



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034342

(51)⁷ A01N 1/02

(13) B

(21) 1-2016-01625

(22) 18/11/2014

(86) PCT/US2014/066054 18/11/2014

(87) WO2015/077199 28/05/2015

(30) 61/963,093 22/11/2013 US

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/10/2016 343A

(73) MARIZYME, INC. (US)

555 Heritage Drive, Suite 205, Jupiter, FL 33458, United States of America

(72) SURYAN, Mahendra (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KIT BẢO QUẢN CƠ QUAN VÀ MÔ, PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ DUNG DỊCH
BẢO QUẢN CƠ QUAN HOẶC MÔ VÀ PHƯƠNG PHÁP EX VIVO BẢO QUẢN
CƠ QUAN HOẶC MÔ

(57) Sáng chế đề cập đến kit bảo quản cơ quan và mô có độ ổn định cải thiện mà bao gồm hai dung dịch riêng biệt. Dung dịch thứ nhất (dung dịch A) bao gồm dung dịch muối cân bằng ổn định trong dung dịch ở độ pH 7,0 hoặc cao hơn. Dung dịch thứ hai (dung dịch B) bao gồm dung dịch nước chứa L-glutathion và/hoặc xysteinyglyxin, đường như D-glucosa, L-Arginin, tác nhân khử như axit ascorbic và nước ở độ pH thấp hơn 7,0. Sau đó, hai dung dịch được kết hợp với nhau tại thời điểm sử dụng và độ pH được điều chỉnh đến khoảng 7,3 để thu được dung dịch bảo quản cơ quan và mô có độ ổn định cải thiện. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bảo chế dung dịch bảo quản cơ quan hoặc mô và phương pháp *ex vivo* bảo quản cơ quan hoặc mô.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm bảo quản chức năng của mô và cơ quan và cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chế phẩm ổn định được trong thời hạn sử dụng để bảo quản chức năng của mô và cơ quan, cụ thể là chức năng của ống mạch, trước khi ghép.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hướng dẫn của tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào bằng cách viện dẫn đến toàn bộ nội dung của chúng.

Patent Mỹ số 7981596 bộc lộ chế phẩm bảo quản mô và cơ quan, thường được gọi là GALA. Chế phẩm được đặt tên theo ba thành phần: glutathion, axit ascorbic và L-Arginin. Dung dịch GALA cũng bao gồm dung dịch muối cân bằng. Các dung dịch này đặc biệt hữu dụng để bảo quản ống mạch như động mạch và tĩnh mạch. Ống mạch được sử dụng làm mảnh ghép cho nhiều thủ thuật bắc cầu bao gồm nhưng không giới hạn bởi phẫu thuật bắc cầu mạch ngoại vi và phẫu thuật ghép bắc cầu mạch vành (CABG). Ghép bắc cầu là phương pháp trong đó ống mạch được ghép theo cách mà qua cầu được bắc, động mạch bị tắc nghẽn sẽ phục hồi dòng máu dẫn đến mô đích. Trong phẫu thuật mạch, ống mạch được thu gom, làm sạch và bảo quản tạm thời trong dung dịch bảo quản trước khi ghép.

Hiện tượng loạn chức năng nội mô là quyết định tổ cơ bản trong sinh bệnh học liên quan dẫn đến hiện tượng thất bại ống mạch. Việc ghép thất bại được báo trước bởi hiện tượng huyết khối mảnh ghép, phì đại màng trong mạch và gia tăng xơ vữa động mạch mảnh ghép mà tất cả các hiện tượng này được xác nhận khi có các tổn thương chức năng và cấu trúc từ trước của màng trong ống mạch. Đã biết rằng việc lựa chọn dung dịch bảo quản cho các đoạn tĩnh mạch nổi được thu gom trong khi phẫu thuật có ảnh hưởng quan trọng đến cấu trúc nội mô và chức năng và kéo theo đó là độc quyền cấy ghép. Một số nhà điều tra đã chứng minh rằng các dung dịch nêu trên không phù hợp để bảo quản một cách thích hợp cho ống mạch (*Thatte HS, Biswas KS, Najjar SF, et al. Multi-photon microscopic evaluation of saphenous vein endothelium and its preservation with a new solution, GALA. Ann Thorac Surg 2003; 75: 1145-52 and Hussaini 2011*). Trong nghiên cứu *ex vivo* năm 2011 do Wilbring *et al* thực hiện, đã thể hiện rằng chức năng mạch bị

mất hoàn toàn sau khi các ống mạch thu gom được từ bệnh nhân được bảo quản trong dung dịch nước muối đậm, loại dung dịch thường được sử dụng để bảo quản ống mạch. Số liệu cho thấy chức năng tế bào nội mạc cũng bị giảm đáng kể khi các ống mạch bị loạn chức năng này được sử dụng thành công làm mảnh ghép cho phẫu thuật bắc cầu trong nghiên cứu này.

Tác dụng của dung dịch bảo quản GALA™ đối với các mảnh tĩnh mạch nổi của người được đánh giá trong các nghiên cứu *ex vivo*. Mặc dù các dung dịch hiện được sử dụng trong lâm sàng đã làm giảm đáng kể khả năng sống của tế bào nội mạc ống mạch (tĩnh mạch nổi), GALA™ vẫn duy trì được chức năng nội mạc và khả năng sống của cấu trúc trong ít nhất đến 24 giờ (*Thatte 2003, Circulation 2013:127 e6-e245 Hussaini BE, Lu XG, Wolfe JA and Thatte S. Evaluation of endoscopic vein extraction on structural and functional viability of saphenous vein endothelium. J Cardiothorac Surg 2011; 6:82-90*). Do đó, dữ liệu *ex vivo* đã thể hiện rằng việc bảo quản ống mạch có thể được thực hiện thông qua việc sử dụng GALA™ làm dung dịch bảo quản ống mạch. Tuy nhiên, dung dịch đã nêu có thời hạn sử dụng hạn chế do tính bất ổn định của dung dịch.

Do đó, vẫn có nhu cầu về các dung dịch cải tiến của dung dịch bảo quản cơ quan và mô GALA để cải thiện độ ổn định và thời hạn sử dụng của dung dịch này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế được tạo ra dựa vào nhận thức rằng độ ổn định của chế phẩm GALA, có thể được cải thiện bằng cách phân tách chế phẩm thành dung dịch A có độ pH ít nhất là 7, thường là 7,4-8 và dung dịch B có độ pH thấp hơn 7, thường là thấp hơn. Dung dịch A chứa dung dịch muối cân bằng. Dung dịch B chứa nước, chất chống oxy hóa như axit ascorbic, tác nhân khử, cụ thể là L-glutathion, chất nitơ oxit như L-Arginin và đường, như D-glucoza. Dung dịch này được giữ ở độ pH thấp hơn 7, tốt hơn là 5, 4 hoặc 3, và tốt hơn là chứa hàm lượng oxy ở mức không phần triệu. Theo phương án khác của sáng chế, các dung dịch A và B được bào chế như nêu trên, ngoại trừ rằng đường được bổ sung vào dung dịch A và không được bổ sung vào dung dịch B. Cũng như thế, trong chế phẩm khác, erythropoietin (EPO) có thể được bổ sung, tốt hơn là vào dung dịch B.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là hình vẽ phối cảnh của túi nhiều ngăn để sử dụng theo sáng chế;

FIG. 2 là hình vẽ phối cảnh của kit có ngăn thứ nhất và ngăn thứ hai để sử dụng

theo sáng chế;

Các hình vẽ từ FIG. 3A và FIG. 3B là sơ đồ biểu thị nồng độ theo thời gian ở điều kiện bảo quản gia tăng chứa glutathion, axit ascorbic và Arginin;

FIG. 4 là hai sơ đồ biểu thị tỷ lệ thoái hóa của L-glutathion trong dung dịch B; và

Các hình vẽ từ FIG. 5A-FIG. 5D là sơ đồ biểu thị phương pháp thực hành sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được quy định theo cách khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả có thể được dùng để thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả. Nhằm mục đích theo sáng chế, các thuật ngữ sau được định nghĩa dưới đây.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh nhân" bao gồm các thành viên là động vật bao gồm nhưng không giới hạn ở loài người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "cơ quan" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở tim, tĩnh mạch, động mạch, phổi, gan, tụy và thận. Các phần của cơ quan cũng được bao gồm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "nước tiết khuẩn" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở (a) nước tiết khuẩn để tiêm, theo USP, (b) nước cất khử khoáng tiết khuẩn, và (c) nước tiết khuẩn để tưới.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "hiện tượng liệt tim" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở mất chức năng của tim.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "mất nhiệt trung bình" là khoảng từ 10°C-21 °C.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "chất chống oxy hóa" là chất mà, khi có mặt trong hỗn hợp hoặc cấu trúc chứa phân tử sinh học có khả năng oxy hóa, làm chậm hoặc ngăn ngừa oxy hóa của phân tử chất sinh học. Ví dụ, axit ascorbic là chất chống oxy hóa.

"Dung dịch muối cân bằng" được xác định là dung dịch nước mà được cân bằng

thẩm thấu để ngăn ngừa các tổn thương tế bào hoặc mô cấp tính.

"Dung dịch muối cân bằng" được xác định là dung dịch muối cân bằng mà các chất hóa học được bổ sung vào đó để duy trì được khoảng độ pH sinh lý đã định trước.

"GALA" được dùng để chỉ một kiểu dung dịch bảo quản mô chứa glutathion, axit ascorbic, L-Arginin và dung dịch muối cân bằng.

"Ghép" được xác định là khi mô được cấy ghép hoặc cấy vào một phần của cơ thể để sửa chữa một khiếm khuyết.

"Mạch bắc cầu thu gom" được xác định là khi một con đường khác được xác lập nhờ phẫu thuật để dẫn máu đi vòng qua nơi tắc nghẽn.

"Dung dịch làm liệt tim" được xác định là dung dịch hỗ trợ cho việc bảo quản của tim trong khi vận chuyển hoặc vận chuyển.

"Tác nhân khử tế bào" được xác định là chất mà dễ làm mất điện tử, do đó gây khử hóa học cho các chất khác.

"Tác nhân khử" là axit hoặc bazơ được sử dụng để duy trì độ axit (pH) của dung dịch gần với giá trị được chọn. Các tác nhân khử được ưu tiên sử dụng để tạo ra dung dịch theo sáng chế là HCl 4N và NaHCO₃ 84%.

Dung dịch đẳng trương được dùng để chỉ hai dung dịch có cùng áp suất thẩm thấu để đi qua màng bán thấm. Dung dịch đẳng trương là dung dịch có cùng nồng độ muối như tế bào.

Dung dịch sinh lý được xác định là dung dịch mà tương thích với mô bình thường, nhờ đẳng trương với dịch kẽ bình thường.

Sáng chế đề xuất chế phẩm bảo quản mô kiểu GALA bao gồm hai dung dịch, dung dịch A và dung dịch B có độ ổn định cao bất ngờ so với dung dịch bảo quản mô có một dung dịch kiểu GALA đã có.

Theo sáng chế, dung dịch thứ nhất, hoặc dung dịch A bao gồm dung dịch muối cân bằng. Dung dịch muối cân bằng bao gồm nước và muối chấp nhận được về mặt sinh lý. Dung dịch muối cân bằng thông thường sẽ bao gồm nước, ion canxi, ion clorua, ion kali, ion phosphat, ion magie và ion natri.

Dung dịch muối cân bằng chứa muối được chọn từ nhóm sau: canxi clorua dihydrat, kali clorua, kali phosphat một gốc bazơ, magie clorua hexahydrat, magie sulfat heptahydrat, natri clorua, natri bicacbonat, natri phosphat hai gốc bazơ heptahydrat và tổ

hợp của chúng. Dung dịch muối cân bằng được đề xuất ở nồng độ mà sẽ tạo ra dung dịch đẳng trương khi dung dịch thứ nhất và thứ hai được kết hợp với nhau. Theo một phương án tiêu biểu, dung dịch muối cân bằng chứa khoảng 0,14 g/l canxi clorua dihydrat, khoảng 0,4 g/l kali clorua, 0,06 g/l kali phosphat một gốc bazơ, khoảng 0,1 g/l magie clorua hexahydrat, khoảng 0,1 g/l magie sulfat heptahydrat, khoảng 8 g/l natri clorua, khoảng 0,36 g/l natri bicacbonat, và khoảng 0,03 g/l natri phosphat hai gốc bazơ heptahydrat.

Thành phần của dung dịch A được hòa tan cùng với nhau trong nước và độ pH của dung dịch thu được được điều chỉnh đến khoảng 7,4 – 8,0 bằng cách bổ sung bazơ, như natri bicacbonat.

Tùy ý là, dung dịch A có thể chứa chất chống viêm không steroid như aspirin, naproxen và ibuprofen. Tùy ý là, các thuốc gây tê cục bộ có thể được bổ sung, tốt hơn là trong dung dịch A hoặc, theo cách khác, thuốc gây tê cục bộ có thể được bổ sung tại thời điểm sử dụng. Các ví dụ về thuốc gây tê cục bộ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở lidocain, articain/epinphrin, mepivacain, bupivacain, ropivacain và cloroprocain.

Theo sáng chế, các thành phần sau của GALA sẽ nằm trong dung dịch thứ hai, hoặc dung dịch B: Glutathion khử, tác nhân khử như axit ascorbic; đường như D-Glucoza, L-Arginin, tác nhân khử, và nước mà đã được sục khí trơ, như argon, để loại bỏ oxy gần như tan hoàn toàn (tốt hơn là đến mức ít hơn 0,1 ppm). Độ pH của dung dịch B thu được thấp hơn 7 và thường từ 3 đến 5. Theo cách khác, xysteinyglyxin có thể thay thế cho Glutathion khử hoặc hỗn hợp gồm xysteinyglyxin và Glutathion khử có thể có mặt trong dung dịch B. Trong dược phẩm được ưu tiên nhất, độ pH của dung dịch A là 8,0 và độ pH của dung dịch B là khoảng 3,0.

Cụ thể hơn, dung dịch B là dung dịch có các thành phần hữu cơ nằm trong vật chứa riêng biệt với dung dịch A và bao gồm L-glutathion, L-Arginin, axit L-ascorbic, D-glucoza và H₂O để tiêm ở độ pH 3,0 -5,0. Các đường khác mà có thể được sử dụng thay cho glucoza là đường bất kỳ nhưng tốt hơn là monosacarit bao gồm nhưng không giới hạn bởi fructoza, mannoza và riboza. Khi các dung dịch A và B được phối trộn tại thời điểm sử dụng, độ pH của dung dịch phối trộn là $7,3 \pm 0,4$. Độ pH của các dung dịch A và B có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng nhiều tác nhân khử đã biết. Các tác nhân khử được ưu tiên là HCl 4N và NaHCO₃ 84%. Trong chế phẩm được ưu tiên, độ pH của dung dịch A là khoảng 7,8 và độ pH của dung dịch B là khoảng 4,0. Trong chế phẩm được ưu tiên, độ pH của dung dịch A là 8,0 và độ pH của dung dịch B là 3,0.

Các muối trong dung dịch được dự định để đệm (duy trì độ pH) và duy trì độ đẳng trương đối với ống mạch. Các thành phần hữu cơ được dự định để duy trì khả năng đệm, độ thẩm thấu khác và để tạo ra môi trường không oxy hóa với ống mạch. Bốn thành phần hữu cơ; L-glutathion, axit L-ascorbic, L-Arginin và D-glucoza, là các thành phần thông thường của máu và có vai trò bảo quản và duy trì môi trường ngoại bào của ống mạch.

L-Glutathion và axit L-ascorbic là các chất chống oxy hóa mà ngăn ngừa tế bào khỏi bị tổn thương bằng cách xử lý các gốc tự do. Chức năng của các chất chống oxy hóa trong dung dịch bảo quản mô là, 1) làm ổn định các thành phần khác của dung dịch bằng cách ngăn ngừa sự oxy hóa, nhờ đó cải thiện độ ổn định và thời hạn sử dụng của sản phẩm và 2) để ngăn ngừa màng tế bào và cấu trúc nền ngoại bào không bị tổn thương do oxy hóa. Tổn thương do oxy hóa đã thể hiện là làm hỏng độ nguyên vẹn cấu trúc của cơ cấu ngoại bào, do đó gây ra phá vỡ lớp lót tế bào màng trong. Việc phá vỡ lớp lót tế bào màng trong là chỉ thị cho hiện tượng tổn hại mảnh ghép mạch. Đường được dự định để tạo ra nguồn năng lượng cho cơ quan hoặc mô.

Khi dung dịch A được kết hợp với dung dịch B, nồng độ của L-arginin nên nằm trong khoảng từ 250 μM đến khoảng 2000 μM . Nồng độ của glucoza nên nằm trong khoảng từ 50 mM đến khoảng 120 mM, nồng độ của L-glutathion từ 50 μM đến khoảng 2000 μM , và nồng độ của axit L-ascorbic từ 25 μM đến khoảng 1000 μM .

Chế phẩm thứ nhất hoặc thứ hai có thể tùy ý bao gồm chất chống đông với lượng đủ để ngăn ngừa cục máu bên trong hệ mạch của cơ quan hoặc mô. Chất chống đông tiêu biểu bao gồm heparin và hirudin, nhưng các chất chống đông khác như aspirin có thể được sử dụng. Chế phẩm theo phương án tiêu biểu chứa heparin với nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 50 đơn vị/mL đến khoảng 250 đơn vị/mL. Heparin cũng có thể được bổ sung riêng biệt sau khi kết hợp các dung dịch A và B và trước khi sử dụng.

Theo phương án tiêu biểu, tỷ lệ thể tích giữa dung dịch A và dung dịch B là khoảng 19:1. Ví dụ, theo một phương án, 950 ml dung dịch A được phối trộn với 50 ml dung dịch B để tạo ra chế phẩm cuối cùng bảo quản chức năng của cơ quan hoặc mô.

Nếu EPO được bổ sung vào dung dịch A hoặc B, nồng độ của EPO nên là khoảng 5 đơn vị/mL khi dung dịch A và dung dịch B được kết hợp.

Theo sáng chế, dung dịch bảo quản mô thay thế thứ hai chứa dung dịch A, mà chứa đường như glucoza, mannoza, fructoza hoặc tương tự, kết hợp với dung dịch muối

cân bằng ở độ pH từ 7,4 đến 8 và dung dịch thứ hai, dung dịch B, chứa glutathion khử, axit ascorbic, L-Arginin, tác nhân khử trong nước ở độ pH thấp hơn 7, thường là 5, 4 hoặc 3, mà có thể được bảo quản trong môi trường không chứa oxy.

Thông thường, dung dịch A hoặc dung dịch B trong phương án bất kỳ sẽ chứa các thành phần hữu cơ khác mà không phải là thành phần đã nêu trên, vì chúng không cần thiết và làm tăng chi phí sản xuất. Cụ thể là, hợp chất hữu cơ mà không phải là loại đã nêu trên được tìm thấy trong các kiểu dung dịch bảo quản mô khác, sẽ không được chứa trong dung dịch A hoặc B, để làm giảm chi phí đến mức tối thiểu và làm giảm tác dụng phụ có thể xảy ra, mà gây hại đến sản phẩm cuối cùng.

Quy trình sản xuất rất phức tạp, và được thực hiện trong điều kiện cGMP. Sản phẩm được tiệt khuẩn bằng quy trình nạp vô khuẩn và thử nghiệm độ ổn định đề xuất thời hạn sử dụng ít nhất là 2 năm.

FIG. 1 và FIG. 2 thể hiện các phương án tiêu biểu về kit hoặc vật chứa được sử dụng để vận chuyển, bảo quản và cuối cùng là sử dụng dung dịch bảo quản mô theo sáng chế. Đây là phương án tiêu biểu và vật chứa khác có thể được sử dụng để tạo ra các dung dịch A và B riêng biệt mà được phối hợp tại thời điểm sử dụng để bảo quản mô.

FIG. 1 thể hiện túi 10 có hai ngăn 12 và 14 được ngăn cách với nhau hoặc gắn với nhau bằng kẹp 16. Ngăn 12 chứa dung dịch A và ngăn 14 chứa dung dịch B. Khi loại bỏ kẹp 16, các ngăn 12 và 14 trở thành một ngăn của túi 10 và dung dịch A phối trộn với dung dịch B tạo thành dung dịch bảo quản cơ quan và mô đầy đủ trong túi 10. Xem Patent Mỹ số 5,257,985.

FIG. 2 biểu thị kit bảo quản cơ quan và mô 20 có hai vật chứa 22 và 24. Dung dịch A được chứa trong vật chứa 22 và dung dịch B được chứa trong vật chứa 24. Tại thời điểm sử dụng, các thành phần trong vật chứa 24 có thể được đổ vào vật chứa 22 hoặc các chất chứa trong cả hai vật chứa 22 và vật chứa 24 có thể được đổ vào chậu hoặc bát mà động mạch hoặc tĩnh mạch có thể được đặt vào đó để tạo ra dung dịch bảo quản cơ quan và mô đầy đủ.

Theo phương án được ưu tiên như được thể hiện trên FIG. 2, dung dịch A được nạp tiệt khuẩn vào chai Nalgene đã được tiệt khuẩn từ trước, mà sau đó được đóng kín bằng nút vận HDPE đã được tiệt khuẩn trước.

Dung dịch B được nạp tiệt khuẩn vào lọ thủy tinh borosilicat đã được tiệt khuẩn

trước, kiểu I, mà được đóng kín bằng màng ngăn Stelmi đã được tiệt khuẩn trước, mà được giữ tại vị trí bằng nút bật ra được. Nút bật ra được được gắn vào chai bằng cách sử dụng quy trình gắn hiệu chuẩn theo hướng dẫn gắn được nhà sản xuất khuyến cáo. Chai B có thể được khử khí bằng khí Argon trong quá trình phối trộn và nạp để làm giảm khi oxy có mặt nhưng bước này có thể không cần thiết.

Sau đó, chai chứa dung dịch A và chai chứa dung dịch B được đặt vào trong hộp đã in trước làm bằng bìa cac tong. Tờ hướng dẫn cũng được đặt vào hộp vào thời điểm này. Sau đó, hộp được đóng kín và dán nhãn để phân phối.

Tại thời điểm sử dụng, dung dịch A & B được kết hợp với nhau để hoàn thành dung dịch C cuối cùng của GALA và độ pH sẽ được điều chỉnh đến khoảng $7,3 \pm 0,4$. Nếu độ pH của dung dịch A là 8,0, độ pH của dung dịch B sẽ là khoảng 3,0. Nếu độ pH của dung dịch A là 7,8, độ pH của dung dịch B sẽ là khoảng 4,0. Và, nếu độ pH của dung dịch A là 7,6, độ pH của dung dịch B sẽ là khoảng 5,0.

Sau đây là quy trình được đề nghị để thực hành sáng chế.

Để dung dịch 22 và 24 ấm đến nhiệt độ xung quanh hoặc trong phòng. Trước khi sử dụng, kiểm tra mỗi vật chứa 22 và 24 xem có bị rò rỉ bằng cách kiểm tra bộ phận bịt kín. Nếu tìm thấy lỗ rò rỉ, vứt bỏ vật chứa dung dịch. Quan sát bằng mắt thường xem dung dịch có vật chất dạng hạt. Không sử dụng dung dịch nếu thấy rõ ràng có vật chất dạng hạt, khối kết tụ, hoặc tạp nhiễm trong dung dịch. Ngay trước khi sử dụng, thực hiện các bước sau:

Rót toàn bộ thành phần trong dung dịch A ra khỏi lọ 22 vào vật chứa vô khuẩn 26 (ví dụ khay, cốc hoặc chậu nhỏ) nơi mà ống mạch 32 cần được bảo quản trước khi ghép, như được thể hiện trên FIG. 5A.

Dùng xilanh vô khuẩn 28 lấy theo cách vô khuẩn 12,5 ml dung dịch B ra khỏi lọ 24 và cho vào vật chứa 26 chứa dung dịch A (FIG. 5B) để tạo thành dung dịch GALA 34.

Bổ sung 12500 đơn vị heparin vào vật chứa 26 chứa các dung dịch A và B như được thể hiện trên FIG. 5C.

Phối trộn bằng cách khuấy nhẹ nhàng vật chứa 26.

Dung dịch được sử dụng để sục ống mạch đã phân tách 32 ngay sau khi lấy ra từ bệnh nhân. Các dung dịch A và B phối trộn cũng có thể may được sử dụng kết hợp với

xi lanh để đưa áp suất thủy tĩnh đến ống mạch nhằm kiểm tra độ rò rỉ của ống trước khi bảo quản trong dung dịch. Sau đó, ống mạch 32 được bảo quản trong dung dịch phối trộn 34 trong vật chứa 26 đến khi ống mạch có thể được ghép vào bệnh nhân.

Dung dịch, thiết bị, và phương pháp tưới máu theo sáng chế không bị giới hạn ở việc sử dụng cho mô, cơ quan hoặc kiểu tế bào cụ thể. Ví dụ, sáng chế có thể được sử dụng cho thu gom tĩnh mạch nổi, thượng vị động mạch, động mạch dạ dày và động mạch quay được sử dụng trong việc ghép bắc cầu vành (CABG). Sáng chế cũng có thể được sử dụng để duy trì cơ quan và mô trong phẫu thuật ghép. Sáng chế không bị giới hạn ở cơ quan hoặc mô cụ thể bất kỳ. Ví dụ, được dự định rằng cơ quan hoặc mô có thể là tim, phổi, thận, não, máu, tiểu cầu, mảnh ghép cơ, da, ruột, xương, phần phụ, mắt, vân vân hoặc các phần của chúng. Ngoài ra, sáng chế có thể được sử dụng làm chất bảo quản cơ quan hoặc mô in situ. Được dự tính là dung dịch theo sáng chế được sử dụng để rửa và ngâm các mô và cơ quan mà vẫn chưa tách rời khỏi bệnh nhân. Ví dụ, được dự tính là sáng chế được sử dụng trong hiện tượng liệt tim. Cũng được dự tính là sáng chế được sử dụng, ví dụ, trong các thủ thuật cấp cứu khi cơ quan hoặc mô có thể cần được ngâm để bảo quản nó đến khi phẫu thuật hoặc thực hiện các thao tác y tế khác. Về nội dung này, dung dịch có thể được tạo ra để chờ sẵn cho túi y tế cấp cứu cả ở bệnh viện và "khi ở hiện trường" (nghĩa là, trong xe cấp cứu hoặc ở cơ sở y tế cấp cứu tạm thời).

Dung dịch GALA (các dung dịch A và B phối hợp) cũng có thể được sử dụng làm dung dịch rửa trong phẫu thuật, cụ thể là phẫu thuật tạo hình hoặc phẫu thuật tái tạo. Phẫu thuật này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở hút mỡ, tạo hình ngực, mổ vú hoặc các thủ thuật khác trong đó cần có dung dịch đẳng trương, cân bằng độ pH như GALA. Dung dịch GALA cũng có thể được sử dụng để xả hoặc tráng rửa máy thẩm phân bằng cách sử dụng quy trình của nhà sản xuất để xả hoặc tráng rửa. Dung dịch GALA cũng có thể được sử dụng cùng với giá đỡ bên ngoài tĩnh mạch. Ví dụ về giá đỡ này là hệ giá đỡ ngoài mạch Vest™ được Vascular Graft Solutions ở Tel-Aviv, Israel phát triển.

Các thành phần của của dung dịch bảo quản cơ quan và mô cũng có thể được đưa vào gel, kem, hoặc hydrogel. Ví dụ về hydrogel được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,339,074.

Bảng 1 dưới đây biểu thị một phương án theo sáng chế trong đó độ pH của dung dịch A là khoảng 8,0 và độ pH của dung dịch B là khoảng 3,0.

Bảng 1

Thành phần định tính & định lượng của các dung dịch A và B theo một phương án

Thành phần	*Nồng độ ($\pm 5\%$)		
Dung dịch A	g/L	g/237,5mL	mM
Canxi clorua dihydrat	0,147	0,035	1,326
Kali clorua	0,421	0,100	5,653
Kali phosphat một gốc bazơ	0,063	0,015	0,463
Magie sulfat heptahydrat	0,105	0,025	0,432
Magie clorua hexahydrat	0,105	0,025	0,516
Natri clorua	8,421	2,000	144,100
Natri bicacbonat	0,379	0,090	4,390
Natri phosphat hai gốc bazơ khan	0,028	0,007	0,200
Nước để tiêm	vừa đủ đến 1L	vừa đủ đến 237,5mL	-
Natri bicacbonat 1,0M/HCl 1,0M	Điều chỉnh độ pH đến 8,0		
Thành phần	*Nồng độ ($\pm 5\%$)		
Dung dịch B	g/L	g/12,5mL	mM
L-Glutathion	6,200	0,078	20,200
D-Glucoza	20,000	0,25	111,000
L-Arginin	3,000	0,038	17,200
Axit L-Ascorbic	1,800	0,023	10,200
Nước để tiêm	vừa đủ đến 1L	vừa đủ đến 12,5mL	-
Natri bicacbonat 1,0M/HCl 1,0M	Điều chỉnh độ pH đến 3,0		

Thành phần của dung dịch A và dung dịch B phối hợp được nêu trong Bảng 2.

Bảng 2

Thành phần định tính và định lượng của dung dịch A & B phối hợp

Thành phần	*Nồng độ ($\pm 5\%$)		
	g/L	g/237,5mL	mM
Dung dịch A + B			
Canxi clorua dihydrat	0,14	0,0348	1,26
Kali clorua	0,40	0,0998	5,37
Kali phosphat một gốc bazơ	0,06	0,0148	0,44
Magie sulfat heptahydrat	0,10	0,0248	0,41
Magie clorua hexahydrat	0,10	0,0248	0,49
Natri clorua	8,00	1,9998	136,89
Natri bicacbonat	0,36	0,0900	4,17
Natri phosphat hai gốc bazơ khan	0,026	0,0065	0,187
L-Glutathion	0,31	0,0775	1,01
D-Glucoza	1,00	0,2500	5,55
L-Arginin	0,15	0,0375	0,86
Axit L-Ascorbic	0,09	0,0225	0,51
Khoảng độ pH sau khi phối trộn A và B	$7,3 \pm 0,4$		

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được dùng để minh họa sáng chế, nhưng không hạn chế sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1

Tạo ra nhiều lô mẫu dung dịch A và dung dịch B. 21 loạt vật chứa các dung dịch A và B được lấy từ ba lô mẫu riêng biệt được đặt vào ngăn độ ổn định chất lượng được giữ ở 40°C với độ ẩm tương đối là 75%. Vật chứa dung dịch được lấy từ mỗi lô mẫu được lấy và thử nghiệm định kỳ trong các điều kiện gia tăng. Kết quả của số liệu này được ngoại suy để xác định thời hạn sử dụng của sản phẩm, mà được bảo quản ở 2-8°C. Việc xác định thời hạn sử dụng là cơ sở đánh giá thời gian tối thiểu mà dung dịch sản phẩm vẫn duy trì được các giá trị mô tả đã thiết lập. Độ pH, độ thẩm thấu và khả năng dẫn truyền của các dung dịch A và B đã được nghiên cứu. Tám muối vô cơ tạo thành dung dịch A đều trở và ổn định trong môi trường nước trong thời gian kéo dài.

Hai thành phần của dung dịch B, L-Arginin và D-glucoza, cũng được phát hiện thấy là ổn định trong thời gian dài ở độ pH là 3. Vì thế, khi tất cả các giá trị mô tả còn lại đều đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận được, hai thành phần ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng

của thời hạn sử dụng của sản phẩm là axit L-ascorbic và L-glutathion do đặc tính chống oxy hóa của chúng.

Cơ sở hợp lý cho đặc tính hạn chế độ ổn định tổng thể là để dung dịch duy trì các điều kiện cần thiết cho môi trường khử tổng thể. Khi dung dịch ngừng mang lại lợi ích này, dung dịch này không thuộc phạm vi bản mô tả. Môi trường khử được tạo ra khi một số L-glutathion và axit L-ascorbic khử, tuy nhỏ, nhưng vẫn duy trì trạng thái khử của chúng ở tình trạng oxy hóa, cân bằng và dung dịch. Nói cách khác, miễn là mỗi thành phần L-glutathion và axit L-ascorbic vẫn còn ở trên giới hạn có thể phát hiện được của phương pháp phân tích.

Số liệu thu được trong khi bảo quản dung dịch ở 40°C được ngoại suy đến nhiệt độ bảo quản dung dịch trung bình là 5°C bằng cách sử dụng yếu tố Q10 của 2. Dựa vào phép ngoại suy này, dự đoán được rằng độ ổn định của dung dịch B khi bảo quản là khoảng 900 ngày, mang lại thời hạn sử dụng ít nhất là hai năm, vượt xa tiêu chuẩn yêu cầu trong lĩnh vực công nghiệp và vượt xa độ ổn định của các chế phẩm hiện tại. Số liệu thô thu được thể hiện nồng độ glutathion được biểu thị trên FIG. 3A và nồng độ theo thời gian của axit ascorbic và Arginin được nêu trong FIG. 3B.

Ví dụ 2

Theo quy tắc Q10, mối liên quan giữa hằng số tốc độ, nhiệt độ, và thời hạn sử dụng có thể được biểu thị là:

$$Q10 = \left(\frac{k_2}{k_1}\right)^{\frac{10}{T_2-T_1}} \text{ hoặc } \frac{k_2}{k_1} = Q10^{\frac{T_2-T_1}{10}} \text{ hoặc } \frac{SL_1}{SL_2} = Q10^{\frac{T_2-T_1}{10}}$$

Khi k_1 và k_2 là hằng số tốc độ ở nhiệt độ T_1 và T_2 với thời gian sử dụng là SL_1 và SL_2 . Giá trị của hệ số nhiệt độ Q10, phụ thuộc vào năng lượng của việc hoạt hóa E_a cho phản ứng. Do đó, Q10 có thể được tính bằng cách sử dụng thuật toán nêu trên nếu hằng số tốc độ đã được biết cho ít nhất hai nhiệt độ khác nhau. Các giá trị Q10 thường là 2, 3, hoặc 4 phụ thuộc vào liệu các giá trị thời gian bảo quản mong muốn có lần lượt là a) bảo toàn, b) có thể có và hợp lý, hoặc c) kém bảo toàn nhưng vẫn có thể có. Theo quy tắc ngón tay cái, Q10 của 2 tương ứng với E_a là 12,2 kcal/mol, 3 tương ứng với E_a là 19,4 kcal/mol, và 4 tương ứng với E_a là 24,5 kcal/mol.

Trong giai đoạn sớm khi mới đăng ký lưu hành sản phẩm, nếu chưa có số liệu được động học phụ thuộc nhiệt độ chi tiết, cần phải dự tính thời hạn sử dụng. Do đó, năng

lượng hoạt hóa thấp A của phản ứng phân hủy được giả định là có giá trị Q10 là 2 để xác định thời hạn sử dụng ước tính của sản phẩm. Theo quy tắc này, tốc độ phản ứng sẽ gần như tăng gấp đôi cứ mỗi khi tăng nhiệt độ bảo quản thêm 10 độ giả định cho “năng lượng hoạt hóa có thể có nhất” của phản ứng.

Hằng số tốc độ bậc một để phân hủy L-glutathion trong dung dịch B ở nhiệt độ 40°C được xác định là 0,0643 ngày⁻¹ trong các nghiên cứu gia tăng trên hai lô mẫu dung dịch B— một lô mẫu có chứa Argon trong khoảng trống và lô còn lại không chứa Argon. Các đặc tính này được nêu trên FIG. 4. Hàm phân rã lũy thừa bậc một được biểu thị trên sơ đồ bên dưới, và sơ đồ logarit tuyến tính tương ứng được biểu thị trên sơ đồ ở trên cùng. Ngoài ra, ở nhiệt độ này (40°C) đặc điểm mô tả của sản phẩm đối với L-glutathion đã đạt đến gipis hạn sử dụng trong khoảng 73 ngày. Bằng cách sử dụng các lập luận trong thuật toán nêu trên, thời hạn sử dụng ước tính khi bảo quản ở 5°C có thể được ước tính bằng cách ngoại suy bằng cách sử dụng giá trị Q10 là 2 như sau:

$$\text{Thời hạn sử dụng @5°C} = 73 * 2^{\frac{(40-5)}{10}} = 73 * 2^{3,5} \approx 800 \text{ ngày} \approx 27 \text{ tháng}$$

Do đó, từ tính toán này, có thể suy ra rằng ở giá trị tối thiểu, thời hạn sử dụng của dung dịch B có thể được dự đoán là 27 tháng khi sản phẩm được bảo quản ở nhiệt độ 5°C.

Tuy nhiên, các nghiên cứu về thời gian thực chi tiết của độ ổn định của ba lô mẫu GMP của dung dịch B ở nhiệt độ 2-8°C sau 15 tháng thu gom số liệu, lại gợi ý rằng thời hạn sử dụng 27-tháng dự tính được từ các nghiên cứu tăng cường có thể quá dè dặt và yếu tố Q10 thực tế là 2,94.

Các nghiên cứu về thời gian thực chi tiết của độ ổn định ở nhiệt độ 5°C đã được thực hiện khoảng một năm trở lại đây. Số liệu động học trong 12-15 tháng đã có về sự phân hủy L-glutathion thu được từ các lô mẫu này có thể được điều chỉnh theo động học phản ứng bậc một với hằng số tốc độ là khoảng $1,40 \times 10^{-3}$ ngày⁻¹. Ở các tốc độ này, các đặc điểm mô tả của sản phẩm đối với L-glutathion đạt đến ngưỡng thời hạn sử dụng trong khoảng 100 tháng. Ngạc nhiên là, thời hạn sử dụng xác định được trên cơ sở các nghiên cứu tăng cường ở 40°C bằng cách sử dụng kỹ thuật ngoại suy Q10 là ngắn hơn đáng kể (27 tháng) so với thời hạn theo gợi ý từ số liệu thời gian thực thực tế. Sự khác biệt này có thể có căn cứ hợp lý dựa vào giả định được tạo ra trong khi ngoại suy Q10 như mô tả dưới đây.

Tốc độ phân hủy quan sát được của L-glutathion trong dung dịch B trong các điều kiện tăng cường là nhiệt độ 40°C/ độ ẩm tương đối 75% trong thời gian 65 ngày được thể hiện trên FIG. 4. Quan sát thấy các xu hướng tương tự đối với một số lô mẫu khác của dung dịch B. Trong tất cả các trường hợp, tốc độ phản ứng chỉ là lũy thừa cơ số (bậc một) ám chỉ rằng thời gian trôi qua đồng đều sẽ tạo ra mức giảm phân đoạn đồng đều của nồng độ chất phân tích, trong trường hợp này là nồng độ của L-glutathion, trong khoảng thời gian nghiên cứu. Các hằng số tốc độ ở cả nhiệt độ 40°C và 5°C của cả 11 lô mẫu đã nghiên cứu được nêu trong Bảng 3. Các giá trị của số mũ trong phương trình được lấy từ phép khớp lũy thừa là hằng số tốc độ bậc một k_1 (tính theo đơn vị ngày⁻¹). Các giá trị này cũng được biểu thị trong Bảng 3 tại mỗi nhiệt độ được nghiên cứu.

Giá trị được lấy theo kinh nghiệm là 2,94 đối với hệ số nhiệt độ Q10 là cao hơn giá trị là 2 được sử dụng trong các phép tính khác về thời hạn sử dụng. Giá trị Q10 = 2 thể hiện ước tính rất dè dặt về thời hạn sử dụng thu được từ năng lượng hoạt hóa tương đối thấp là 12 kcal/mmol. Theo cách khác, năng lượng hoạt hóa cao hơn là 19 kcal/mmol với giá trị Q10 = 2,94 có nghĩa là tốc độ phản ứng sẽ gần như cao gấp 3 cứ mỗi lần tăng 10 độ trong nhiệt độ bảo quản trong mối tương quan tỷ lệ nghịch với thời hạn sử dụng.

Với giá trị Q10 được điều chỉnh là 2,94 mà đại diện chính xác hơn cho năng lượng hoạt hóa thực là 19,0 kcal/mol đối với sự phân hủy L-glutathion, thời hạn sử dụng dung dịch B có thể được tính toán lại bằng cách ngoại suy số liệu thời hạn sử dụng ở 40°C và/hoặc được lấy trực tiếp từ phép khớp lũy thừa của số liệu thời gian thực là một năm ở nhiệt độ 5°C. Các giá trị điều chỉnh này được nêu trong Bảng 3.

Sự chênh lệch kết quả thu được nhờ hai các cách thức được minh họa trong phép so sánh các thời hạn sử dụng ở các nhiệt độ khác nhau nằm trong khoảng từ 5°C đến 60°C bằng cách ngoại suy số liệu lấy theo kinh nghiệm ở nhiệt độ 40°C bằng cách sử dụng các giá trị Q10 là 2 (dè dặt) và 2,94 (theo kinh nghiệm). Các kết quả này được thể hiện trong Bảng 4.

#	Bảng 3. Hằng số tốc độ & thời hạn sử dụng thu được từ các nghiên cứu độ ổn định						
	Khoảng trồng dung dịch B	[GSH] g/L	k1, ngày ⁻¹	Nhiệt độ °C	Thời hạn sử dụng, ngày		
					Ở 5°C*	Ở 20C*	Thực tế**
1	Thể tích/ Argon	6,2	0,00143	5	3220	639	3220
2	Thể tích/ Argon	6,4	0,00143	5	3220	639	3220
3	Thể tích/ Argon	6,4	0,00140	5	3290	653	3290
4	wo/ Argon	6,2	0,05937	40	3390	631	73
5	wo/ Argon	6,2	0,06465	40	3100	622	72
6	wo/ Argon	6,2	0,06465	40	3100	622	72
7	Thể tích/ Argon	6,2	0,06378	40	3130	622	72
8	Thể tích/ Argon	6,2	0,06465	40	3100	622	72
9	Thể tích/ Argon	6,2	0,06465	40	3100	631	73
10	Thể tích/ Argon	6,2	0,05780	40	3400	691	80
11	Thể tích/ Argon	6,2	0,05608	40	3400	709	82
được ngoại suy ở nhiệt độ từ 40°C đến 5°C và 20C bằng cách sử dụng quy tắc Q10 với giá trị Q10 là 2,94							
** Tiếp cận đường cong số liệu được tăng cường thực tế và thời gian thực 1% [GSH]							

Bảng 4. Thời hạn sử dụng ngoại suy của dung dịch B trên cơ sở các giá trị Q10 cũ (dề đặt) và mới (theo kinh nghiệm)		
Nhiệt độ bảo quản, °C	Thời hạn sử dụng ngoại suy, ngày	
	Q10 = 2	Q10 = 2,94
5	830	3300
20	290	640
25	200	367
40	73	73
50	35	23
60	18	7

Do đó, thời hạn sử dụng được cải thiện đáng kể bằng cách phân tách các thành phần của dung dịch GALA vào dung dịch muối cân bằng có độ pH cao hơn, mà tùy ý có thể chứa glucoza, và bảo quản các thành phần hữu cơ, cụ thể là L-arginin axit ascorbic và glutathion tùy ý với đường ở độ pH thấp hơn nhiều. Đã bất ngờ phát hiện ra rằng sự gia tăng độ ổn định glutathion khử cũng làm tăng độ ổn định của axit ascorbic và L-Arginin. Độ ổn định khi bảo quản của hai dung dịch đã vượt quá mong muốn hoặc nhu cầu trên thị trường, làm cho chế phẩm này có tính khả thi cao và thích hợp cho nhiều môi trường khác nhau. Điều này mang lại kết quả cuối cùng là cải thiện tính năng ghép, cải thiện sự sống tế bào của chất liệu được ghép.

Bản mô tả sáng chế này kèm theo phương pháp ưu tiên để thực hành sáng chế. Tuy nhiên, bản thân sáng chế chỉ được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit bảo quản cơ quan và mô bao gồm dung dịch nước thứ nhất (dung dịch A) được chứa trong vật chứa thứ nhất và dung dịch thứ hai (dung dịch B) được chứa trong vật chứa thứ hai, trong đó dung dịch nước thứ nhất bao gồm dung dịch muối cân bằng, và dung dịch thứ nhất này có độ pH ít nhất là 7,0; và trong đó dung dịch thứ hai bao gồm nước, glutathion khử, axit ascorbic, đường, L-Arginin và dung dịch thứ hai này có độ pH là 5,0 hoặc thấp hơn.
2. Kit theo điểm 1, trong đó các vật chứa thứ nhất và thứ hai là các ngăn thứ nhất và thứ hai bên trong một vật chứa đơn và các ngăn thứ nhất và thứ hai được cách biệt nhau bằng một bộ phận phân tách, trong đó khi loại bỏ bộ phận phân tách này, dung dịch thứ nhất sẽ phối trộn với dung dịch thứ hai để tạo thành dung dịch bảo quản cơ quan và mô hoàn chỉnh.
3. Kit theo điểm 1, trong đó độ pH của dung dịch thứ nhất là 7,8 và độ pH của dung dịch thứ hai là 4,0.
4. Kit theo điểm 1, trong đó độ pH của dung dịch thứ nhất là 7,6 và độ pH của dung dịch thứ hai là 5,0.
5. Kit theo điểm 1, trong đó các dung dịch thứ nhất và thứ hai được bào chế ở dạng gel, thuốc mỡ, thuốc xức hoặc hydrogel.
6. Phương pháp bào chế dung dịch bảo quản cơ quan hoặc mô bao gồm các bước:
bào chế các dung dịch thứ nhất và thứ hai như được xác định theo điểm 1; và
tại thời điểm sử dụng, phối trộn dung dịch thứ nhất với dung dịch thứ hai để tạo thành dung dịch kết hợp có độ pH là $7,3 \pm 0,4$.
7. Phương pháp *ex vivo* bảo quản cơ quan hoặc mô bao gồm bước tạo ra dung dịch bằng phương pháp theo điểm 6 và bước cho cơ quan hoặc mô tiếp xúc với dung dịch này.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó cơ quan hoặc mô được chọn từ nhóm bao gồm tĩnh mạch nổi, động mạch thượng vị, động mạch dạ dày, động mạch quay, tim, phổi, thận, não, mảnh cơ, da, ruột non, xương, phần phụ, mắt, và các phần của cơ quan hoặc mô này.
9. Kit theo điểm 1, trong đó độ pH của dung dịch thứ nhất là 8,0 và độ pH của dung dịch thứ hai là 3,0.
10. Kit theo điểm 1, trong đó dung dịch thứ hai tùy ý chứa xysteinyglyxin và trong đó

nước trong dung dịch thứ hai này đã được sục khí trơ để loại bỏ gần như hoàn toàn oxy hòa tan.

11. Kit theo điểm 10, trong đó dung dịch thứ hai có độ pH nằm trong khoảng từ 3,0 đến 5,0.

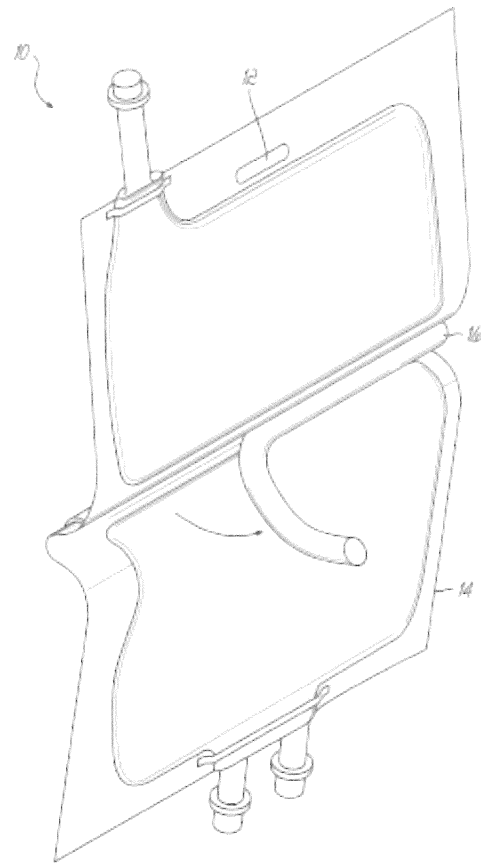


FIG. 1

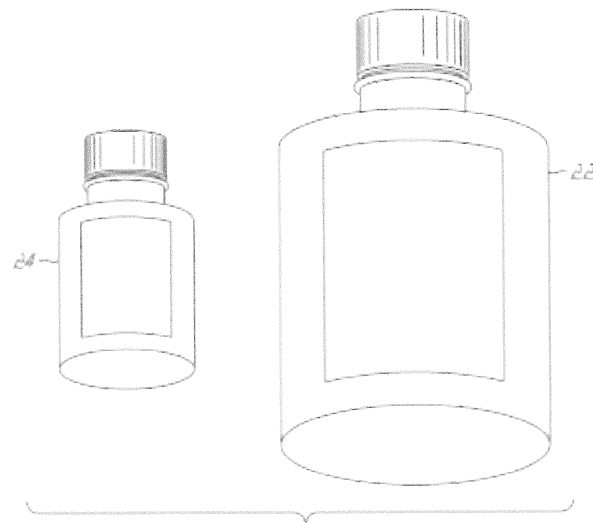


FIG. 2

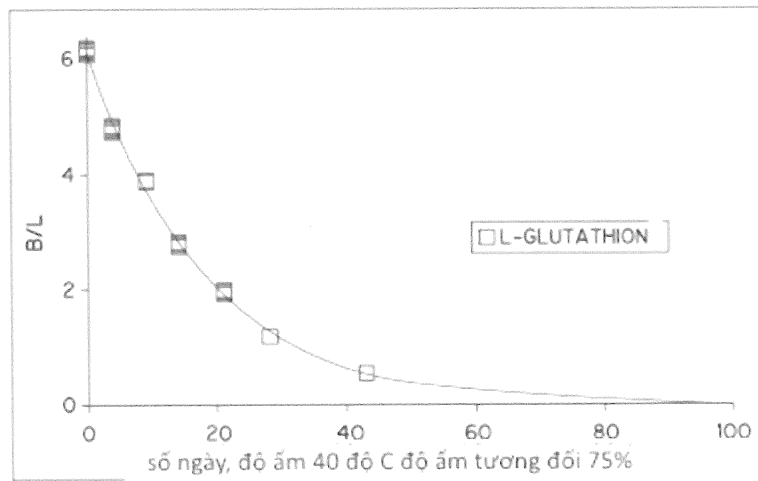


FIG. 3A

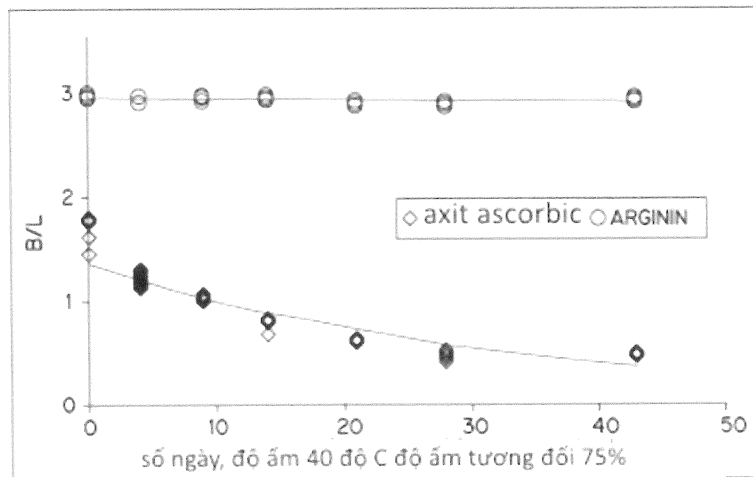


FIG. 3B

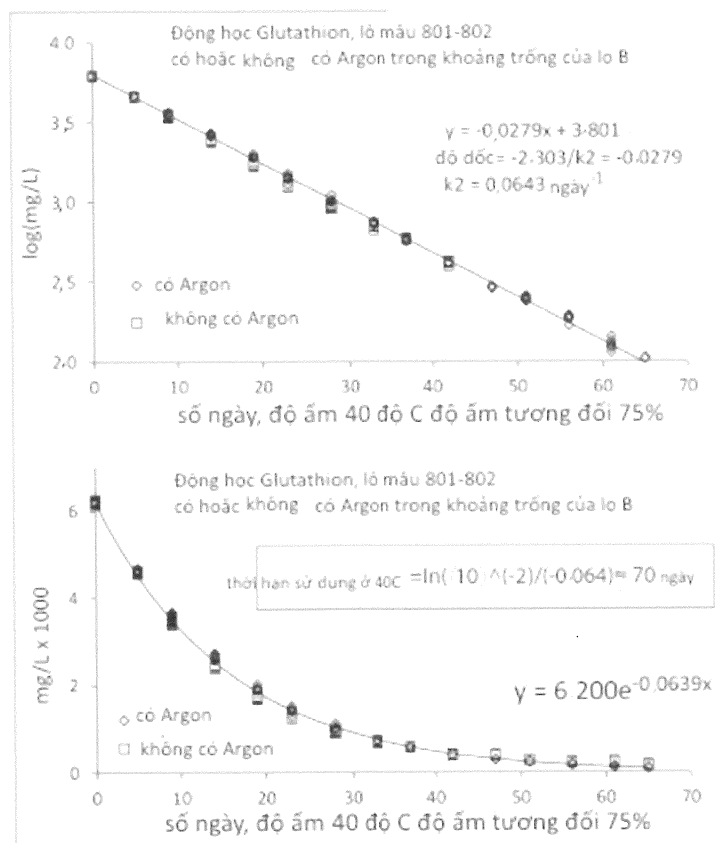


FIG. 4

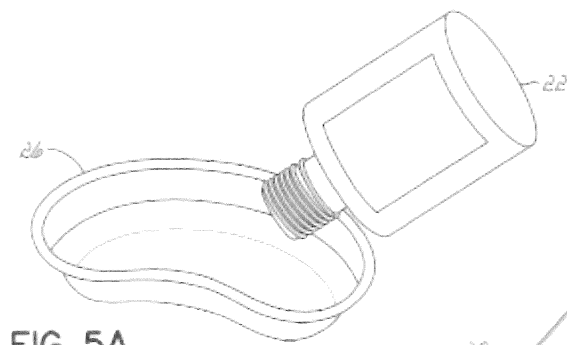


FIG. 5A

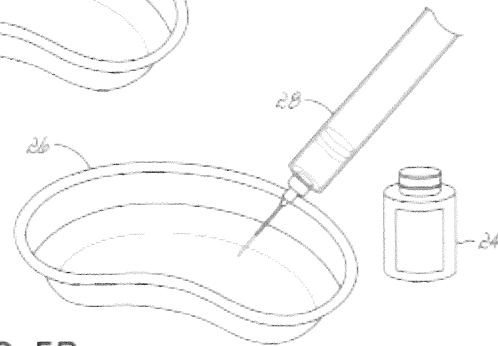


FIG. 5B

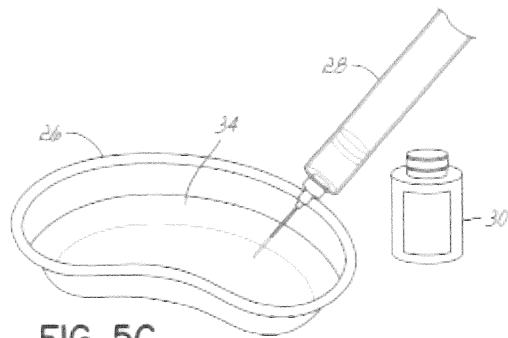


FIG. 5C

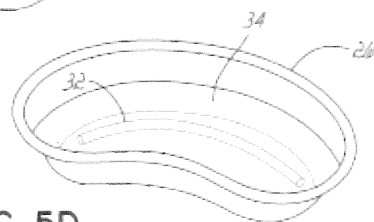


FIG. 5D