso na cartilagem implantada antes dos condrócitos implantados terem crescido numa camada de cartilagem sólida obtendo as suas necessidades de nutrição a partir da cartilagem vizinha. Por outras palavras, a inibição suficiente da vascularização é necessária para um período de tempo mais longo, tal como, por exemplo, um mês. Por isso, o produto não deve ser absorvido significativamente antes desse tempo. Por outro lado, a reabsorção é eventualmente necessária. Por isso, o material orgânico utilizado como uma barreira inibidora deve ter essas capacidades e tem-se verificado que o Surgicel® tratado desta maneira, providencia essa função.

## **Exemplo 2**

O Surgicel® também foi revestido com uma cola orgânica. Neste exemplo a cola utilizada foi Tisseel®, mas podem-se utilizar outras. Este produto, em conjunto com o Surgicel®

produz uma barreira utilizável para o fim particular da presente invenção. Pode-se utilizar qualquer outra barreira de inibição vascular ou hemoestato. Misturou-se o Tisseel®, tal como se descreve a seguir. Revestiu-se o Surgicel® com Tisseel® pulverizando o material de Surgicel® em ambos os lados até ficar embebido. Deixou-se então o Tisseel® (cola de fibrina) solidificar à temperatura ambiente. Imediatamente antes de se completar a solidificação, o Surgicel® revestido foi então colocado em aldeído glutárico a 0,6 % durante 1 minuto e foi depois lavado com soro fisiológico esterilizado (0,9 %). O pH foi então ajustado por meio de SBF e/ou com NaOH até o pH estar estável entre 7,2 e 7,4. Depois do Surgicel® ser assim tratado, lavou-se então num meio de cultura de tecido tal como meio essencial mínimo/F12 com tampão de Hepes 15 mM.

Tal como se mencionou neste exemplo, os requerentes utilizaram Tisseel® como adesivo de fibrina para revestir o Surgicel®. Além disso, o adesivo de fibrina ou a cola podem também ser aplicados directamente no fundo da lesão em direcção a osso, em que o Surgicel® é colado. Este sistema *in vitro* utilizado, em lugar do ensaio *in vivo*, consistiu numa placa descartável, esterilizada, com 6 tubos Nunclon™ Delta para trabalho de investigação de células (NUNC, InterMed, Roskilde, Dinamarca). Cada tubo mede aproximadamente 4 cm de diâmetro.

Na presente invenção, o adesivo de fibrina pode ser qualquer adesivo que, em conjunto com o componente de fibrina produzirá uma cola que pode ser tolerada pelas pessoas (Ihara, N. e outros, Burns Incl. Therm. Inj., 1984, 10, 396). A presente invenção também antecipa qualquer outro componente de cola que possa ser utilizado em lugar do adesivo de fibrina. Na presente invenção utilizou-se Tisseel® ou

Tissucol® (Immuno Ag, Viena, Áustria). O kit de Tisseel® consiste nos seguintes componentes:

Tisseel®, um selante, inativado para vírus, liofilizado, contendo proteína coagulável, por isso: fibrinogénio, fibronectina do plasma (CIG) e factor XIII e Plastimogen.

Solução de aprotinina (de bovino)

Trombina 4 (de bovino)

Trombina 500 (de bovino)

Solução de cloreto de cálcio

O kit de Tisseel® contém um sistema de aplicação de Duploject®. Combina-se o adesivo de fibrina ou o selante com dois componentes utilizando um kit de Tisseel® da maneira que se segue, de acordo com a folha de produto inserida pela Imuno AG:

### **Exemplo 3**

Os condrócitos cresceram num meio de cultura essencial mínimo contendo HAM F12 e tampão de Hepes 15 mM e soro autólogo a 5 a 7,5 % num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C e manipularam-se num laboratório da Classe 100 na Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Podem utilizar-se outros meios de cultura de outras composições para fazer a cultura dos condrócitos. Fez-se a tripsinização das células utilizando EDTA de tripsina durante 5 a 10 minutos e contou-se utilizando a coloração de viabilidade de Azul de Tripano numa câmara de Bürker-Türk. A contagem das células foi ajustada para  $7,5 \times 10^5$  células por mL. Uma das placas Nunclon™ não esteve recoberta no laboratório da Classe 100.

A barreira hemoestática de Surgicel® foi cortada para uma dimensão apropriada adaptada ao fundo das cavidades da bandeja de cultura de tecido Nunclon™. Neste caso, coloca-se um círculo, com uma dimensão de aproximadamente 4 cm (mas podia ser de qualquer dimensão possível), em condições assépticas, no fundo das cavidades numa placa descartável, esterilizada de 6 tubos Nunclon™ Delta para trabalho de pesquisa de células (NUNC, InterMed, Roskilde, Dinamarca). A barreira hemoestática a ser colocada no fundo do tubo foi pré-tratada como se descreveu no exemplo 1. Este tratamento atrasa significativamente a absorção de Surgicel. Esta barreira hemoestática foi então lavada várias vezes em água destilada e em seguida várias vezes até que todo o glutaraldeído que não reagiu tenha sido lavado. Uma pequena quantidade do meio de cultura de células contendo soro foi aplicada para ser absorvido pela barreira hemoestática e, ao mesmo tempo, conservava-se a barreira hemoestática húmida no fundo do tubo.

Aproximadamente  $10^6$  células em 1 mL de meio de cultura foram colocadas directamente no topo da barreira hemoestática, dispersas sobre a superfície da barreira hemoestática pré-tratada com glutaraldeído a 0,4 %, tal como se descreveu antes. Incubou-se então a placa num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 60 minutos. Adicionou-se cuidadosamente uma quantidade de 2 a 5 mL do meio de cultura de tecido contendo soro a 5 a 7,5 %, às cavidades contendo as células, evitando que as células se espalhassem, mantendo a ponta da pipeta tangencial ao lado da cavidade quando se expeliu o meio. Verificou-se que o pH do meio era demasiado baixo (pH ~6,8). O pH foi então ajustado para 7,4 a 7,5. No dia seguinte alguns condrócitos começaram a crescer na barreira hemoestática, arranjados em agrupamentos. Algumas das células morreram devido à exposição a um pH baixo antes do

ajustamento do pH. A placa foi incubada durante 3 a 7 dias com mudança do meio no 3º dia.

No fim do período da incubação, o meio foi decantado e adicionou-se glutaraldeído a 2,5 % refrigerado e frio, contendo sal de sódio do ácido dimetilarsínico 0,1 M (também chamado cacodilato de sódio, ajustou-se o pH com HCl para 7,4) como fixador, para a preparação da célula e do seu suporte (barreira hemoestática) para uma preparação posterior para a microscopia electrónica.

#### **Exemplo 4**

Os condrócitos cresceram num meio de cultura essencial mínima contendo HAM F12 e tampão de Hepes 15 mM e soro autólogo a 7,5 % num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C e manipularam-se num laboratório da Classe 100 na Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Podem utilizar-se outros meios de cultura com outras composições para fazer a cultura dos condrócitos. Fez-se a tripnização das células utilizando EDTA de tripsina durante 5 a 10 minutos e contou-se utilizando a coloração de viabilidade de Azul de Tripano numa câmara de Bürker-Türk. A contagem das células foi ajustada para  $7,5 \times 10^5$  células por mL. Uma das placas de Nunclon™, no laboratório de Classe 100, não estava tapada.

Tratou-se o Surgicel ® (para ser utilizado como barreira hemoestática) com aldeído glutárico a 0,6 % durante um minuto tal como se descreveu no exemplo 1 e lavou-se com uma solução de cloreto de sódio esterilizada, a 0,9 % ou, de preferência com um tampão tal como um tampão de SBF ou com um meio de cultura tal como MEM/F12, porque o pH, depois do tratamento com aldeído glutárico é de 6,8 e deve ser, preferencialmente, de 7,0 a 7,5. Aplicou-se o Tisseel ® em ambos os lados do Surgicel ® utilizando o sistema Duploject ®, revestindo-se



assim ambos os lados do Surgicel ®, sendo o adesivo que se pretende utilizar, um adesivo de fibrina. Deixa-se a cola secar em condições assépticas durante pelo menos 3 a 5 minutos. A barreira hemoestática "revestida" foi colocada no fundo da cavidade numa placa descartável estéril de 6 cavidades Nunclon™ Delta para trabalhos de pesquisa de células. Aplicou-se uma pequena quantidade de meio de cultura de tecido contendo soro para ser absorvido na barreira hemoestática. Aproximadamente  $10^6$  células em 1 mL de meio de cultura de tecidos contendo soro, foram colocadas directamente no topo do Hemoestato, dispersas sobre a superfície da barreira hemoestática. A placa foi então incubada num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C, durante 60 minutos. Adicionou-se cuidadosamente às cavidades contendo as células uma quantidade de 2 a 5 mL de meio de cultura de tecido contendo soro a 5 a 7,5 %, evitando-se que as células se espalhem, mantendo a ponta da pipeta tangencial ao lado da cavidade quando se expelle o meio. Passados 3 a 6 dias, o exame ao microscópio mostrou que as células aderiram e cresceram no Surgicel ® de uma forma satisfatória, sugerindo que o Surgicel ® não mostrou toxicidade para com os condrócitos e que os condrócitos cresceram de uma forma satisfatória no Surgicel ®.

A placa foi incubada durante 3 a 7 dias com uma mudança do meio no 3º dia. No fim do período de incubação, o meio foi decantado e adicionou-se glutaraldeído a 2,5 % arrefecido no frigorífico, contendo sal de sódio do ácido dimetilarsínico 0,1 M, também chamado cacodilato de sódio, ajustou-se o pH com HCl para 7,4) como fixador para a preparação da célula e do seu suporte (barreira hemoestática para uma preparação posterior para microscopia electrónica.

## Exemplo 5

Os condrócitos cresceram num meio de cultura essencial mínimo contendo HAM F12 e tampão de Hepes 15 mM e soro autólogo a 5 a 7,5 % num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C e manipularam-se num laboratório da Classe 100 na Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Fez-se a tripsinização das células utilizando EDTA de tripsina durante 5 a 10 minutos e contou-se utilizando a coloração de viabilidade de Azul de Tripiano numa câmara de Bürker-Türk. A contagem das células foi ajustada para  $7,5 \times 10^5$  até  $2 \times 10^6$  células por mL. Uma das placas Nunclon™ ficou destapada no laboratório da Classe 100.

Verificou-se que o Bio-Gide ® pode ser utilizado como uma membrana de duas camadas reabsorvível que será utilizada como o adesivo ou a ligadura que cobre a área defeituosa da articulação em que os condrócitos da cultura estão a ser transplantados assim como a barreira hemoestática. O Bio-Gide ® é uma membrana de colagénio puro obtida por processos de fabrico normalizados e controlados (por E. D. Geistlich Söhne AG, CH-6110 Wolhuse). O colagénio é extraído de porcos certificados por veterinários e é cuidadosamente purificado para evitar as reacções antigénicas e é esterilizado em embalagens duplas com "blister" por meio de radiação  $\gamma$ . A membrana em camada dupla tem uma superfície porosa e uma superfície densa. A membrana é feita de colagénio do tipo I e do tipo III sem reticulação ou tratamento químico. O colagénio é reabsorvido no prazo de 24 semanas. A membrana retém a sua integridade estrutural mesmo quando molhada e pode ser fixada por suturas ou unhas. A membrana pode também ser "colada" utilizando adesivo de fibrina tal coma Tisseel® na vizinhança da cartilagem ou do tecido, quer em vez da suturas, quer em conjunto com as suturas.

O Bio-Gide® foi destapado num laboratório da classe 100 e foi colocado em condições assépticas no fundo das cavidades de uma placa descartável, esterilizada, com 6 cavidades Nunclon™ Delta para trabalho de pesquisa de células, quer com a superfície porosa da membrana de camada dupla com a face para a cima ou com a superfície densa voltada para cima. Aproximadamente  $10^6$  células em 1 mL de meio de cultura de tecido contendo soro foram colocadas directamente no topo do Bio-Gide®, foram dispersas quer sobre a superfície porosa ou sobre a superfície do Bio-Gide®. Incubou-se então a placa numa incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 60 minutas. Adicionou-se cuidadosamente, às cavidades contendo as células, uma quantidade de 2 a 5 mL do meio de cultura de tecido contendo soro a 5 a 7,5 %, evitando-se que as células se espalhassem, mantendo a ponta da pipeta tangencial ao lado da cavidade quando se expele o meio.

No 2º dia após os condrócitos serem colocados nas cavidade contendo o Bio-Gide®, as células foram examinadas num microscópio inverso da Nikon. Notou-se que alguns condrócitos tinham aderido à borda do Bio-Gide®. Claro que não foi possível ser capaz de olhar através do próprio Bio-Gide®, através deste microscópio.

A placa foi incubada durante 3 a 7 dias com mudança do meio no 3º dia. No fim do período de incubação, o meio foi decantado e adicionou-se glutaraldeído a 2,5 % refrigerado e frio, contendo sal de sódio do ácido dimetilarsínico 0,1 M, também chamado cacodilato de sódio, ajustou-se o pH com HCl para 7,4, como fixador para a preparação de células e do seu suporte de Bio-Gide® com as células quer em cultura na superfície porosa, quer na superfície densa. Os adesivos de Bio-Gide® foram então enviados para o microscópio electrónico

do Departamento de Patologia do Hospital Herlev, na Dinamarca.

A microscopia electrónica mostrou que os condrócitos em cultura na superfície densa do Bio-Gide® não cresceram na estrutura de colagénio do Bio-Gide®, enquanto as células em cultura na superfície porosa cresceram realmente na estrutura de colagénio e, além disso, mostraram a presença de proteoglicanos e não mostraram sinais de estruturas de fibroblasto. Este resultado mostra que, quando o adesivo de colagénio, como por exemplo um adesivo de Bio-Gide®, que é como um adesivo que cobre um defeito de cartilagem da superfície porosa deve estar virado para baixo na direcção do defeito em que os condrócitos de cultura serão injectados. Eles serão então capazes de penetrar no colagénio e produzir uma superfície com uma cartilagem macia em linha com a superfície intacta e, nesta área, crescerá uma camada macia de proteoglicanos. Ao mesmo tempo, se a superfície densa do colagénio estiver virada para baixo na direcção do defeito, os condrócitos a serem implantados não irão integrar-se com o colagénio e as células não produzirão a mesma superfície macia que se descreveu antes.

### **Exemplo 6**

Os condrócitos cresceram em meio de cultura essencial mínimo contendo HAM F12 e tampão Hepes 15 mM e 5 a 7,5 % de soro autólogo num incubador de CO<sub>2</sub> a 37 °C e manipularam-se num laboratório da Classe 100 na Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Dinamarca. Fez-se a tripsinização das células utilizando EDTA de tripsina durante 5 a 10 minutos e contou-se utilizando a coloração de viabilidade de Azul de Tripiano numa câmara de Bürker-Türk. A contagem das

células foi ajustada para  $7,5 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  células por mL. Destapou-se uma placa Nunclon™ no laboratório da Classe 100.

O Bio-Gide® utilizou uma membrana em duas camadas reabsorvível que pode também ser utilizada em conjunto com uma cola orgânica tal como Tisseel® com um teor adicional, significativamente mais alto de aprotinina do que o que normalmente se encontra no Tisseel®, tal como se descreveu no produto inserido. Aumentando o conteúdo de aprotinina para cerca de 25.000 KIU/mL, a reabsorção do material será retardada de semanas em vez do tempo normal em dias.

Para fazer ensaio desta característica, *in vitro*, o Tisseel® aplica-se ao fundo da cavidade da placa Nunclon™ e deixa-se solidificar incompletamente. Aplica-se então um adesivo de colagénio tal como um Bio-Gide® sobre o Tisseel® e cola-se ao fundo da cavidade. Esta combinação de Bio-Gide® e Tisseel® é construída para ser uma barreira hemoestática que inibirá ou evitará o desenvolvimento ou a infiltração de vasos sanguíneos na área de transplantação dos condrócitos. Este adesivo híbrido de colagénio pode agora ser utilizado quer como uma barreira hemoestática no fundo da lesão (o mais próximo da superfície a ser reparada), mas também como um suporte para a formação da cartilagem porque a superfície distal pode ser o lado poroso do adesivo de colagénio e assim pode encorajar a infiltração dos condrócitos e da matriz da cartilagem. Assim, este adesivo híbrido de colagénio pode também ser utilizado para cobrir o topo do implante com a superfície porosa de colagénio dirigida para baixo na direcção dos condrócitos implantados e a barreira formando o topo. O adesivo híbrido de colagénio, com elevado teor de aprotinina, pode também ser utilizado sem qualquer cola orgânica tal como Tisseel® e ser colocado directamente na zona defeituosa, aderindo pelas forças naturais. Assim, o

adesivo de colagénio pode ser utilizado tanto como barreira hemoestática como cobertura isenta de células do sítio de reparação/transplante, com as superfícies porosas dos adesivos orientada para os condrócitos/cartilagem transplantados. Outra variante utilizaria um adesivo de colagénio que consiste em colagénio do tipo II (isto é, da Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen).

Assim, o presente processo providencia um adesivo híbrido de colagénio, em que o referido adesivo é uma matriz de colagénio híbrido em que o referido adesivo é uma matriz de colagénio com níveis elevados do componente aprotinina, de preferência cerca de 25.000 KIU/mL, em associação com uma cola de matriz orgânica, em que a componente de colagénio é semelhante ao material reabsorvível em duas camadas de Bio-Gide® ou colagénio do tipo II e a cola orgânica é semelhante ao material de Tisseel®. Noutro exemplo, o adesivo híbrido de colagénio pode não utilizar nenhuma cola orgânica para aderir ao sítio a reparar.

#### **Exemplo 7**

Por causa da estrutura enfraquecida da cartilagem oosteoartrítica, a aderência dos condrócitos autólogos de cultura transplantados para um sítio de enxerto na cartilagem defeituosa, pode ser inibida, criando assim uma zona marginal (zona de demarcação) entre a cartilagem/condrócitos recentemente implantados e a cartilagem existente à volta. Esta zona marginal será mais pronunciada se o sítio do enxerto estiver preparado para o enxerto criando paredes macias e direitas cortadas de uma forma linear. As forças de corte e de compressão através dessa zona marginal (tal como ilustrado na figura 3A) exercerão uma grande força para desalojar o enxerto quando o sítio do enxerto é cortado de

uma forma linear. Esta zona marginal e o movimento diferencial dos materiais ao longo desta zona inibirão a cura confluyente entre o material enxertado e o material circundante. Esta zona material de corte é exacerbada quando a dureza do material de limitação é diferente. Em muitos casos, o material enxertado é mais macio do que os materiais circundantes, contudo, nalguns exemplos das doenças de osteoartrite, a cartilagem circundante pode, de facto, ser mais macia do que os condrócitos/cartilagem implantados.

Por isso, para resolver este problema, podem utilizar-se instrumentos cirúrgicos para esculpir as paredes do sítio do enxerto de tal modo que as paredes não sejam lineares e assim providenciam-se superfícies onduladas que reduzirão o corte da zona marginal e providenciam a ancoragem do material enxertado. É também possível modelar o sítio do enxerto de tal modo que o diâmetro do sítio próximo da superfície do osso seja de uma dimensão maior do que a abertura distal do osso e a superfície da cartilagem a ser reparada de tal modo que há um efeito de "funil inverso". Uma abertura mais estreita na superfície ajudará na redução da zona marginal de corte e na expulsão do material de enxerto do sítio do enxerto. Um exemplo preferido descreve a escultura das paredes do sítio do enxerto de uma forma semelhante à abertura feita para receber uma cavilha ou um parafuso (tal como ilustrado na figura 3B), providenciando assim resistência mecânica à compressão e ou à ejeção do material enxertado do sítio do enxerto que pode ser descrita como enfiamento "macho" e "fêmea".

Os instrumentos cirúrgicos podem ser fabricados a partir de metais e/ou plásticos apropriados para produzir instrumentos cirúrgicos descartáveis com uma única utilização ou re-utilizáveis com utilizações múltiplas. Como a

cartilagem é um material relativamente macio, pode ser vantajoso fabricar as bordas cortantes de plástico endurecido que serão capazes de esculpir a cartilagem sem serem capazes de danificar o osso. Esses instrumentos de corte podem ser fabricados de modo a incorporar aberturas para a administração de um fluido, para a eliminação por sucção dos resíduos do corte e fluido e fios de fibra óptica para iluminação e visualização do sítio defeituoso. Em certos instrumentos, a base do instrumento pode ter uma ponta protuberante ou uma estrutura semelhante a um alfinete que ajudará a guiar e a colocar o instrumento no sítio do enxerto. Obviamente esse alfinete será desenhado de modo a minimizar os danos ao osso subjacente.

Enquanto a superfície cortante do instrumento pode ter com um único dente ou vários dentes ou ser um modelo semelhante a um parafuso tal como numa torneira de metal usada para gerar os orifícios de enfiamento em partes metálicas, a característica requerida para o instrumento de corte é que os lados esculpidos resultantes do sítio do enxerto fiquem ondulado e não sejam lineares. Por exemplo, em certos instrumentos, a borda cortante do instrumento pode ter uma forma similar à mostrada na figura 4A ou como na figura 4B. O bordo de corte pode ser plano ou circular à volta do diâmetro do instrumento de corte. Podem-se desenhar muitas outras formas para criar uma interface que providencie uma resistência mecânica à reacção diferencial à compressão e às forças de corte no material transplantado e no material circundante.

### **Exemplo 8**

Submeteu-se um porco da raça mista Yorkshire, com quatro meses de idade, a uma anestesia geral e colocou-se de costas.



Lavou-se o porco e vestiu-se com um fato cirúrgico no Harrington Arthritis Research Center, Phoenix, Arizona. Realizou-se todo o processo cirúrgico assepticamente. Limpou-se, com iodo, a perna esquerda traseira e a área adjacente do abdômen e inguinal. Localizou-se a articulação do joelho e localizou-se a rótula. Realizou-se uma incisão média a aproximadamente 3 cm da parte posterior da rótula e cortaram-se várias camadas da sub-cútis e do músculo e ligamentos próximos de modo a permitir o acesso ao côndilo femoral médio. Utilizando um cortador circular, preparou-se uma lesão na cartilagem branca na parte média do côndilo, deixando uma margem de 0,5 a 1 cm até ao bordo da cartilagem cobrindo a parte média posterior do côndilo (côndilo esquerdo, figura 6A). O defeito de 0,5 a 1 cm foi colocado num peso caudal que se liga à parte média do côndilo. Todo o processo cirúrgico foi feito sem torniquete no fêmur esquerdo. As diferentes camadas e a pele foram suturadas apropriadamente.

No 3º dia, o animal foi novamente posto num fato cirúrgico e posicionado como antes na mesa de operações e foi-lhe dada uma anestesia geral. Pôs-se iodo na parte esquerda traseira, no abdômen e na região inguinal, tal como se descreveu antes. Cortaram-se as suturas e abriu-se a área. Verificou-se que estava presente um hematoma moderado na articulação do joelho. O coágulo de sangue foi retirado e inspeccionou-se o defeito. Havia um coágulo de sangue no defeito que foi retirado. Um instrumento cirúrgico esterilizado desenhado com um bordo de corte com fios machos, com uma dimensão correspondente ou ligeiramente maior do que uma circunferência da lesão foi cuidadosamente aparafusado no defeito. Cortou-se um retalho de BioGide® com uma dimensão igual ao fundo do defeito. A primeira cola utilizada, chamada Proteína de Adesivo (A-2707, Sigma Chemical, EUA) foi aplicada no lado denso do retalho da almofada da barreira

hemoestática aparada e o retalho foi colocado na parte de baixo no lado denso no fundo da lesão, utilizando-o como uma barreira, tal como se descreveu antes. Verificou-se que esta cola não parece secar muito rapidamente. Uma ligeira hemorragia do fundo do defeito parou imediatamente. Cortou-se um segundo BioGide® de alguma forma maior na circunferência do que a lesão e colocou-se com a parte densa para cima (assim com o lado poroso para baixo na direcção do enxerto), tal como se descreveu antes.

Este retalho de cobertura não celular foi então suturado sobre a cavidade, deixando uma borda aberta, em que o condrócito a ser explantado podia ser injectado no sítio do enxerto. A parte circundante da borda do retalho foi coberta com a segunda cola, Adesivo B da Dow Corning Medical (Cat. #895-3, Dow Corning, EUA). Esta segunda cola secou muito mais depressa e mais eficientemente do que a primeira cola. Verificou-se que, durante este processo particular, a primeira cola não secou suficientemente para fixar a barreira hemoestática no seu lugar quando se tentava suturar a cobertura. A primeira barreira formada na superfície proximal do sítio do enxerto foi feita pela própria cola.

Utilizando uma seringa de 1 mL e uma agulha com uma dimensão 16, a suspensão de células de condrócitos (cerca de 0,6 mL) foi posta no depósito da seringa. Ligou-se uma agulha curta com um buraco 23 a uma agulha com um buraco 16 e injectou-se a suspensão de células sob o adesivo que cobria a sutura no sítio do enxerto (cerca de  $10 \times 10^6$  células). O bordo aberto da cobertura foi então colado antes de se retirar a agulha e a agulha foi cuidadosamente retirada. Não se viu qualquer purga das células. Suturou-se a ferida e, tal como antes, não se utilizou nenhum torniquete, não se observou hemorragia. Suturaram-se as camadas finais de pele.

Não ocorreu nenhum inchaço na pele após a sutura, o que indica que não houve nenhum hematoma. A recuperação post-operatória foi calma.

Tal como se esperava, os condrócitos enxertados produziram uma matriz de cartilagem suficiente para reparar o defeito feito na superfície da cartilagem articular da articulação do joelho do porco do ensaio. A figura 6A é uma imagem de IRM de um joelho de porco mostrando o defeito da cartilagem criado no joelho (côndilo esquerdo, côndilo médio) e a figura 6B é uma imagem de IRM do mesmo joelho do porco, três meses após o tratamento, que mostra a reparação do defeito.

### **Exemplo 9**

Um kit compreendendo os componentes úteis para a prática apropriada do processo anterior, permitirá a prática apropriada do processo num conjunto cirúrgico. Esse kit providenciará componentes esterilizados apropriados para serem utilizados facilmente num ambiente cirúrgico, o que providenciará uma barreira hemoestática apropriada, um adesivo de cobertura apropriado e, se necessário, uma cola orgânica. O kit pode também providenciar um material de matriz isento de células, esterilizado, apropriado para suportar os condrócitos autólogos que devem ser implantados na zona defeituosa da superfície da junta articular. Num exemplo, o kit contém uma barreira hemostática de Surgicel® e um adesivo de cobertura Bio-Gide® com um revestimento apropriado de cola orgânica de Tisseel®, em que o Surgicel® e o BioGide® foram tratados para aumentar o tempo até à reabsorção. Em casos em que o Tisseel® está pré-revestido, o Tisseel® é complementado com aprotinina adicional para aumentar o tempo até à reabsorção.

Num outro exemplo preferido, a barreira hemoestática e o adesivo de cobertura são ambos uma matriz de colagénio semi-permeável que é tratada para estender o tempo até à reabsorção do material. É também possível providenciar cola de Tisseel® numa forma melhorada como um componente separado para ser aplicado à medida que for necessário por causa da sua variabilidade inerente e das circunstâncias únicas que serão encontradas em cada processo de reparação/transplantação.

Um outro exemplo de um kit inclui um instrumento cirúrgico como se descreveu no exemplo 7 anterior ou as suas variantes apropriadas.

Lisboa, 25 de Junho de 2009

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo *in vitro* para fazer aderir condrócitos a um elemento isento de células, compreendendo as etapas de:

providenciar um componente isento de células e um meio de cultura de células contendo condrócitos; e fazer a incubação do referido componente isento de células com o meio de cultura de células disperso numa superfície porosa do componente isento de células,

caracterizado pelo facto de

o referido componente isento de células compreender uma membrana de camada dupla com uma superfície porosa e uma superfície densa e

os condrócitos aderirem à referida superfície porosa.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido componente isento de células ser uma matriz de colagénio.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a referida matriz de colagénio consistir em colagénio do tipo I e do tipo III.
4. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a referida matriz de colagénio consistir em colagénio do tipo II.
5. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a referida matriz de colagénio consistir em colagénio do tipo I.

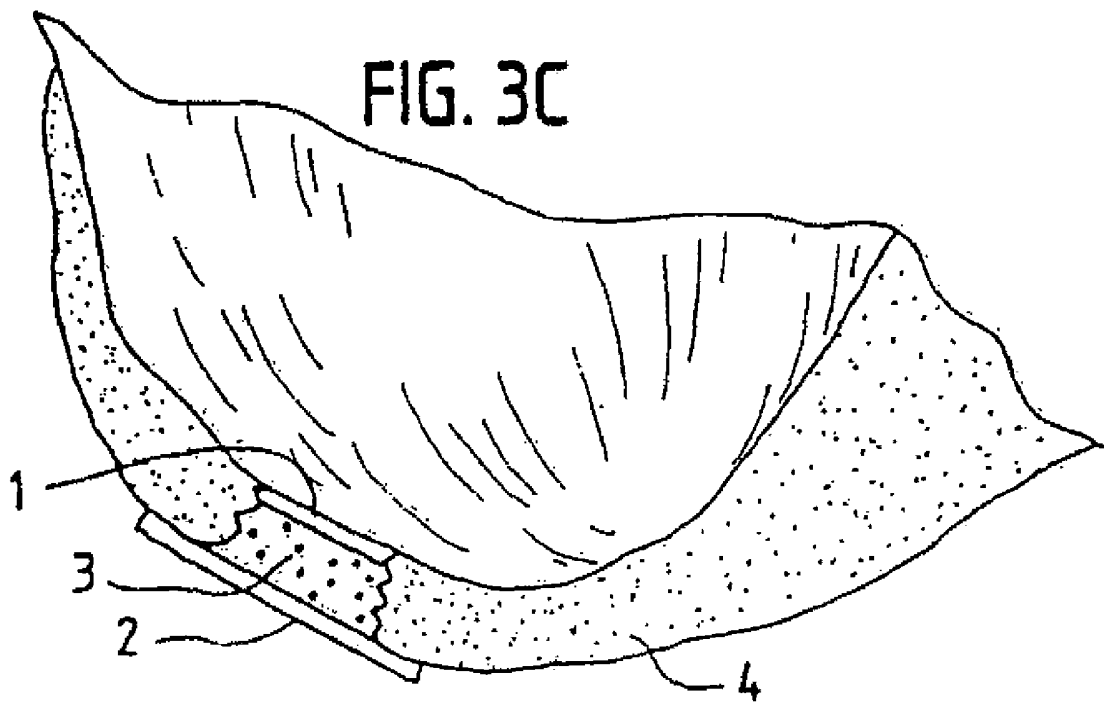
6. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo facto de o referido componente isento de células ou a matriz de colagénio serem reabsorvíveis.
7. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de os referidos condrócitos serem autólogos, alogénicos ou xenogénicos.
8. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de compreender ainda a etapa de aplicação de um adesivo biocompatível no referido componente isento de células.
9. Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de o referido componente se adaptar a ser colocado num defeito de uma cartilagem articular.

Lisboa 25 de Junho de 2009

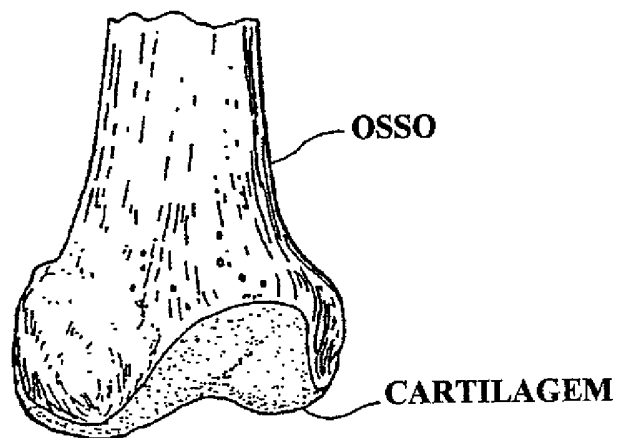
## RESUMO

### PROCESSO, INSTRUMENTOS E KIT PARA TRANSPLANTAÇÃO AUTÓLOGA

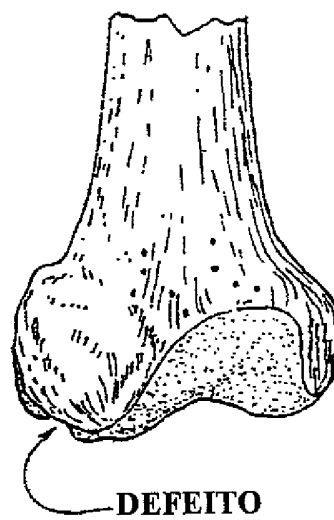
A presente invenção tem por objecto um processo para a transplantação efectiva de condrócitos/cartilagem para a superfície de uma junta articular que se pensa que tenha defeito, assim como uma descrição de certos instrumentos e um kit para a prática da presente invenção.



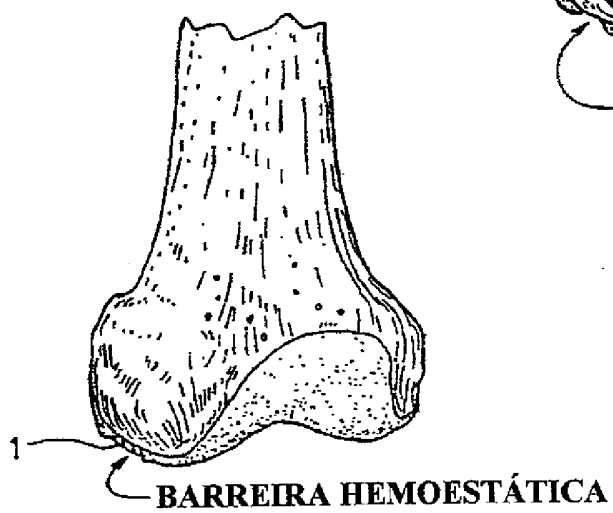
**FIG. 1A**



**FIG. 1B**

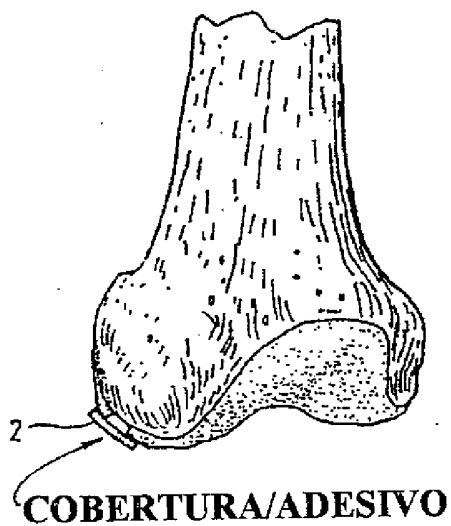


**FIG. 1C**

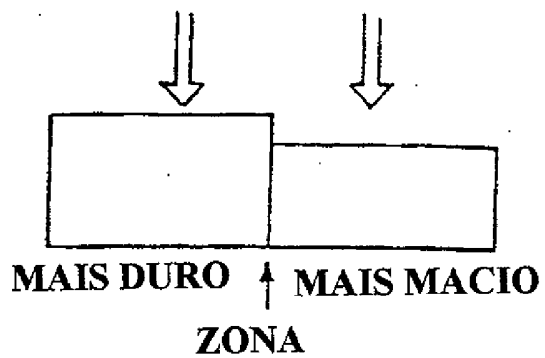




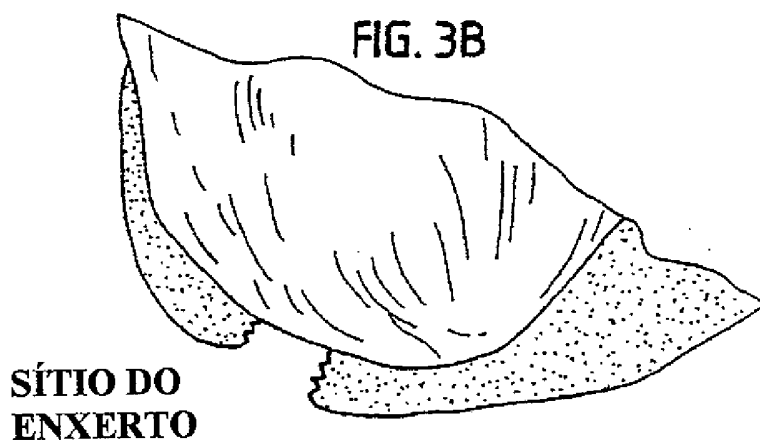
**FIG. 2**



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**

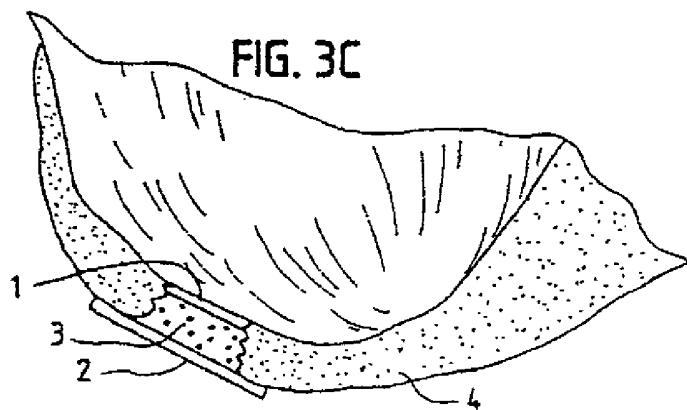


FIG. 4A

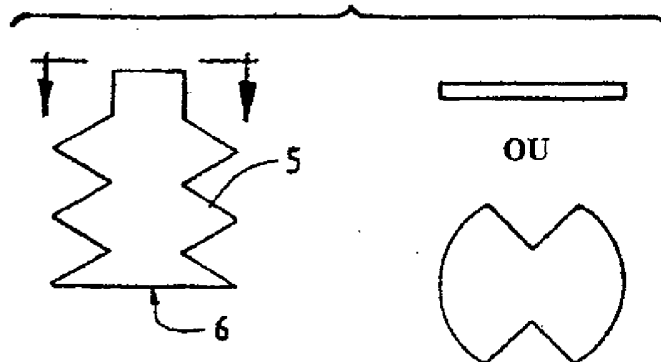


FIG. 4B

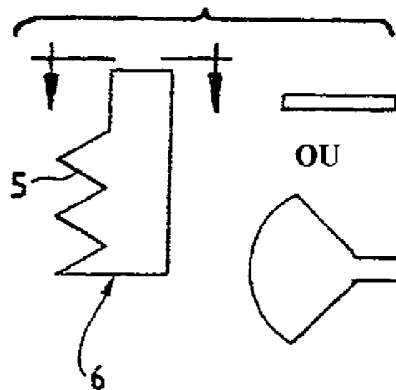
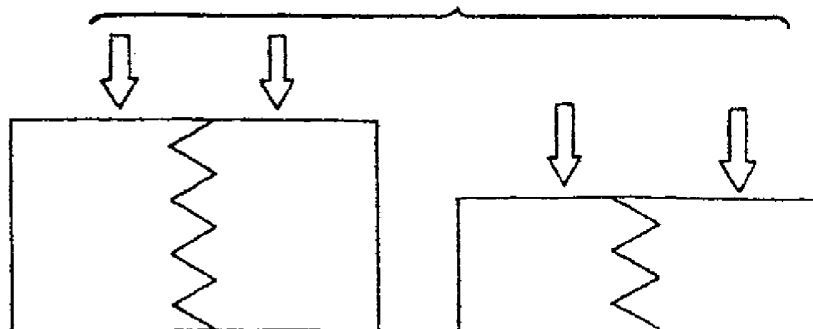


FIG. 5



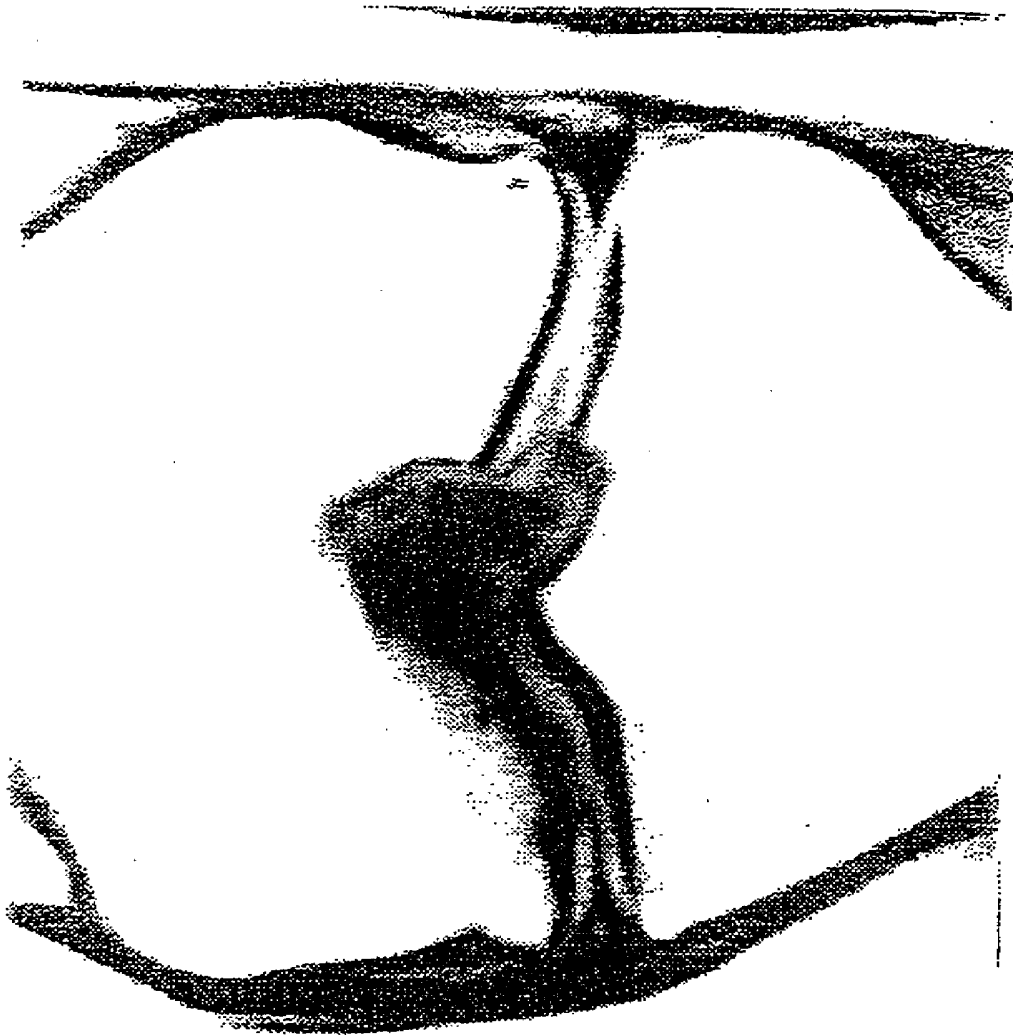


FIG. 6A

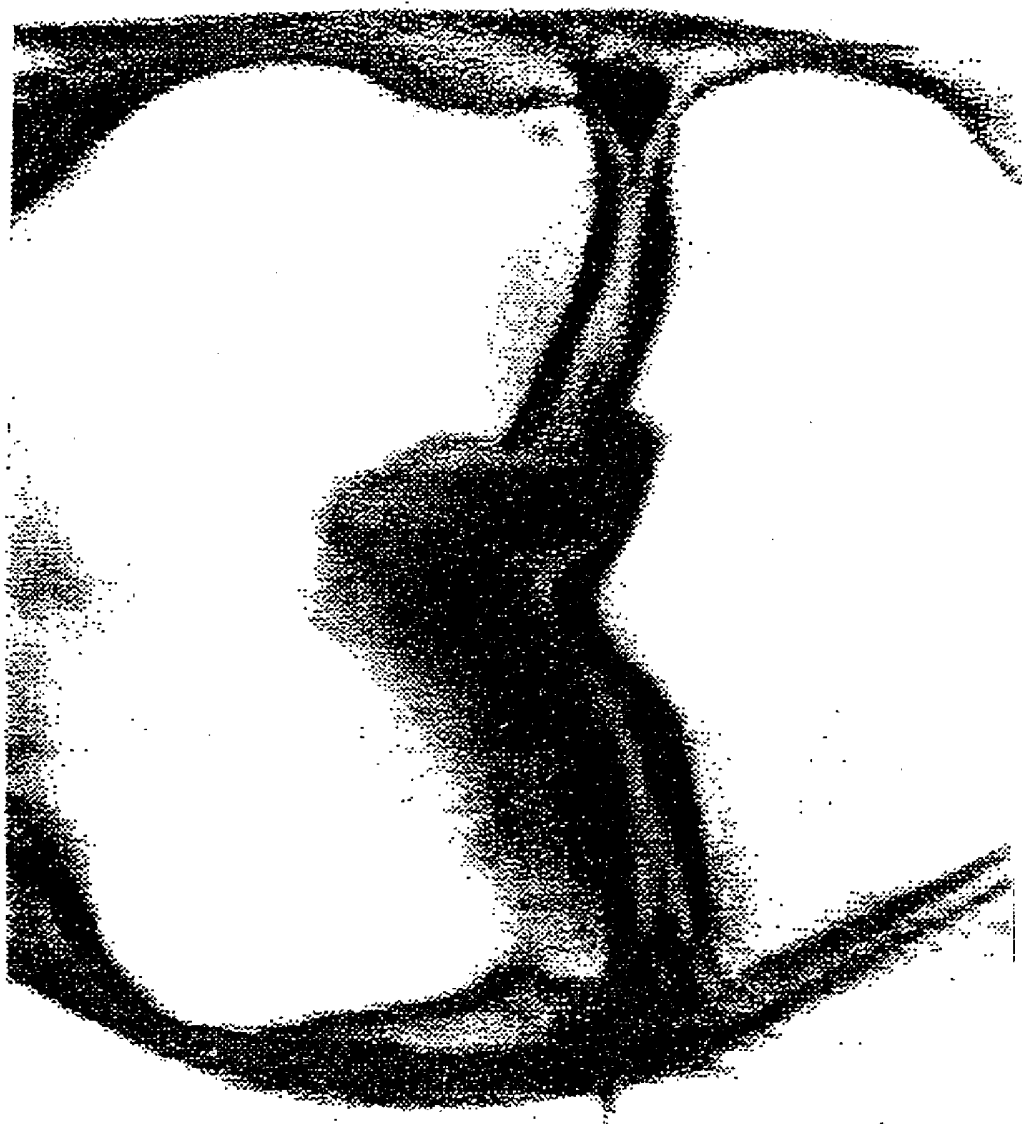


Fig. 68