

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 963 557**

51 Int. Cl.:

A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2016** **PCT/US2016/030058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016** **WO16176559**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2016** **E 16787222 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023** **EP 3288602**

54 Título: **Armazones de fibra electrohilados multicomponentes**

30 Prioridad:

29.04.2015 US 201562154286 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.03.2024

73 Titular/es:

NFS IP HOLDINGS, LLC (100.0%)
5164 Blazer Pkwy
Dublin, OH 43017, US

72 Inventor/es:

JOHNSON, JED

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 963 557 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Armazones de fibra electrohilados multicomponentes

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad y beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/154,286 presentada el 29 de abril de 2015, titulada "Multi-Component Nanofiber Scaffolds,".

10 Antecedentes

Se gastan anualmente más de 25 mil millones de dólares en heridas agudas y crónicas que no cicatrizan, lo que ilustra una necesidad clínica no satisfecha de innovaciones eficaces y económicas en la curación de heridas. Sólo en la población diabética, el 25% de los pacientes desarrollará una úlcera en el pie que terminará con una amputación. Los

15 apósitos para heridas a base de células son prohibitivamente caros y, por lo tanto, a menudo no son una opción viable para pacientes con heridas que no cicatrizan.

Además de la necesidad de innovaciones en la cicatrización de heridas, existe la necesidad de injertos vasculares artificiales capaces de imitar eficazmente la mecánica de los vasos sanguíneos nativos, al mismo tiempo que promueven el crecimiento celular hacia el interior. Aproximadamente el 30% de todas las muertes en los Estados Unidos son el resultado de enfermedades cardiovasculares (ECV), y 1.4 millones de pacientes anualmente en los EE. UU. requieren prótesis arteriales. Los procedimientos de injerto de derivación vascular coronaria y periférica se realizan en aproximadamente 600.000 pacientes anualmente en los EE. UU., más comúnmente con la vena safena o la arteria mamaria interna. Aunque el uso de sustitutos vasculares autólogos ha tenido un impacto importante en el avance del

20 campo de la cirugía vascular reconstructiva, estas fuentes de tejido pueden ser inadecuadas o no estar disponibles en hasta el 20% de los pacientes debido a comorbilidades, y la replicabilidad de los injertos de donantes mayores es limitada. Además, su recolección añade tiempo, coste y potencial de morbilidad adicional al procedimiento quirúrgico.

De acuerdo con la American Society of Nephrology, más de 300,000 estadounidenses padecen enfermedad renal terminal (ESRD) y dependen de la diálisis artificial para sobrevivir. Las fístulas arteriovenosas (AV) se construyen comúnmente para crear un acceso vascular para hemodiálisis. Sin embargo, el fracaso del acceso es actualmente una de las principales causas de hospitalización de pacientes con ESRD. La infección y la trombosis temprana de los injertos sintéticos, tal como los hechos de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), y la hiperplasia de la íntima de las fístulas AV impiden que estos procedimientos tengan mejores tasas de éxito. Actualmente, se utilizan ePTFE,

30 tereftalato de polietileno (PET) y poliuretano (PU) para fabricar injertos vasculares sintéticos. Sin embargo, la formación de hiperplasia neointimal debido a la falta de endotelización, infección, trombosis y falta de coincidencia de distensibilidad con la vasculatura nativa son problemas con estos materiales sintéticos, y ninguno de estos materiales ha demostrado ser adecuado para generar injertos exitosos de menos de 6 mm de diámetro.

Hacer coincidir la distensibilidad del vaso nativo es un atributo crítico de un injerto vascular y requiere la capacidad de ajustar con precisión las propiedades mecánicas del injerto a las de la vasculatura nativa. La falta de coincidencia de distensibilidad entre el injerto y el vaso nativo altera el flujo sanguíneo, lo que da lugar a zonas de recirculación, separación del flujo y baja tensión de cizallamiento de la pared. La tensión de cizallamiento de la pared baja inicia la liberación de sustancias vasoactivas, la activación genética, la expresión de proteínas y el reordenamiento citoesquelético que estimulan la hiperplasia neointimal. Esto se considera una causa de fracaso tanto en los injertos de derivación autólogos como en los protésicos, aunque los injertos de vena safena también sufren de estenosis en

40 sitios alejados de la anastomosis.

Las fibras poliméricas pueden imitar la estructura física que se encuentra dentro del cuerpo y promover la remodelación celular y la curación de heridas. Los armazones compuestos por dichas fibras pueden ser eficaces tanto en aplicaciones de curación de heridas como de injertos vasculares.

50

El documento AU2009207489 divulga un armazón para la curación de heridas que comprende capas fibrosas electrohiladas. Las fibras de cada capa pueden estar alineadas o no; el diámetro de dichas fibras está entre

55 aproximadamente 1.2 y 4 micrómetros. La primera y la segunda capa están diseñadas para reabsorberse al mismo ritmo o a diferentes tasas; cada capa puede estar hecha de un material diferente, seleccionado de PCL, PLA, PGA, PDI, TMC y PEG. El armazón preferido está hecho de fibras PGA electrohiladas, cuyos diámetros se han adaptado para cambiar las tasas de degradación.

60 Resumen

En un primer aspecto de la invención se proporciona un armazón que comprende una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material que tiene una primera tasa de degradación, y una segunda fibra electrohilada polimérica que comprende un segundo material que tiene una segunda tasa de degradación diferente de la primera tasa de degradación, en donde el primer material es poliglicolida y el segundo material es poli(lactida-co-

65

caprolactona). En algunas realizaciones, la primera rata de degradación puede ser mayor o más rápida que la segunda rata de degradación.

5 En el presente documento se describe un armazón que comprende una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material que tiene una primera rata de degradación que corresponde sustancialmente a una rata de infiltración celular, y una segunda fibra electrohilada polimérica que comprende un segundo material que tiene una segunda rata de degradación más lenta que la primera rata de degradación.

10 En un segundo aspecto de la invención se proporciona un kit que comprende un armazón del primer aspecto y una bolsa sellable.

15 En un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un método para fabricar un armazón, comprendiendo el método electrohilar una primera fibra polimérica que tiene una primera rata de degradación expulsando una primera solución polimérica desde un primer sistema de inyección de polímero sobre un mandril, y electrohilar una segunda fibra polimérica que tiene una segunda rata de degradación diferente de la primera rata de degradación mediante expulsando una segunda solución polimérica desde un segundo sistema de inyección de polímero sobre el mandril, en donde el primer polímero es poliglicólico y el segundo polímero es poli(lactida-cocaprolactona). En algunas realizaciones, los pasos de electrohilado se pueden realizar simultáneamente.

20 En el presente documento se describe un método para mejorar la curación de heridas que puede comprender aplicar a una porción de una herida un armazón que comprende una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material que tiene una primera rata de degradación, y una segunda fibra electrohilada polimérica que tiene una segunda rata de degradación diferente de la primera rata de degradación.

25 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A ilustra una imagen con microscopio electrónico de barrido de tejido descelularizado.

30 La FIG. 1B ilustra una imagen de microscopio electrónico de barrido de una realización de un armazón de acuerdo con la presente divulgación. El armazón de la FIG. 1B comparte muchas similitudes microestructurales con el tejido descelularizado de la FIG. 1A.

Las FIGS. 2A-2F ilustran la curación de una herida sin armazón.

35 La FIG. 2A ilustra la herida el día 0.

La FIG. 2B ilustra la misma herida el día 7, con un cierre de la herida del 33 %.

40 La FIG. 2C ilustra la misma herida el día 14, con un cierre de la herida del 78 %.

La FIG. 2D ilustra la misma herida el día 21, con un cierre de la herida del 97 %.

La FIG. 2E ilustra la misma herida el día 28, con un cierre de la herida del 100 %.

45 La FIG. 2F ilustra la histología de la herida el día 28. La histología mostró una capa epidérmica incompleta con un espacio de aproximadamente 2/3 de la herida. La costra sobre la herida tenía abundantes neutrófilos y el tejido fibroso debajo de la herida era aproximadamente el doble de grueso que las capas fibrosas adyacentes. Había infiltración difusa de linfocitos subcutáneos de leve a moderada.

50 Las FIGS. 3A-3F ilustran la curación de una herida con una realización de un armazón aplicado el día 0, de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 3A ilustra la herida con el armazón el día 0.

55 La FIG. 3B ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 7, con un cierre de la herida del 28%).

La FIG. 3C ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 14, con un cierre de la herida del 96%).

60 La FIG. 3D ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 21, con un cierre de la herida del 100 %.

La FIG. 3E ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 28, con un cierre de la herida del 100 %.

65 La FIG. 3F ilustra la histología de la herida con el armazón el día 28. La histología mostró una capa epidérmica completa sobre el sitio de la herida con espesor y producción de queratina normales. El tejido fibroso debajo de la herida era aproximadamente el doble de grueso que las capas fibrosas adyacentes. Había infiltración difusa de linfocitos subcutáneos de leve a moderada.

Las FIGs. 4A-4F ilustran el proceso de curación de un caballo con una lesión grave en la pierna causada por un alambre de alta resistencia.

5 La FIG. 4A ilustra las heridas iniciales con alambre de alta resistencia en la cuartilla y el hueso del cañón.

La FIG. 4B ilustra ambas heridas completamente cicatrizadas 5 semanas después de aplicar un armazón de acuerdo con la presente divulgación.

10 La FIG. 4C ilustra la herida vascular en la cuartilla en el momento de la lesión.

La FIG. 4D ilustra la misma herida vascular en la cuartilla, cubierta con un armazón de acuerdo con la presente divulgación.

15 La FIG. 4E ilustra un vendaje de gasa de parafina sobre el armazón que cubre la herida de la cuartilla, de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 4F ilustra la curación de la herida de la cuartilla 4 semanas después de que se aplicó el armazón.

20 Las FIGs. 5A-5E ilustran el proceso de curación de un caballo con una gran laceración en el hombro y el torso causada por chocar contra un rastrillo de heno.

La FIG. 5A ilustra la laceración en el momento de la lesión.

25 La FIG. 5B ilustra la laceración en el momento de la lesión, con un armazón aplicado a la herida de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 5C ilustra la herida después de 4 semanas de curación, con evidencia de nuevo crecimiento del tejido de granulación.

30 La FIG. 5D ilustra la herida después de 2 meses (8 semanas) de curación, con evidencia de epitelización y crecimiento del cabello.

35 La FIG. 5E ilustra la herida después de 5 meses (20 semanas) de curación, con epitelización adicional y crecimiento del cabello.

Las FIGs. 6A-6F ilustran la histología de un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación, después de 1 mes *in vivo* en un modelo de rata. Las FIGs. 6A-6F también ilustran la regeneración de un nuevo vaso sanguíneo completo con íntima, media y adventicia.

40 La FIG. 6A ilustra la tinción con Tricromo de Masson, que demuestra remodelación activa de la ECM, deposición de colágeno y remodelación fisiológica.

45 La FIG. 6B es una imagen de luz polarizada de tinción con rojo picrosirio (PCR), que ilustra una deposición y organización robustas de colágeno y una maduración de fibras delgadas a gruesas.

La FIG. 6C ilustra la tinción de Van Geison (VVG) de Verhoeff, que demuestra la deposición y organización de elastina.

50 La FIG. 6D ilustra la tinción de Hart, lo que confirma los resultados de la tinción VVG.

La FIG. 6E ilustra la tinción con rojo de alizarina para la calcificación y no muestra ninguna calcificación ectópica apreciable.

55 La FIG. 6F ilustra la tinción de Von Kossa, que confirma la falta de calcificación.

Las FIGs. 7A-7F ilustran la histología de la vena cava inferior (IVC) de una oveja nativa.

La FIG. 7A ilustra la tinción H&E de la IVC nativa.

60 La FIG. 7B ilustra la tinción por PCR de la IVC nativa.

La FIG. 7C ilustra la tinción tricrómica de Masson de la IVC nativa.

La FIG. 7D ilustra la tinción de Hart de la IVC nativa.

65 La FIG. 7E ilustra la tinción del factor von Willebrand (vWF) del nativo

La FIG. 7F ilustra la tinción con actina de músculo liso (SMA) de la IVC nativa.

Las FIGs. 8A-8F ilustran la histología de un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación, después de 6 meses *in vivo* en un modelo de oveja. Las FIGs. 8A-8F se pueden comparar con la histología de la IVC de oveja nativa mostrada en las FIGs. 7A-7F.

La FIG. 8A ilustra la tinción H&E del injerto vascular, lo que demuestra la degradación del armazón polimérico y la formación de neot Tejido fino que imita la IVC nativa.

La FIG. 8B ilustra la tinción por PCR del injerto vascular, que muestra la formación de colágeno maduro que imita la IVC nativa.

La FIG. 8C ilustra la tinción tricrómica de Masson del injerto vascular, que muestra la formación de colágeno maduro que imita la IVC nativa.

La FIG. 8D ilustra la tinción de Hart del injerto vascular, que muestra elastina orientada que imita la IVC nativa.

La FIG. 8E ilustra la tinción con vWF del injerto vascular, que muestra un revestimiento endotelial completo.

La FIG. 8F ilustra la tinción de SMA del injerto vascular, que muestra una capa de músculo liso orientada que imita la IVC nativa.

La FIG. 9A ilustra una comparación del contenido de elastina de la IVC nativa y un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación, después de 6 meses *in vivo* en un modelo de oveja.

La FIG. 9B ilustra una comparación del contenido de colágeno de la IVC nativa y un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación, después de 6 meses *in vivo* en un modelo de oveja. Los contenidos similares de elastina y colágeno entre la IVC nativa y la estructura, como se ilustra en las FIGs. 9A y 9B, demuestran la remodelación de la estructura en un neovaso completamente funcional.

La FIG. 10 ilustra los valores de distensibilidad en %/mmHg para un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación (etiquetado como "PLCL+PGA"), en comparación con una arteria carótida humana y diversos injertos vasculares sintéticos disponibles comercialmente. Las barras de error representan la desviación estándar.

La FIG. 11 ilustra la presión de ráfaga en MPa para un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación (etiquetado como "PLCL+PGA"), en comparación con una arteria carótida humana y diversos injertos vasculares sintéticos disponibles comercialmente. Las barras de error representan la desviación estándar.

La FIG. 12 ilustra la fuerza de retención de la sutura del injerto en fuerza (g) para un armazón formado en un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación (etiquetado como "PLCL+PGA"), en comparación con una arteria carótida humana, una vena safena humana y diversos injertos vasculares sintéticos disponibles comercialmente. Las barras de error representan la desviación estándar.

La FIG. 13A es una imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de un armazón que comprende poliglicolida (PGA) y poli(láctida-co-caprolactona) (PLCL) después del electrohilado y antes de la degradación, de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 13B ilustra el mismo armazón después de 1 semana en PBS a 37°C, lo que demuestra la degradación de las fibras de PGA en 1 semana.

La FIG. 14 ilustra la degradación de la resistencia máxima a la tracción (UTS) de fibras de diversas combinaciones de polímeros en PBS a 37°C. Las fibras de PGA se degradan en aproximadamente 1 semana, las fibras de polidioxanona (PDO) se degradan en aproximadamente 4 semanas, las fibras PLCL/PDO se degradan en aproximadamente 8 semanas, las fibras PLCL/PGA se degradan en aproximadamente 12 semanas, y las fibras PLCL se degradan en aproximadamente 24 semanas.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, en la práctica o prueba de realizaciones de la presente invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

También debe tenerse en cuenta que, tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a una "fibra" es una referencia a una o más fibras y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, etc.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "aproximadamente" significan más o menos 10% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente 40% significa en el intervalo de 30%- 50%.

10 Los términos "animal", "paciente" y "sujeto" como se usan en el presente documento incluyen, entre otros, humanos y vertebrados no humanos tales como animales salvajes, domésticos y de granja. En algunas realizaciones, los términos "animal", "paciente" y "sujeto" pueden referirse a humanos.

Fibras de electrohilado

15 El electrohilado es un método que se puede utilizar para procesar una solución polimérica hasta obtener una fibra. En realizaciones en las que el diámetro de la fibra resultante está en la escala nanométrica, la fibra puede denominarse nanofibra. Las fibras pueden adoptar diversas formas utilizando una variedad de superficies receptoras, tales como mandriles o colectores. En algunas realizaciones, se puede formar una forma plana, tal como un parche, una lámina o un molde de fibra similar a una lámina o un almacén de fibra, usando un mandril sustancialmente redondo o cilíndrico, y cortando y desenrollando el molde de fibra resultante para formar la lámina. Los moldes o formas de fibra resultantes se pueden utilizar en muchas aplicaciones, incluyendo la reparación o sustitución de estructuras biológicas. En algunas realizaciones, el almacén de fibra resultante se puede implantar en un organismo biológico o en una porción del mismo. En otras realizaciones, el almacén de fibra resultante se puede colocar o fijar a una herida o una porción de la misma.

25 Los métodos de electrohilado pueden implicar hilar una fibra a partir de una solución polimérica aplicando un alto potencial de voltaje DC entre un sistema de inyección de polímero y un mandril. En algunas realizaciones, se pueden aplicar una o más cargas a uno o más componentes de un sistema de electrohilado. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga al mandril, al sistema de inyección de polímero o combinaciones o porciones de los mismos. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, cuando la solución de polímero es expulsada del sistema de inyección de polímero, se cree que se desestabiliza debido a su exposición a una carga. Luego, la solución desestabilizada puede atraerse hacia un mandril cargado. A medida que la solución desestabilizada pasa del sistema de inyección de polímero al mandril, sus disolventes pueden evaporarse y el polímero puede estirarse, dejando una fibra larga y delgada que se deposita sobre el mandril. La solución de polímero puede formar un cono de Taylor cuando es expulsada del sistema de inyección de polímero y expuesta a una carga.

35 En algunas realizaciones, se puede electrohilar simultáneamente más de una fibra polimérica sobre el mismo mandril a partir de más de una solución polimérica, en un proceso denominado a veces "cohilado".

40 Sistema de inyección de polímero.

45 Un sistema de inyección de polímero puede incluir cualquier sistema configurado para expulsar cierta cantidad de una solución de polímero a una atmósfera para permitir el flujo de la solución de polímero desde el sistema de inyección al mandril. En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede suministrar una corriente continua o lineal con un caudal volumétrico controlado de una solución de polímero que se va a formar en una fibra. En otras realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede suministrar una corriente variable de una solución de polímero para formar una fibra. Aún en otras realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede configurarse para suministrar corrientes intermitentes de una solución de polímero para formar múltiples fibras. En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede incluir una jeringa bajo control manual o automatizado. En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede incluir múltiples jeringas y múltiples agujas o componentes similares a agujas bajo control manual o automatizado individual o combinado. En algunas realizaciones, un sistema de inyección de polímeros con múltiples jeringas puede incluir múltiples jeringas y múltiples agujas o componentes similares a agujas, conteniendo cada jeringa la misma solución de polímero. En algunas realizaciones, un sistema de inyección de polímeros con múltiples jeringas puede incluir múltiples jeringas y múltiples agujas o componentes similares a agujas, conteniendo cada jeringa una solución de polímero diferente. En otras realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede comprender uno o más sistemas de inyección de polímero, tales como un primer sistema de inyección de polímero, un segundo sistema de inyección de polímero, un tercer sistema de inyección de polímero, etc. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga al sistema de inyección de polímero, o a una porción del mismo. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga a una aguja o componente similar a una aguja del sistema de inyección de polímero.

55 En algunas realizaciones, la solución de polímero se puede expulsar del sistema de inyección de polímero a un caudal menor o igual a aproximadamente 5 ml/h. En otras realizaciones, la solución de polímero se puede expulsar del sistema de inyección de polímero a un caudal en un intervalo de aproximadamente 0.01 ml/h a aproximadamente 50 ml/h. El caudal al que se expulsa la solución de polímero del sistema de inyección de polímero puede ser, en algunos ejemplos

no limitantes, aproximadamente 0.01 ml/h, aproximadamente 0.05 ml/h, aproximadamente 0.1 ml/h, aproximadamente 0.5 ml/h, aproximadamente 1 ml/h, 2 ml/h, aproximadamente 3 ml/h, aproximadamente 4 ml/h, aproximadamente 5 ml/h, aproximadamente 6 ml/h, aproximadamente 7 ml/h, aproximadamente 8 ml/h, aproximadamente 9 ml/h, aproximadamente 10 ml/h, aproximadamente 11 ml/h, aproximadamente 12 ml/h, aproximadamente 13 ml/h, aproximadamente 14 ml/h, aproximadamente 15 ml/h, aproximadamente 16 ml/h, aproximadamente 17 ml/h, aproximadamente 18 ml/h, aproximadamente 19 ml/h, aproximadamente 20 ml/h, aproximadamente 21 ml/h, aproximadamente 22 ml/h, aproximadamente 23 ml/h, aproximadamente 24 ml/h, aproximadamente 25 ml/h, aproximadamente 26 ml/h, aproximadamente 27 ml/h, aproximadamente 28 ml/h, aproximadamente 29 ml/h, aproximadamente 30 ml/h, aproximadamente 31 ml/h, aproximadamente 32 ml/h, aproximadamente 33 ml/h, aproximadamente 34 ml/h, aproximadamente 35 ml/h, aproximadamente 36 ml/h, aproximadamente 37 ml/h, aproximadamente 38 ml/h, aproximadamente 39 ml/h, aproximadamente 40 ml/h, aproximadamente 41 ml/h, aproximadamente 42 ml/h, aproximadamente 43 ml/h, aproximadamente 44 ml/h, aproximadamente 45 ml/h, aproximadamente 46 ml/h, aproximadamente 47 ml/h, aproximadamente 48 ml/h, aproximadamente 49 ml/h, aproximadamente 50 mL/h,, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

A medida que la solución de polímero viaja desde el sistema de inyección de polímero hacia el mandril, el diámetro de las fibras resultantes puede estar en el intervalo de aproximadamente 0.1 μm a aproximadamente 10 μm . Algunos ejemplos no limitantes de diámetros de fibras electrohiladas pueden incluir aproximadamente 0.1 μm , aproximadamente 0.2 μm , aproximadamente 0.5 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 20 μm , o intervalos entre dos cualesquiera de estos valores, incluyendo los puntos finales.

Solución polimérica

En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero se puede llenar con una solución de polímero. En algunas realizaciones, la solución polimérica puede ser un fluido que se transforma en un líquido polimérico mediante la aplicación de calor. Una solución polimérica puede incluir polímeros sintéticos o semisintéticos de poliglicolida (PGA) y/o poli(lactida-co-caprolactona) (PLCL). En algunos ejemplos no limitantes, la solución polimérica puede comprender una relación porcentual en peso de, por ejemplo, tereftalato de polietileno a poliuretano, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %. Los ejemplos no limitantes de tales relaciones porcentuales en peso pueden incluir 10 %, 25 %, 33 %, 50 %, 66 %, 75 %, 90 %, o intervalos entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

En algunas realizaciones, la solución polimérica puede comprender uno o más disolventes. En algunas realizaciones, el disolvente puede comprender, por ejemplo, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N-metilpirrolidona, N,N dimetilformamida, nacetónitrilo, hexanos, éter, dioxano, acetato de etilo, piridina, tolueno, xileno, tetrahidrofurano, ácido trifluoroacético, hexafluoroisopropanol, ácido acético, dimetilacetamida, cloroformo, diclorometano, agua, alcoholes, compuestos iónicos o combinaciones de los mismos. El intervalo de concentración de un polímero o polímeros en un disolvente o disolventes puede ser, sin limitación, de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 50% en peso. Algunos ejemplos no limitantes de concentración de polímero en solución pueden incluir aproximadamente 1% en peso, 3% en peso, 5% en peso, aproximadamente 10% en peso, aproximadamente 15% en peso, aproximadamente 20% en peso, aproximadamente 25% en peso, aproximadamente 30% en peso, aproximadamente 35 % en peso, aproximadamente 40 % en peso, aproximadamente 45 % en peso, aproximadamente 50 % en peso, o intervalos entre dos cualesquiera de estos valores, incluyendo los puntos finales.

En algunas realizaciones, la solución polimérica también puede incluir materiales adicionales. Los ejemplos no limitantes de tales materiales adicionales pueden incluir materiales opacos a la radiación, agentes de contraste, materiales eléctricamente conductores, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, antibióticos, factores de crecimiento, vitaminas, citoquinas, esteroides, fármacos antiinflamatorios, moléculas pequeñas, azúcares, sales, péptidos, proteínas, factores celulares, ADN, ARN o cualquier otro material para ayudar en la obtención de imágenes no invasivas, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los materiales opacos a la radiación pueden incluir, por ejemplo, bario, tantalio, tungsteno, yodo, gadolinio, oro, platino, bismuto u óxido de bismuto (III). En algunas realizaciones, los materiales eléctricamente conductores pueden incluir, por ejemplo, oro, plata, hierro o polianilina.

En algunas realizaciones, los materiales adicionales pueden estar presentes en la solución polimérica en una cantidad de aproximadamente 1% en peso a aproximadamente 500% en peso. En algunos ejemplos no limitantes, los materiales adicionales pueden estar presentes en la solución polimérica en una cantidad de aproximadamente 1% en peso, aproximadamente 5% en peso, aproximadamente 10% en peso, aproximadamente 15% en peso, aproximadamente 20% en peso, aproximadamente 25% en peso, aproximadamente 30% en peso, aproximadamente 35% en peso, aproximadamente 40% en peso, aproximadamente 45% en peso, aproximadamente 50% en peso, aproximadamente 55% en peso, aproximadamente 60% en peso, aproximadamente 65% en peso, aproximadamente 70% en peso, aproximadamente 75% en peso, aproximadamente 80% en peso, aproximadamente 85% en peso, aproximadamente 90% en peso, aproximadamente 95% en peso, aproximadamente 100% en peso, aproximadamente 125% en peso, aproximadamente 150% en peso, aproximadamente 175% en peso, aproximadamente 200% en peso, aproximadamente 225% en peso, aproximadamente 250 % en peso, aproximadamente 275 % en peso, aproximadamente 300 % en peso, aproximadamente 325 % en peso, aproximadamente 350 % en peso,

aproximadamente 375 % en peso, aproximadamente 400 % en peso, aproximadamente 425 % en peso, aproximadamente 450 % en peso, aproximadamente 475 % en peso, aproximadamente 500% en peso, o cualquier intervalo entre cualquiera de estos dos valores, incluidos los puntos finales.

5 El tipo de polímero en la solución de polímero puede determinar las características de la fibra electrohilada. Algunas fibras pueden estar compuestas de polímeros que son bioestables y no absorbibles ni biodegradables cuando se implantan. Tales fibras pueden permanecer generalmente químicamente sin cambios durante el tiempo que permanezcan implantadas. Como alternativa, las fibras pueden estar compuestas de polímeros que pueden absorberse o biodegradarse con el tiempo.

10 En algunas realizaciones, una fibra electrohilada polimérica tiene una tasa de degradación. La tasa de degradación se puede definir de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, por la cantidad de tiempo que tarda la fibra en degradarse completamente cuando se expone a un tejido o fluido corporal. En tales realizaciones, la tasa de degradación puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 24 meses. Algunos ejemplos no limitantes de tasas de degradación en términos de la cantidad de tiempo que tarda la fibra en degradarse completamente cuando se expone a un tejido o fluido corporal incluyen aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 22 días, aproximadamente 23 días, aproximadamente 24 días, aproximadamente 25 días, aproximadamente 26 días, aproximadamente 27 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 29 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 1.5 meses, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 2.5 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 3.5 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 4.5 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 5.5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 6.5 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 7.5 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 8.5 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 9.5 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 10.5 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 11.5 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 12.5 meses, aproximadamente 13 meses, aproximadamente 13.5 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 14.5 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 15.5 meses, aproximadamente 16 meses, aproximadamente 16.5 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 17.5 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 18.5 meses, aproximadamente 19 meses, aproximadamente 19.5 meses, aproximadamente 20 meses, aproximadamente 20.5 meses, aproximadamente 21 meses, aproximadamente 21.5 meses, aproximadamente 22 meses, aproximadamente 22.5 meses, aproximadamente 23 meses, aproximadamente 23.5 meses, aproximadamente 24 meses, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

En otras realizaciones, la tasa de degradación de una fibra electrohilada polimérica se puede definir, por ejemplo, por la cantidad de masa de fibra perdida por unidad de tiempo, tal como una hora, un día, una semana o un mes. En otras realizaciones más, la tasa de degradación de una fibra electrohilada polimérica puede definirse, por ejemplo, por la pérdida de resistencia de la fibra por unidad de tiempo. La pérdida de resistencia medida puede ser, por ejemplo, la resistencia máxima a la tracción (UTS) de la fibra. En tales realizaciones, la tasa de degradación se puede expresar como, por ejemplo, 25 % de pérdida de UTS en 1 semana, 50 % de pérdida de UTS en 2 semanas, 100 % de pérdida de UTS en 4 semanas, y así sucesivamente. Por ejemplo, PGA puede tener una pérdida de fuerza del 100 % en aproximadamente 1 semana, PDO puede tener una pérdida de fuerza del 100 % en aproximadamente 4 semanas y PLCL puede tener una pérdida de fuerza del 100 % en aproximadamente 24 semanas.

Las fibras descritas en el presente documento pueden actuar como plantilla o armazón inicial para la reparación o sustitución de órganos y/o tejidos. Estas plantillas o armazones de órganos o tejidos pueden degradarse *in vivo* una vez que los tejidos u órganos han sido reemplazados o reparados por estructuras y células naturales. Puede entenderse además que una solución de polímero y sus fibras electrohiladas resultantes pueden estar compuestas de más de un tipo de polímero, y que cada polímero en la misma puede tener una característica específica, tal como bioestabilidad o biodegradabilidad a una tasa de degradación particular.

55 Aplicar cargas a componentes de electrohilado.

En un sistema de electrohilado, se pueden aplicar una o más cargas a uno o más componentes, o porciones de componentes, tales como, por ejemplo, un mandril o un sistema de inyección de polímero, o porciones del mismo. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga positiva al sistema de inyección de polímero, o porciones del mismo. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga negativa al sistema de inyección de polímero, o porciones del mismo. En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero, o porciones del mismo, pueden estar conectados a tierra. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga positiva al mandril o porciones del mismo. En algunas realizaciones, se puede aplicar una carga negativa al mandril o porciones del mismo. En algunas realizaciones, el mandril, o porciones del mismo, pueden estar conectados a tierra. En algunas realizaciones, uno o más componentes o partes de los mismos pueden recibir la misma carga. En algunas realizaciones, uno o más componentes, o porciones de los mismos, pueden recibir una o más cargas diferentes.

La carga aplicada a cualquier componente del sistema de electrohilado, o porciones del mismo, puede ser de aproximadamente -15 kV a aproximadamente 30 kV, incluyendo los puntos finales. En algunos ejemplos no limitantes, la carga aplicada a cualquier componente del sistema de electrohilado, o porciones del mismo, puede ser aproximadamente -15 kV, aproximadamente -10 kV, aproximadamente -5 kV, aproximadamente -3 kV, aproximadamente -1 kV, aproximadamente -0.01 kV, aproximadamente 0.01 kV, aproximadamente 1 kV, aproximadamente 5 kV, aproximadamente 10 kV, aproximadamente 12 kV, aproximadamente 15 kV, aproximadamente 20 kV, aproximadamente 25 kV, aproximadamente 30 kV, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales. En algunas realizaciones, cualquier componente del sistema de electrohilado, o porciones del mismo, puede estar conectado a tierra.

Movimiento del mandril durante el electrohilado.

Durante el electrohilado, en algunas realizaciones, el mandril puede moverse con respecto al sistema de inyección de polímero. En algunas realizaciones, el sistema de inyección de polímero puede moverse con respecto al mandril. El movimiento de un componente de electrohilado con respecto a otro componente de electrohilado puede ser, por ejemplo, sustancialmente rotacional, sustancialmente traslacional o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, uno o más componentes del sistema de electrohilado pueden moverse bajo control manual. En algunas realizaciones, uno o más componentes del sistema de electrohilado pueden moverse bajo control automatizado. En algunas realizaciones, el mandril puede estar en contacto o montado sobre una estructura de soporte que puede moverse usando uno o más motores o sistemas de control de movimiento. El patrón de la fibra electrohilada depositada sobre el mandril puede depender de uno o más movimientos del mandril con respecto al sistema de inyección de polímero. En algunas realizaciones, la superficie del mandril puede configurarse para girar alrededor de su eje longitudinal. En un ejemplo no limitante, un mandril que tiene una tasa de rotación alrededor de su eje largo que es más rápida que una tasa de traslación a lo largo de un eje lineal puede dar como resultado una deposición casi helicoidal de una fibra electrohilada, formando bobinas alrededor del mandril. En otro ejemplo, un mandril que tiene una tasa de traslación a lo largo de un eje lineal que es más rápida que una tasa de rotación alrededor de un eje de rotación puede dar como resultado una deposición aproximadamente lineal de una fibra electrohilada a lo largo de una extensión lineal del mandril.

Armazones de fibra electrohilada multicomponente

Se ha descubierto que es ventajoso para un armazón comprender dos o más materiales diferentes, teniendo cada material una tasa de degradación diferente como se describió anteriormente, porque en dicho armazón la tasa de degradación del armazón *in vivo* puede controlarse selectivamente eligiendo los materiales primero y segundo apropiados que tengan las tasas de degradación apropiadas. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso incluir un primer material que tenga una tasa de degradación relativamente alta o rápida, de modo que se degrade rápidamente *in vivo*, creando una porosidad del armazón que fomenta el crecimiento celular hacia el interior o la infiltración en el armazón. También puede ser ventajoso incluir un segundo material que tenga una tasa de degradación más lenta o inferior que la primera tasa de degradación, de modo que el segundo material se degrade más lentamente *in vivo*, y proporcione un armazón para soportar la formación y desarrollo de nuevas matrices extracelulares por parte de las células recién infiltradas. Un armazón de este tipo puede ser particularmente ventajoso para promover la curación de heridas.

En algunas realizaciones, un armazón puede comprender una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material, y una segunda fibra electrohilada polimérica que comprende un segundo material. El primer material puede tener una primera tasa de degradación, como se describió anteriormente, y el segundo material puede tener una segunda tasa de degradación. Las tasas de degradación primera y segunda son diferentes entre sí. La primera tasa de degradación, mayor (o más rápida) que la segunda degradación. La tasa de degradación puede ser cualquier tasa descrita en el presente documento, o cualquier equivalente conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el primer material puede tener una primera tasa de degradación de aproximadamente 1 semana (es decir, 100% del primer material se degrada después de aproximadamente 1 semana *in vivo*), y el segundo material puede tener una segunda tasa de degradación de aproximadamente 4 meses (es decir, 100% del segundo material se degrada después de aproximadamente 4 meses *in vivo*). Estas tasas de degradación pueden ser particularmente efectivas en aplicaciones de curación de heridas porque el primer material puede degradarse a una tasa que se correlaciona con la tasa a la que se produce la infiltración celular (es decir, la cantidad del primer material perdido durante un período de tiempo determinado se correlaciona directamente con la cantidad de material celular que se infiltra en el armazón durante el mismo período de tiempo). La degradación relativamente rápida del primer material puede crear pares dentro del armazón que tengan el tamaño adecuado para fomentar una mayor infiltración celular. A su vez, el segundo material puede degradarse a un ritmo que le permita proporcionar estabilidad estructural a las células recién infiltradas, permaneciendo intacto *in vivo* el tiempo suficiente para transferir cargas mecánicas de una manera que estimule a las células infiltradas a formar su propia matriz extracelular, en última instancia contribuyendo a la función a largo plazo del tejido curado.

El primer y segundo materiales de un armazón de la invención son poliglicolida (PGA) y poli(láctida-co-caprolactona) (PLCL), respectivamente. El PGA puede ser útil porque se degrada *in vivo* en aproximadamente 1 semana, lo que

permite que las células se infiltren en el almacén a una tasa correlacionado con la tasa de degradación del propio material. En algunas realizaciones, PLCL puede ser útil porque se degrada *in vivo* en aproximadamente 4 meses, lo que le permite proporcionar un almacén relativamente elástico para la herida en curación que puede transferir adecuadamente la carga mecánica y la fuerza a las matrices extracelulares recién formadas, permitiendo a las células remodelar en una estructura tisular organizada.

En algunas realizaciones, el primer material puede tener una primera tasa de degradación que es de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 52 veces mayor o más rápida que la segunda tasa de degradación del segundo material. La tasa de degradación del primer material puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 3 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 4 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 5 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 6 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 7 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 8 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 9 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 10 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 11 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 12 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 13 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 14 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 15 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 16 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 17 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 18 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 19 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 20 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 21 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 22 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 23 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 24 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 25 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 26 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 27 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 28 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 29 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 30 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 31 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 32 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 33 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 34 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 35 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 36 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 37 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 38 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 39 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 40 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 41 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 42 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 43 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 44 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 45 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 46 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 47 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 48 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 49 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 50 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 51 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, aproximadamente 52 veces mayor que la tasa de degradación del segundo material, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluidos los puntos finales.

En algunas realizaciones, la primera fibra electrohilada polimérica y la segunda fibra electrohilada polimérica pueden estar presentes en una relación en peso. En algunos ejemplos, la relación en peso puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1:1, aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales. En una realización preferida, la relación en peso puede ser aproximadamente 1:1.

En ciertas realizaciones, la primera fibra electrohilada polimérica puede comprender una primera capa de fibras electrohiladas poliméricas, y la segunda fibra electrohilada polimérica puede comprender una segunda capa de fibras electrohiladas poliméricas. En algunas realizaciones, el almacén descrito en el presente documento puede tener múltiples capas de fibras electrohiladas poliméricas, comprendiendo cada capa un único material, o comprendiendo cada capa más de un material. En algunas realizaciones, la primera capa puede ser, por ejemplo, una capa que comprende fibras electrohiladas de PGA, y la segunda capa puede ser, por ejemplo, una capa que comprende fibras electrohiladas de PLCL. Un almacén puede comprender cualquier número de capas, incluyendo aproximadamente 1 capa, aproximadamente 2 capas, aproximadamente 3 capas, aproximadamente 4 capas, aproximadamente 5 capas, etc.

En algunas realizaciones, el almacén puede comprender además al menos una célula biológica. En algunos ejemplos, la célula biológica puede ser una célula diferenciada, una célula madre multipotente, una célula madre pluripotente,

una célula madre totipotente no humana, una célula autóloga, una célula singénica, una célula alogénica, una célula madre derivada de médula ósea, una célula madre de sangre de cordón umbilical, una célula mesenquimatosa, una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula hematopoyética, una célula inmunológica y cualquier combinación de las mismas.

Como se describió anteriormente, en algunas realizaciones, la primera rata de degradación puede corresponder sustancialmente a una rata de infiltración celular, y la segunda rata de degradación puede ser más lenta que la primera rata de degradación. En otras realizaciones, un armazón puede comprender una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material que tiene una primera rata de degradación que corresponde sustancialmente a una rata de infiltración celular, y una segunda fibra electrohilada polimérica que comprende un segundo material que tiene una segunda rata de degradación más rápida que la primera. rata de degradación.

La presente divulgación contempla además un kit que comprende un armazón de acuerdo con el primer aspecto y una bolsa sellable. En algunas de tales realizaciones, la bolsa sellable puede comprender uno o más de un componente desecante, un componente de lámina y al menos una fibra de polietileno de alta densidad hilada rápidamente, tal como TYVEK disponible comercialmente, por ejemplo. Se puede utilizar cualquier combinación de estos elementos para preservar el armazón, particularmente cuando es probable que el armazón se almacene, tal como en un estante o en una unidad de atención móvil, para uso futuro. En algunas realizaciones, el armazón dentro del kit puede ser estable en condiciones ambientales durante aproximadamente dos años.

Un método para fabricar un armazón de acuerdo con el primer aspecto comprende electrohilar un primer polímero que tiene una primera rata de degradación expulsando una primera solución polimérica desde un primer sistema de inyección de polímero sobre un mandril, y electrohilar una segunda fibra polimérica que tiene una segunda rata de degradación diferente de la primera rata de degradación expulsando una segunda solución polimérica desde un segundo sistema de inyección de polímero sobre el mandril, en donde el primer polímero es poliglicolida y el segundo polímero es poli(láctida-co-caprolactona). En algunas realizaciones, los dos pasos de electrohilado del método se pueden realizar simultáneamente, en un proceso denominado a veces "cohilado".

En el presente documento se describe un método para mejorar la curación de heridas que puede comprender aplicar a una porción de una herida un armazón que comprende una primera fibra electrohilada polimérica que comprende un primer material que tiene una primera rata de degradación, y una segunda fibra electrohilada polimérica que comprende un segundo material que tiene una segunda rata de degradación diferente de la primera rata de degradación. La porción de la herida puede comprender la herida completa en algunos casos. El método para mejorar la cicatrización de heridas puede comprender además presembrar el armazón con al menos una célula biológica seleccionada del grupo que consiste en una célula diferenciada, una célula madre multipotente, una célula madre pluripotente, una célula madre totipotente no humana, una célula autóloga, una célula singénica, una célula alogénica, una célula madre derivada de la médula ósea, una célula madre de la sangre del cordón umbilical, una célula mesenquimatosa, una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula hematopoyética, una célula inmunológica, y cualquier combinación de las mismas. El método para mejorar la cicatrización de heridas puede comprender además remojar el armazón en un tratamiento. El tratamiento puede comprender, por ejemplo, plasma rico en plaquetas, médula ósea, fracción vascular estromal, cualquier combinación de los mismos: o cualquier equivalente de los mismos conocido en la técnica. El método para mejorar la cicatrización de heridas puede comprender además suturar el armazón a la porción de la herida. El método para mejorar la curación de heridas puede comprender además vendar la porción de la herida después de que se haya aplicado el soporte.

Injertos vasculares multicomponente

Como se usa en el presente documento, el término "distensibilidad" se refiere a una medida de deformación de un material cuando se somete a una fuerza aplicada. En una realización, la "distensibilidad" se puede calcular como una relación entre la deformación y la tensión de un material. En algunas realizaciones, la "distensibilidad" puede considerarse como la inversa del módulo de elasticidad de Young del material.

Como se usa en el presente documento, el término "presión de ráfaga" se refiere a una presión interior dentro de una forma cerrada, tal como un tubo o cilindro, que es suficiente para provocar que el material que comprende la forma cerrada explote o se rompa. En algunas realizaciones, la "presión de ráfaga" puede ser la misma que la resistencia máxima a la tracción del material que comprende la forma cerrada.

En algunas realizaciones, los armazones descritos en el presente documento pueden tener la forma de un vaso sanguíneo o un injerto vascular. En tales realizaciones, el injerto vascular puede tener una distensibilidad, una presión de ráfaga y una resistencia de retención de la sutura.

En algunas realizaciones, la distensibilidad del armazón puede ser de aproximadamente 2% por mmHg a aproximadamente 14% por mmHg. La distensibilidad del armazón puede ser, por ejemplo, aproximadamente 2% por mmHg, aproximadamente 3% por mmHg, aproximadamente 4% por mmHg, aproximadamente 5% por mmHg, aproximadamente 6% por mmHg, aproximadamente 7% por mmHg, aproximadamente 8% por mmHg,

aproximadamente 9% por mmHg, aproximadamente 10% por mmHg, aproximadamente 11% por mmHg, aproximadamente 12% por mmHg, aproximadamente 13% por mmHg, aproximadamente 14% por mmHg, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo puntos finales. En algunas realizaciones, la distensibilidad del armazón puede variar en todo momento. En otras realizaciones, la distensibilidad del armazón puede ser uniforme en todas partes. En algunas realizaciones, la distensibilidad de un armazón formado en un injerto vascular que tiene un primer extremo y un segundo extremo puede variar entre el primer extremo y el segundo extremo.

En algunas realizaciones, la presión de ráfaga del armazón puede ser de aproximadamente 0.01 MPa a aproximadamente 10 MPa. La presión de ráfaga puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0.01MPa, aproximadamente 0.05MPa, aproximadamente 0.1MPa, aproximadamente 0.15MPa, aproximadamente 0.2MPa, aproximadamente 0.25MPa, aproximadamente 0.3MPa, aproximadamente 0.35MPa, aproximadamente 0.4MPa, aproximadamente 0.45MPa, aproximadamente 0.5MPa, aproximadamente 0.55MPa, aproximadamente 0.6MPa, aproximadamente 0.65MPa, aproximadamente 0.7MPa, aproximadamente 0.75MPa, aproximadamente 0.8MPa, aproximadamente 0.85MPa, aproximadamente 0.9MPa, aproximadamente 0.95MPa, aproximadamente 1MPa, aproximadamente 1.5MPa, aproximadamente 2MPa, aproximadamente 2.5MPa, aproximadamente 3MPa, aproximadamente 3.5MPa, aproximadamente 4MPa, aproximadamente 4.5MPa, aproximadamente 5MPa, aproximadamente 5.5MPa, aproximadamente 6MPa, aproximadamente 6.5MPa, aproximadamente 7MPa, aproximadamente 7.5MPa, aproximadamente 8MPa, aproximadamente 8.5MPa, aproximadamente 9MPa, aproximadamente 9.5MPa, aproximadamente 10MPa, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

En algunas realizaciones, la fuerza de retención de sutura del armazón puede ser de aproximadamente 100 g a aproximadamente 3500 g. La fuerza de retención de la sutura puede ser, por ejemplo, aproximadamente 100g, aproximadamente 150g, aproximadamente 200g, aproximadamente 250g, aproximadamente 300g, aproximadamente 350g, aproximadamente 400g, aproximadamente 450g, aproximadamente 500g, aproximadamente 550g, aproximadamente 600g, aproximadamente 650g, aproximadamente 700g, aproximadamente 750g, aproximadamente 800g, aproximadamente 850g, aproximadamente 900g, aproximadamente 950g, aproximadamente 1000g, aproximadamente 1100g, aproximadamente 1200g, aproximadamente 1300g, aproximadamente 1400g, aproximadamente 1500g, aproximadamente 1600g, aproximadamente 1700g, aproximadamente 1800g, aproximadamente 1900g, aproximadamente 2000g, aproximadamente 2100g, aproximadamente 2200g, aproximadamente 2300g, aproximadamente 2400g, aproximadamente 2500g, aproximadamente 2600g, aproximadamente 2700g, aproximadamente 2800g, aproximadamente 2900g, aproximadamente 3000g, aproximadamente 3100g, aproximadamente 3200g, aproximadamente 3300g, aproximadamente 3400g, aproximadamente 3500g, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

En algunas realizaciones, el diámetro, ya sea interno o externo de un armazón formado en un injerto vascular, puede variar de aproximadamente 0.01 mm a aproximadamente 30 mm. El diámetro del injerto vascular puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0.01mm, aproximadamente 0.05mm, aproximadamente 0.1mm, aproximadamente 0.2mm, aproximadamente 0.3mm, aproximadamente 0.4mm, aproximadamente 0.5mm, aproximadamente 0.6mm, aproximadamente 0.7mm, aproximadamente 0.8mm, aproximadamente 0.9mm, aproximadamente 1mm, aproximadamente 2mm, aproximadamente 3mm, aproximadamente 4mm, aproximadamente 5mm, aproximadamente 6mm, aproximadamente 7mm, aproximadamente 8mm, aproximadamente 9mm, aproximadamente 10mm, aproximadamente 11mm, aproximadamente 12mm, aproximadamente 13mm, aproximadamente 14mm, aproximadamente 15mm, aproximadamente 16mm, aproximadamente 17mm, aproximadamente 18mm, aproximadamente 19mm, aproximadamente 20mm, aproximadamente 21mm, aproximadamente 22mm, aproximadamente 23mm, aproximadamente 24mm, aproximadamente 25mm, aproximadamente 26mm, aproximadamente 27mm, aproximadamente 28mm, aproximadamente 29mm, aproximadamente 30mm, o cualquier intervalo entre dos de estos valores, incluyendo los puntos finales.

El uso de un armazón de fibra electrohilada de múltiples componentes como se describe en el presente documento, en cualquier forma, incluyendo la de un injerto vascular, puede lograr tres atributos clave: 1) controlar con precisión el perfil de degradación, 2) aumentar la porosidad del armazón en función del tiempo para facilitar la infiltración celular y 3) transferir cargas biomecánicas al neovaso para facilitar la maduración y organización de la nueva matriz extracelular en órganos completamente funcionales, tal como se muestra en las Figs. 6A-6F. En un armazón que comprende PGA y PLCL en una relación de peso de 1:1, por ejemplo, las fibras de PGA se degradarán aproximadamente en la primera semana *in vivo*, lo que proporciona una porosidad adicional que filtra las células para moverse mientras proporciona resistencia mecánica inicial al injerto vascular. El PLCL permanecerá aproximadamente 12 semanas *in vivo*, lo que permitirá la transición gradual de las fuerzas biomecánicas a la matriz extracelular recién depositada, provocando que madure y se organice. Si el injerto estuviera formado únicamente por fibras de PGA, rápidamente se desarrollaría un aneurisma y el vaso se rompería en una semana. Si todo el injerto estuviera formado únicamente por fibras PLCL, no habría suficiente porosidad para permitir que las células se infiltraran completamente en la estructura, lo que daría como resultado una respuesta inflamatoria crónica, una remodelación inadecuada y estenosis. El armazón de múltiples componentes puede mejorar el éxito del injerto.

Ejemplos

Ejemplo 1: Método de fabricación de un armazón.

Para crear un armazón de PLCL+PGA cohilado, se disolvió 10 % en peso de PGA en hexafluoroisopropanol (HFIP) para formar una primera solución y se disolvió 5 % en peso de PLCL en HFIP para formar una segunda solución. Cada solución se agitó mediante una barra agitadora magnética durante al menos 3 horas a temperatura ambiente. La solución de PGA se colocó en una primera jeringa y se distribuyó a una tasa de flujo de aproximadamente 2.5 ml/h, y la solución de PLCL se colocó en una segunda jeringa y se distribuyó a una tasa de flujo de aproximadamente 5 ml/h para dar como resultado aproximadamente 50% de las fibras siendo PGA puro y 50% de las fibras siendo PLCL puro. Ambas soluciones se electrohilaban (cohilaban) simultáneamente sobre el mandril que se colocó a 20 cm de la punta de la aguja y se giró a 30 RPM. Se aplicó una carga de +25 kV a la punta de la jeringa y se depositaron fibras electrohiladas sobre el mandril hasta lograr el espesor de pared deseado. Luego se retiró el armazón electrohilado del mandril, se esterilizó terminalmente y quedó listo para su implantación. Este proceso de fabricación puede ampliarse fácilmente a cualquier diámetro y longitud de injerto y puede ser adecuado para mayores volúmenes de producción.

Ejemplo 2: Modelo porcino

Se extirparon parches de piel de 3 cm x 3 cm de espesor total del lomo de cerdos Yorkshire para crear heridas. Se recortaron armazones que comprendían PGA y PLCL en una relación de peso de 1:1 (n=4) para adaptarlos a los bordes de la herida y se colocaron en los lechos de la herida (un soporte en cada lecho de la herida). Las heridas de control se realizaron sin tratamiento con armazón para comparar. Los sitios de las heridas se cubrieron con apósitos adhesivos transparentes para mantener la herida húmeda y luego se envolvieron con una gasa de algodón y una envoltura protectora. El apósito adhesivo para heridas y la envoltura protectora se retiraron cada 7 días para obtener imágenes de la herida y luego se reemplazaron con apósitos nuevos. Los cerdos se sacrificaron después de 28 días y se prepararon muestras para histología. Las descripciones histológicas se clasificaron y puntuaron, y se midió el porcentaje de cierre de la herida en cada momento. Las FIGs. 2A-2F ilustran la curación de una herida de control sin soporte. La FIG. 2A ilustra la herida el día 0. La FIG. 2B ilustra la misma herida el día 7, con un cierre de la herida del 33 %. La FIG. 2C ilustra la misma herida el día 14, con un cierre de la herida del 78 %. La FIG. 2D ilustra la misma herida el día 21, con un cierre de la herida del 97 %. La FIG. 2E ilustra la misma herida el día 28, con un cierre de la herida del 100 %. La FIG. 2F ilustra la histología de la herida el día 28. La histología mostró una capa epidérmica incompleta con un espacio de aproximadamente 2/3 de la herida. La costra sobre la herida tenía abundantes neutrófilos y el tejido fibroso debajo de la herida era aproximadamente el doble de grueso que las capas fibrosas adyacentes. Había infiltración difusa de linfocitos subcutáneos de leve a moderada. Las FIGs. 3A-3F ilustran la curación de una herida tratada con armazón. La FIG. 3A ilustra la herida el día 0. La FIG. 3B ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 7, con un cierre de la herida del 28 %. La FIG. 3C ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 14, con un cierre de la herida del 96 %. La FIG. 3D ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 21, con un cierre de la herida del 100 %. La FIG. 3E ilustra la misma herida con el mismo armazón el día 28, con un cierre de la herida del 100 %. La FIG. 3F ilustra la histología de la herida con el armazón el día 28. La histología mostró una capa epidérmica completa sobre el sitio de la herida con espesor y producción de queratina normales. El tejido fibroso debajo de la herida era aproximadamente el doble de grueso que las capas fibrosas adyacentes. Había infiltración difusa de linfocitos subcutáneos de leve a moderada. Las heridas tratadas con armazón lograron un cierre completo o sustancialmente completo aproximadamente 1 semana antes que las heridas de control.

Ejemplo 3: Uso en campo en lesiones traumáticas equinas.

Los armazones descritos en el presente documento han sido utilizados con éxito por veterinarios en una variedad de aplicaciones en especies domésticas, incluyendo perros, gatos, caballos y reptiles. Las FIGs. 4A-4F y 5A-5F ilustran la curación mejorada con armazones de dos caballos con lesiones traumáticas. En ambos casos, se usó un armazón que comprendía PGA y PLCL en una relación de peso de 1:1 sin ningún remojo adicional en el tratamiento o siembra de células.

Las FIGs. 4A-4F ilustran el proceso de curación de un caballo con una lesión grave en la pierna causada por un alambre de alta resistencia. La FIG. 4A ilustra las heridas iniciales con alambre de alta resistencia en la cuartilla y el hueso del cañón. La FIG. 4B ilustra ambas heridas completamente cicatrizadas 5 semanas después de aplicar un armazón de acuerdo con la presente divulgación. La FIG. 4C ilustra la herida vascular en la cuartilla en el momento de la lesión. La FIG. 4D ilustra la misma herida vascular en la cuartilla, cubierta con un armazón de acuerdo con la presente divulgación. La FIG. 4E ilustra un vendaje de gasa de parafina sobre el armazón que cubre la herida de la cuartilla, de acuerdo con la presente divulgación. La FIG. 4F ilustra la curación de la herida de la cuartilla 4 semanas después de que se aplicó el armazón.

Las FIGs. 5A-5E ilustran el proceso de curación de un caballo con una gran laceración en el hombro y el torso causada por chocar contra un rastrillo de heno. La FIG. 5A ilustra la laceración en el momento de la lesión. La FIG. 5B ilustra la laceración en el momento de la lesión, con un armazón aplicado a la herida de acuerdo con la presente divulgación. La FIG. 5C ilustra la herida después de 4 semanas de curación, con evidencia de nuevo crecimiento del tejido de granulación. La FIG. 5D ilustra la herida después de 2 meses (8 semanas) de curación, con evidencia de epitelización y crecimiento del pelo. La FIG. 5E ilustra la herida después de 5 meses (20 semanas) de curación, con epitelización adicional y crecimiento del cabello.

Ejemplo 4: Pruebas mecánicas comparativas de injertos vasculares.

Los injertos vasculares disponibles comercialmente no han demostrado una distensibilidad que coincida con la de la arteria carótida humana. La distensibilidad promedio de la arteria carótida humana nativa (5.4 %/mmHg) es aproximadamente 2 veces mayor que la del injerto vascular disponible comercialmente con mayor distensibilidad (heteroinjerto bovino 2.6 %/mmHg), como se muestra en la FIG. 10. De manera similar, la distensibilidad promedio de la arteria coronaria humana (3.8%/mmHg) es aproximadamente 1.5 veces mayor que la del injerto comercialmente más distensible. Esta falta de coincidencia en la distensibilidad puede ser un factor importante que contribuya al bajo rendimiento clínico de dichos injertos. Un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación tenía una distensibilidad de aproximadamente 3.2 %/mmHg, imitando fielmente la arteria coronaria humana, como se muestra en la FIG. 10.

La presión de ráfaga de un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación está muy por encima de las observadas en las venas safenas y arterias carótidas humanas nativas, como se muestra en la FIG. 11. Esto sugiere que puede ser posible ajustar el espesor de la pared lateral para adaptar la distensibilidad del injerto (es decir, una pared lateral más delgada tiene una mayor distensibilidad), siempre que se logre la presión de rotura mínima. Por el contrario, el injerto de tejido diseñado y el injerto de ePTFE apenas alcanzan las presiones de estallido de la vena y arteria nativas.

Un injerto vascular de acuerdo con la presente divulgación superó la resistencia de retención de sutura mínima estándar de 2 N o 204 g recomendada para prótesis vasculares potenciales, como se muestra en la FIG. 12. La fuerza de retención de la sutura es una cualidad importante porque la duración de la cirugía y el riesgo de complicaciones para el paciente pueden aumentar si las suturas atraviesan el injerto vascular durante la anastomosis *in vivo*.

Ejemplo 5: Injertos vasculares en un modelo ovino.

Siete ovejas jóvenes se sometieron a procedimientos de injerto de vena cava inferior (IVC) y de arteria carótida con injertos vasculares realizados de acuerdo con la presente divulgación. Después del injerto quirúrgico, se permitió que los animales se recuperaran durante 14 días y se les dio seguimiento durante 6 meses. La permeabilidad *in vivo* de los injertos se evaluó a los 3 meses y 6 meses después de la implantación. En cada evaluación de seguimiento, los animales se sometieron a muestras de sangre venosa, exámenes veterinarios e imágenes para evaluar la integridad de los injertos de vasos. Para evaluar el crecimiento luminal y longitudinal *in vivo* de los injertos, se realizaron angiografías tanto ecocardiográficas como fluoroscópicas con los animales anestesiados. Un animal murió 3 meses después de la cirugía y mostró oclusión tanto en la IVC como en la arteria carótida. Los animales restantes se sacrificaron después de 6 meses y se sometieron a una evaluación patológica macroscópica y a una recolección de tejido. Las regiones injertadas de la vena cava inferior y la arteria carótida se evaluaron visualmente para detectar crecimiento interno de tejido, evidencia de fibrosis y coagulación. Luego, los tejidos recolectados se conservaron para histología. Se realizaron evaluaciones histológicas detalladas como se muestra en las FIGs. 7A-F y 8A-F. Las FIGs. 9A y 9B ilustran los contenidos similares de elastina y colágeno, respectivamente, de la IVC nativa y del vaso injertado al final de este estudio.

Ejemplo 6: Uso en campo en una lesión traumática del caparazón de una tortuga

Una tortuga Gopher adulta fue presentada al Hospital Veterinario de Animales de Orlando después de ser atropellada por un coche. La cara dorsal del caparazón se extirpó traumáticamente durante el accidente y la parte más profunda de la lesión se extendió hasta la superficie de la membrana pleural. La tortuga se ingresó en el hospital para tratamientos de reparación de caparazón y rehabilitación. La herida fue limpiada y desbridada. Se aplicó un armazón que comprendía PGA y PLCL en una relación de peso de 1:1 en el área afectada durante 2 semanas. Después de 2 semanas, se retiró el parche y se observó un notable crecimiento del caparazón. Se recortaron los márgenes no afectados del parche y las secciones se volvieron a aplicar en el área dañada durante 2 semanas más. El veterinario tratante Bruce Bogoslavsky, DVM, declaró: "[e]n mis 27 años de práctica veterinaria, trabajando con reptiles, nunca había visto un crecimiento tan rápido del caparazón dañado y sólo puedo atribuir los resultados al uso del [armazón]."

REIVINDICACIONES

1. Un almac3n que comprende:

una primera fibra electrohilada polim3rica que comprende un primer material que tiene una primera rata de degradaci3n; y

una segunda fibra electrohilada polim3rica que comprende un segundo material que tiene una segunda rata de degradaci3n diferente de la primera rata de degradaci3n, en donde el primer material es poliglicolida y el segundo material es poli-(lactida-co-caprolactona).

2. El almac3n de la reivindicaci3n 1, que comprende adem3s al menos una c3lula biol3gica seleccionada del grupo que consiste en una c3lula diferenciada, una c3lula madre multipotente, una c3lula madre pluripotente, una c3lula madre totipotente no humana, una c3lula aut3loga, una c3lula sing3nica, una c3lula alog3nica, una c3lula madre derivada de la m3dula 3sea, una c3lula madre de la sangre del cord3n umbilical, una c3lula mesenquimatosa, una c3lula madre embrionaria, una c3lula madre pluripotente inducida, una c3lula epitelial, una c3lula endotelial, una c3lula hematopoy3tica, una c3lula inmunol3gica y cualquier combinaci3n de los mismos.

3. El almac3n de la reivindicaci3n 1 o la reivindicaci3n 2, en el que la primera fibra electrohilada polim3rica y la segunda fibra electrohilada polim3rica est3n presentes en una relaci3n en peso seleccionada del grupo que consiste en 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 y 1:3.

4. El almac3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene la forma de un injerto vascular, teniendo el injerto vascular una distensibilidad de aproximadamente 2%/mmHg a aproximadamente 14%/mmHg, una presi3n de r3faga de aproximadamente 0.01 MPa a aproximadamente 10 MPa, y una fuerza de retenci3n de la sutura de aproximadamente 100 g a aproximadamente 3500 g.

5. El almac3n de la reivindicaci3n 4, en el que el injerto vascular tiene un primer extremo y un segundo extremo, y en el que la distensibilidad var3a desde el primer extremo hasta el segundo extremo.

6. Un kit que comprende:

un almac3n de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores;

y una bolsa sellable.

7. El kit de la reivindicaci3n 6, en el que el almac3n es estable en condiciones ambientales durante aproximadamente dos a3os.

8. Un m3todo para fabricar un almac3n, comprendiendo el m3todo:

electro hilar una primera fibra polim3rica que tiene una primera rata de degradaci3n expulsando una primera soluci3n polim3rica desde un primer sistema de inyecci3n de pol3mero sobre un mandril; y

electro hilar una segunda fibra polim3rica que tiene una segunda rata de degradaci3n diferente de la primera rata de degradaci3n expulsando una segunda soluci3n polim3rica desde un segundo sistema de inyecci3n de pol3mero sobre el mandril, en donde el primer pol3mero es poliglicolida y el segundo pol3mero es poli(lactida-co-caprolactona).

9. El m3todo de la reivindicaci3n 8, en el que el electrohilado de la primera fibra polim3rica y el electrohilado de la segunda fibra polim3rica se realizan simult3neamente.

10. El m3todo de la reivindicaci3n 8 o 9, que comprende adem3s presembrar el almac3n con al menos una c3lula biol3gica seleccionada del grupo que consiste en una c3lula diferenciada, una c3lula madre multipotente, una c3lula madre pluripotente, una c3lula madre totipotente no humana, una c3lula aut3loga, una c3lula sing3nica, una c3lula alog3nica, una c3lula madre derivada de la m3dula 3sea, una c3lula madre de la sangre del cord3n umbilical, una c3lula mesenquimatosa, una c3lula madre embrionaria, una c3lula madre pluripotente inducida, una c3lula epitelial, una c3lula endotelial, una c3lula hematopoy3tica, una c3lula inmunol3gica, y cualquier combinaci3n de las mismas.

11. El m3todo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el almac3n comprende una primera fibra electrohilada polim3rica y una segunda fibra electrohilada polim3rica en una relaci3n en peso seleccionada del grupo que consiste en 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 y 1:3.

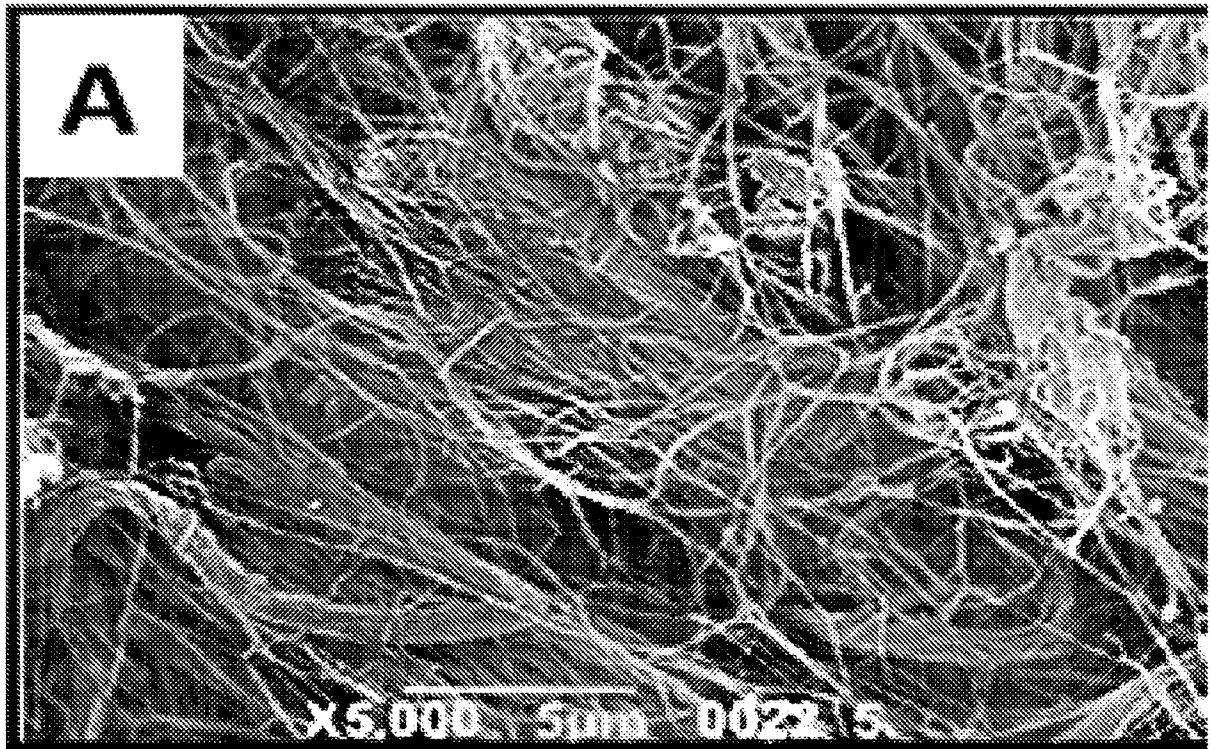


FIG. 1A

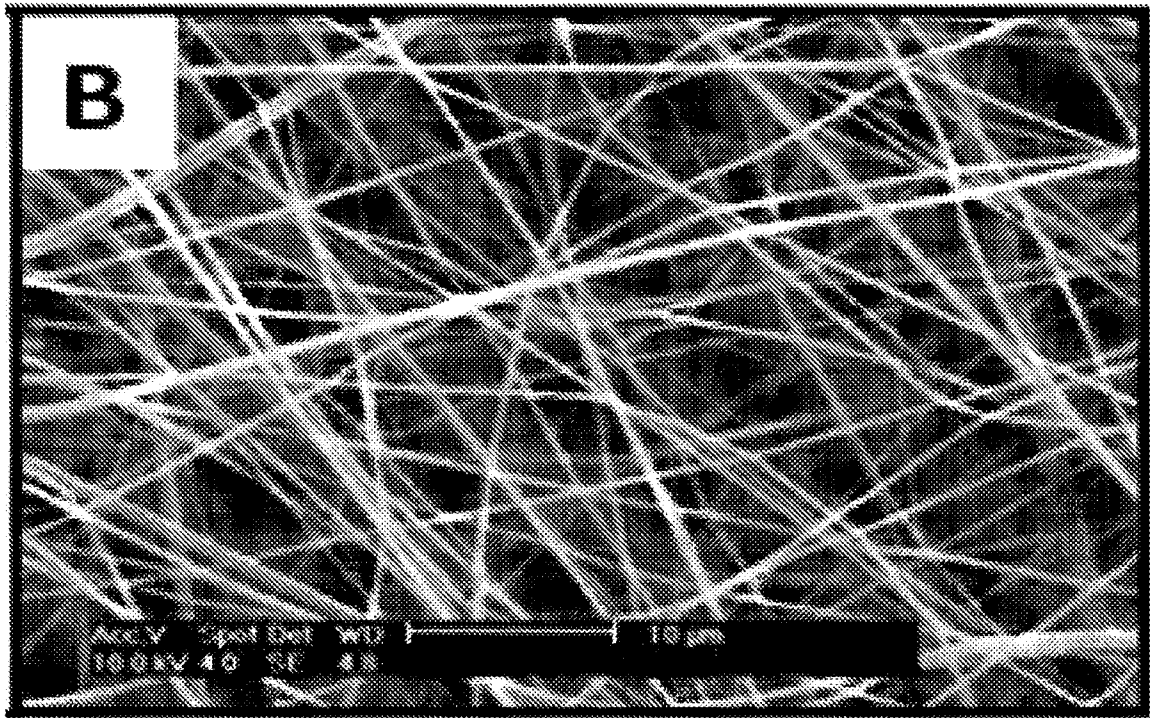


FIG. 1B

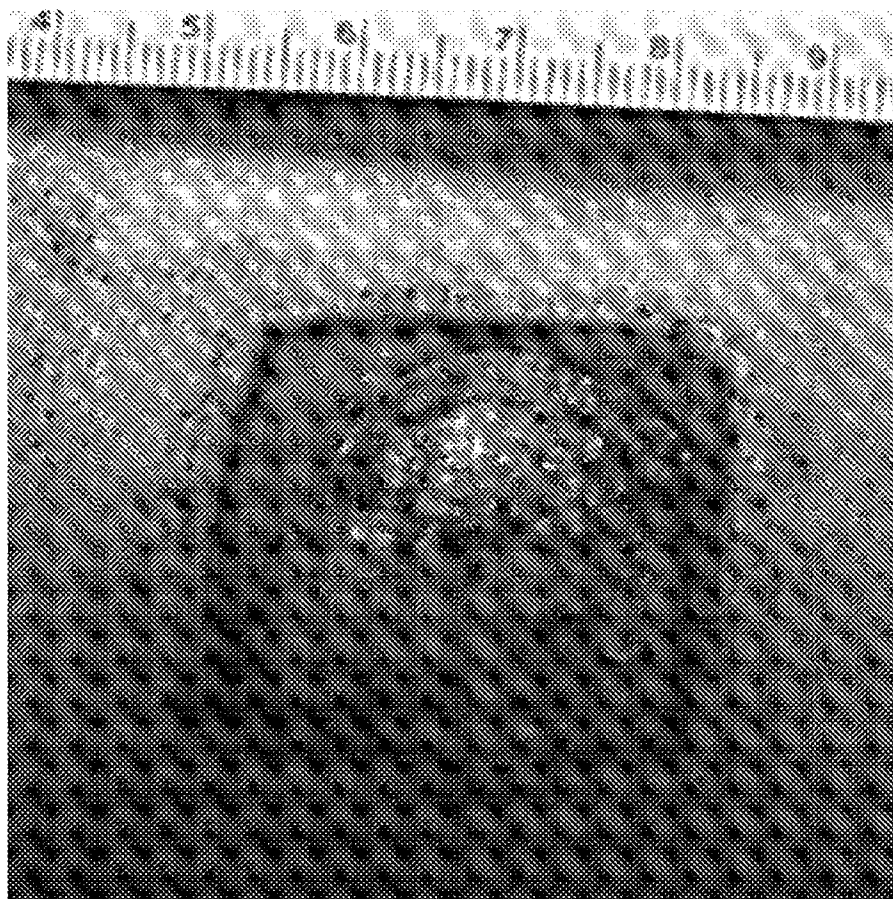


FIG. 2A

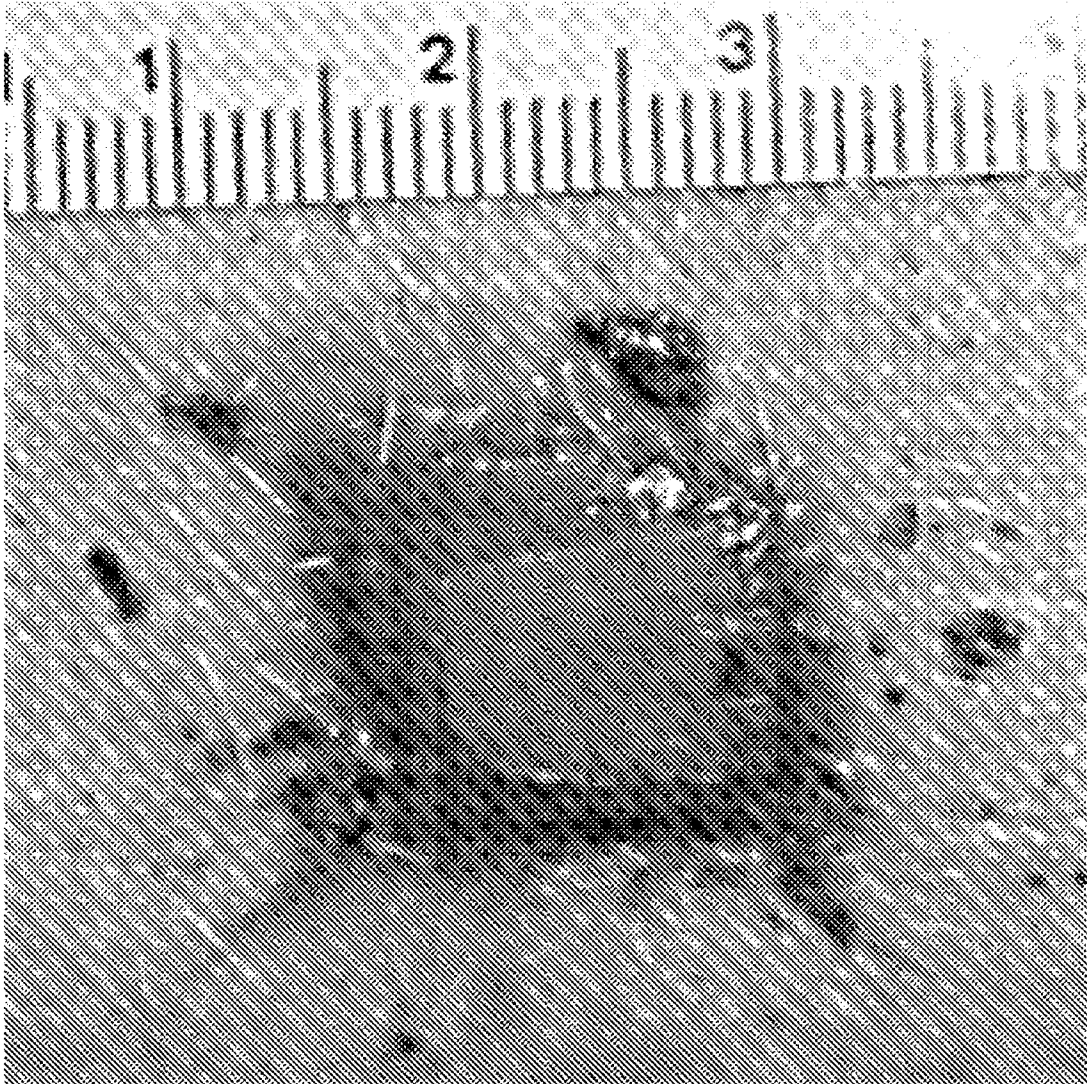


FIG. 2B

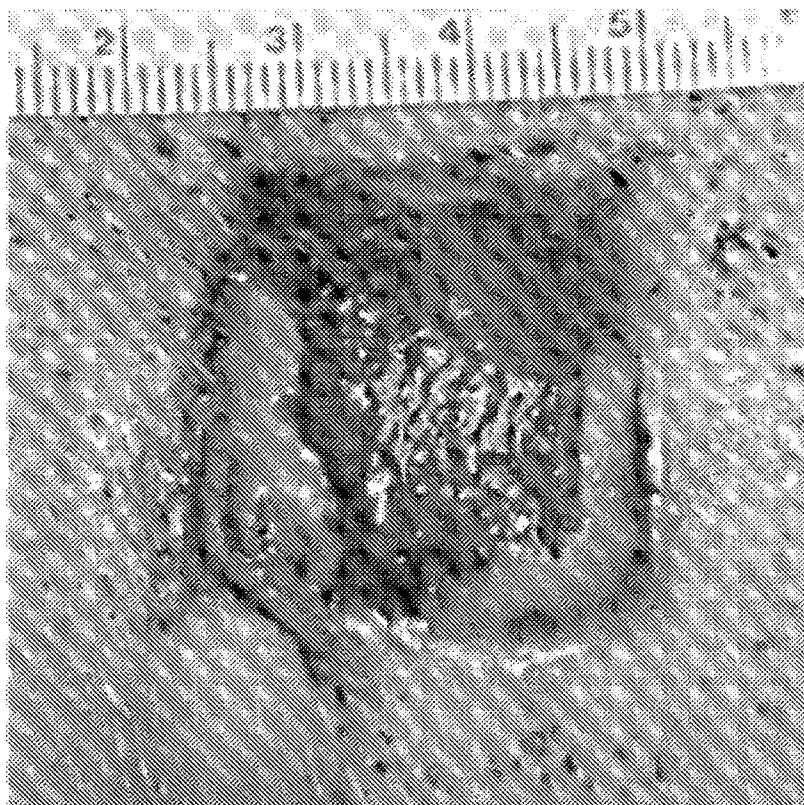


FIG. 2C

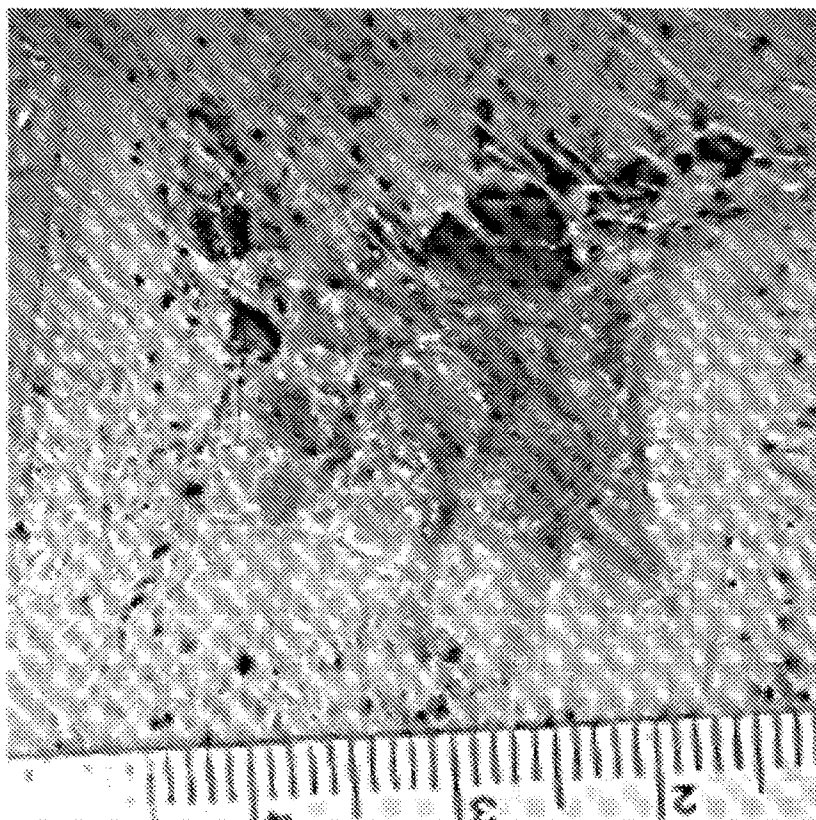


FIG. 2D

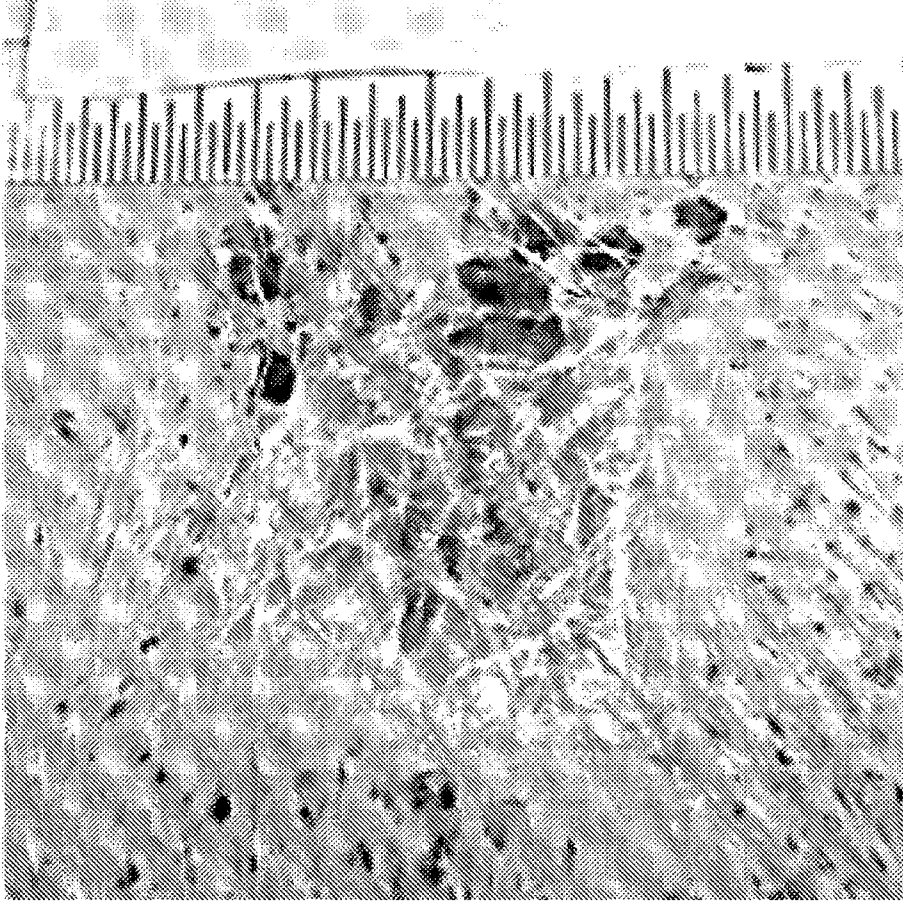


FIG. 2E

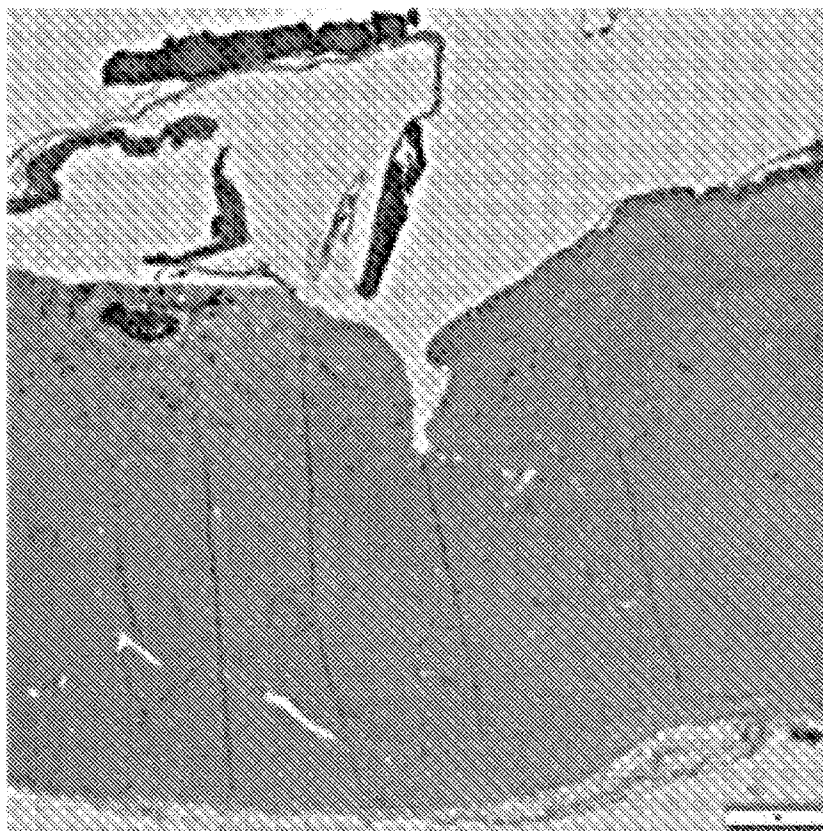


FIG. 2F

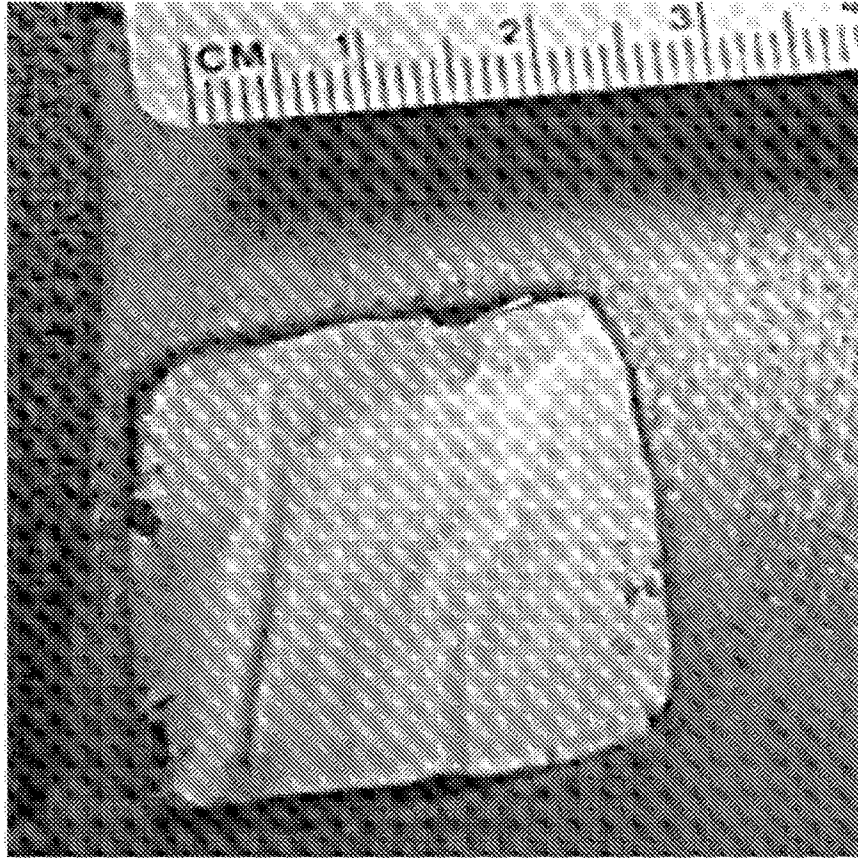


FIG. 3A

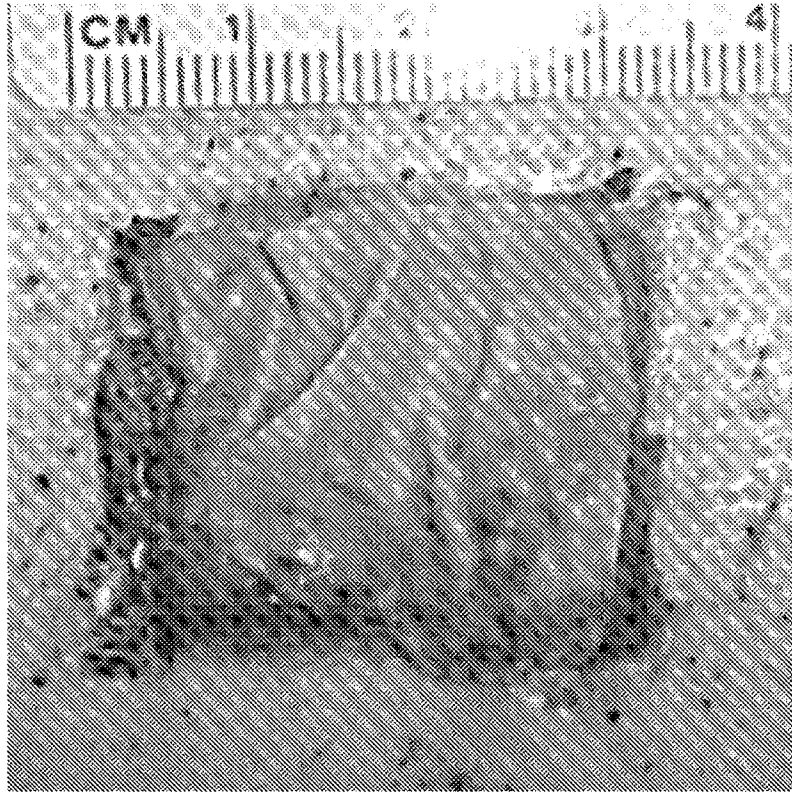


FIG. 3B

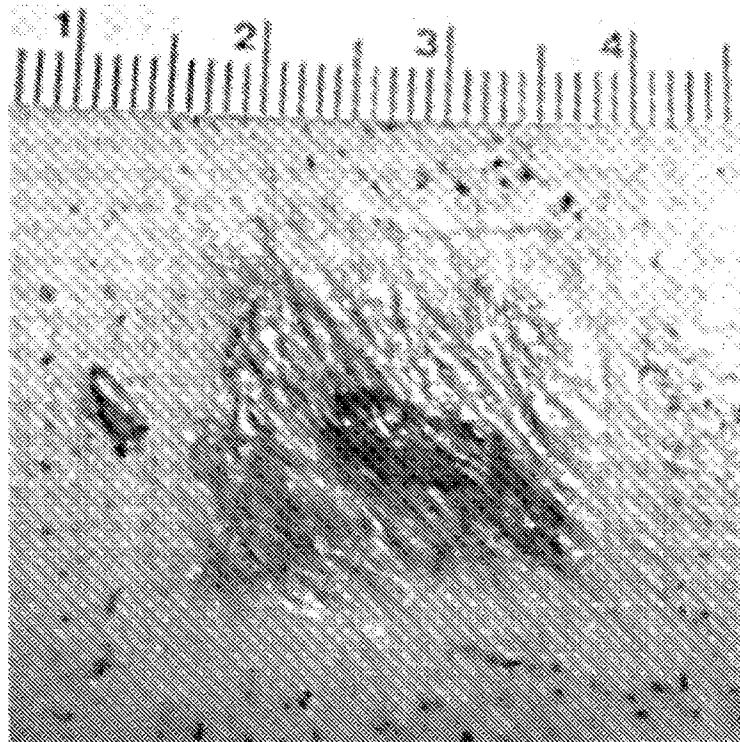


FIG. 3C

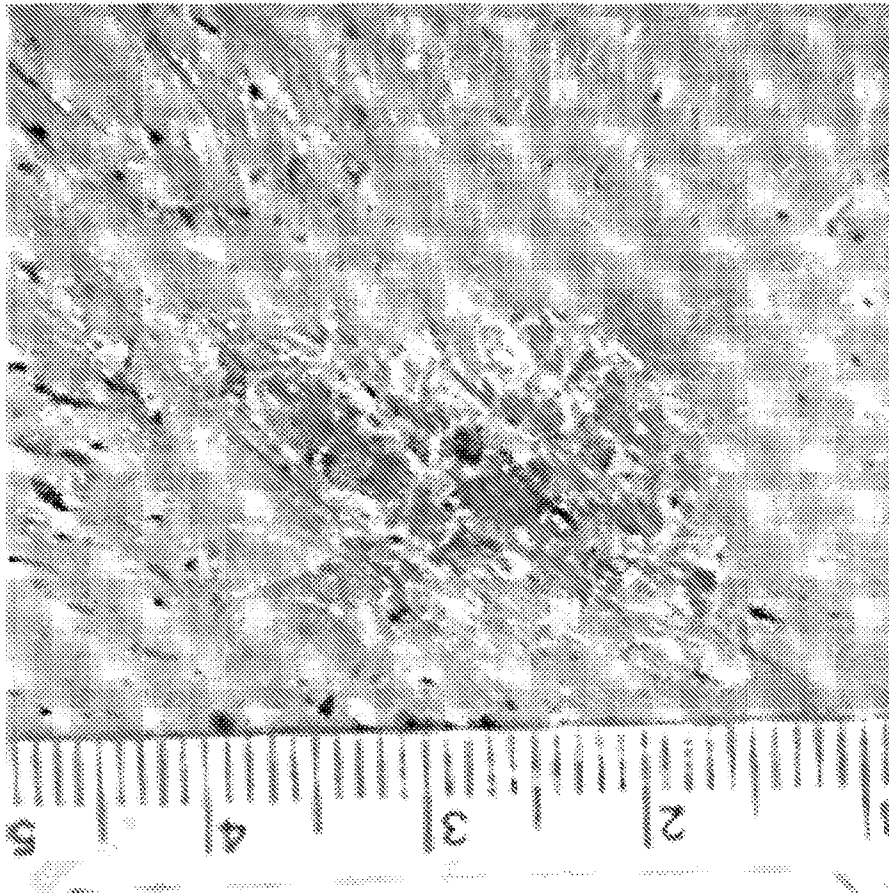


FIG. 3D

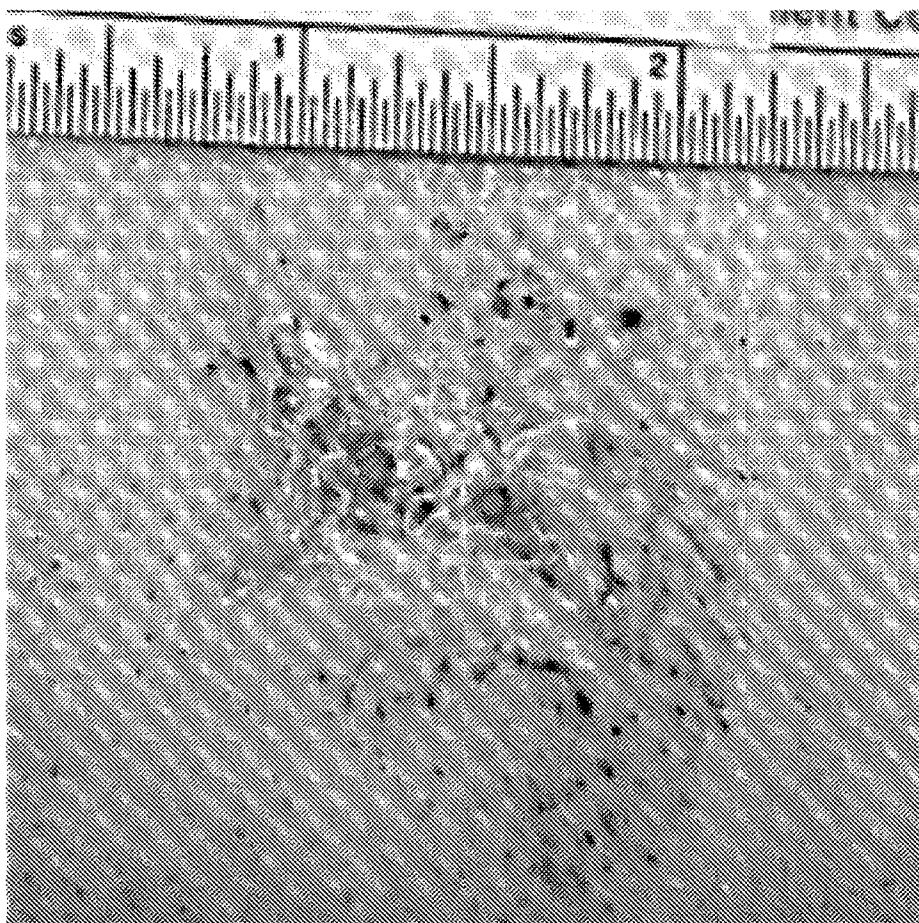


FIG. 3E

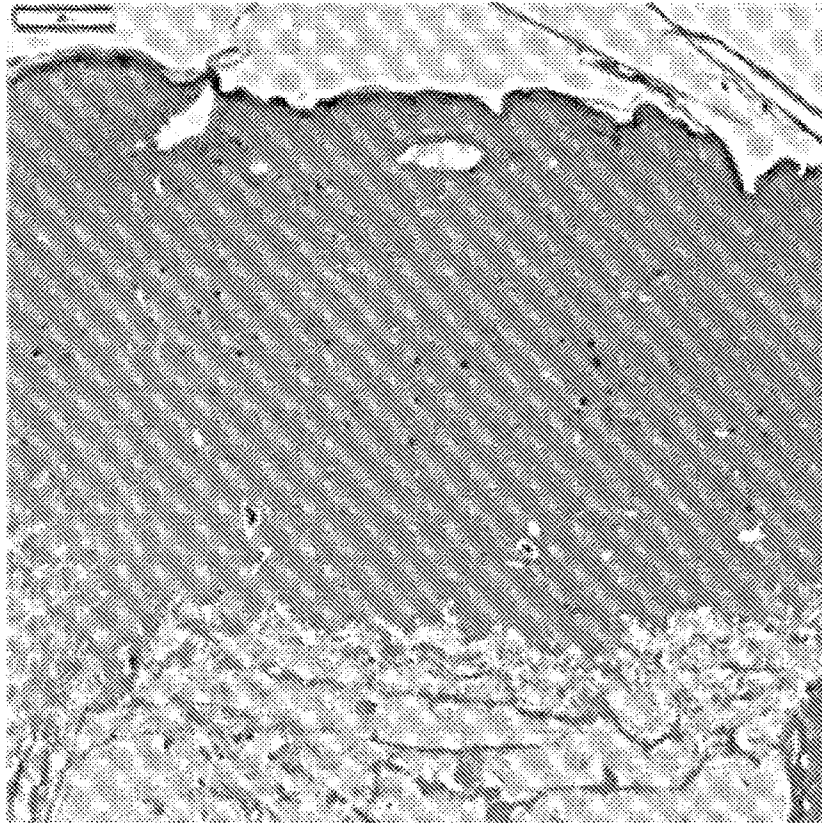


FIG. 3F



FIG. 4A

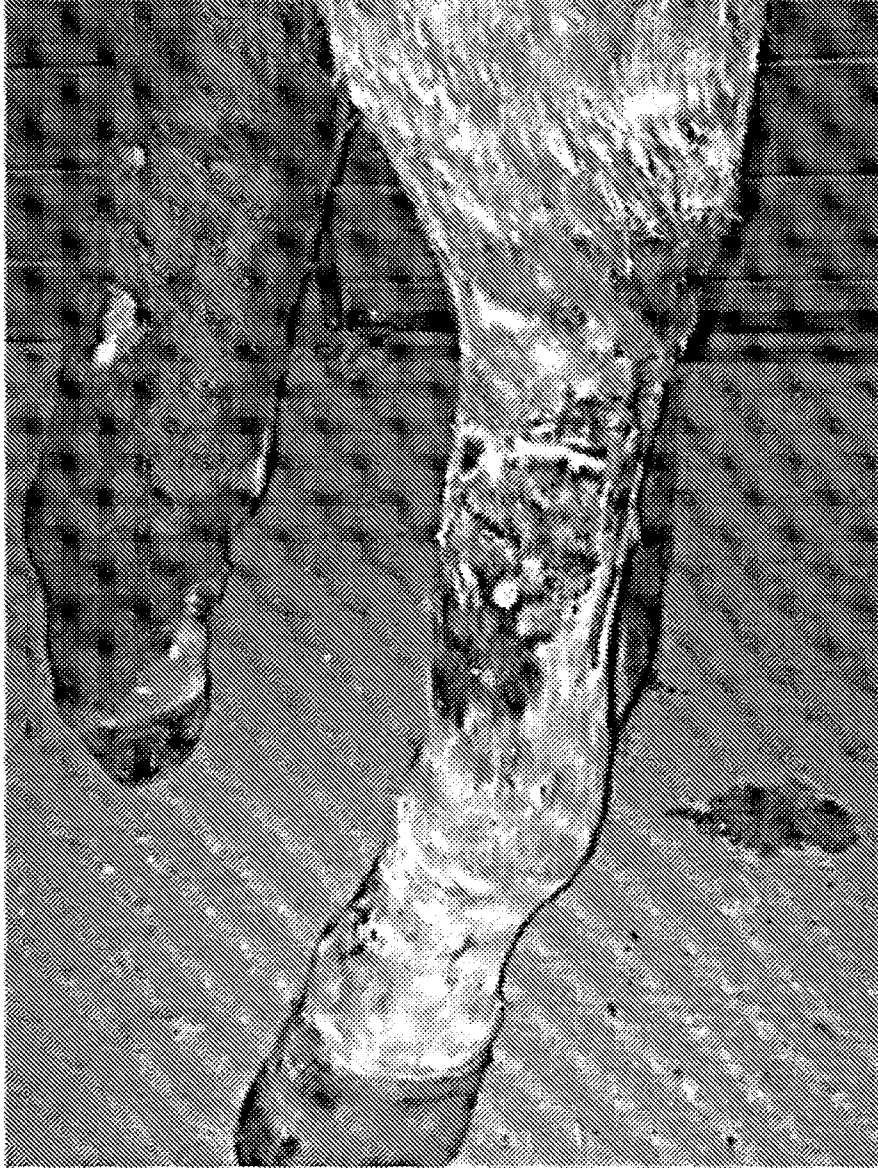


FIG. 4B



FIG. 4C

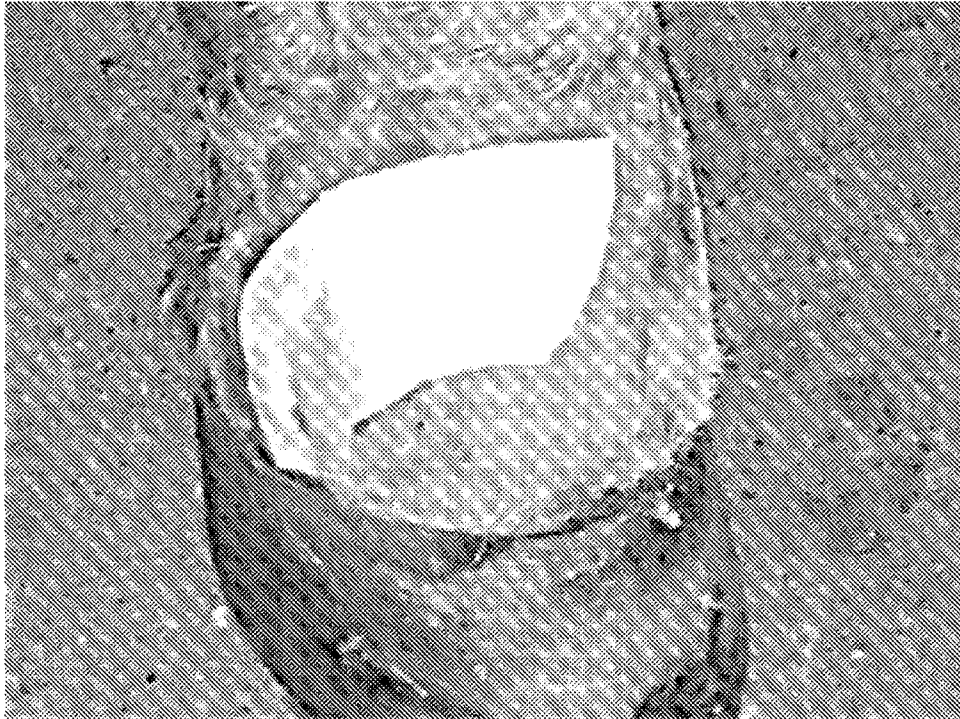


FIG. 4D

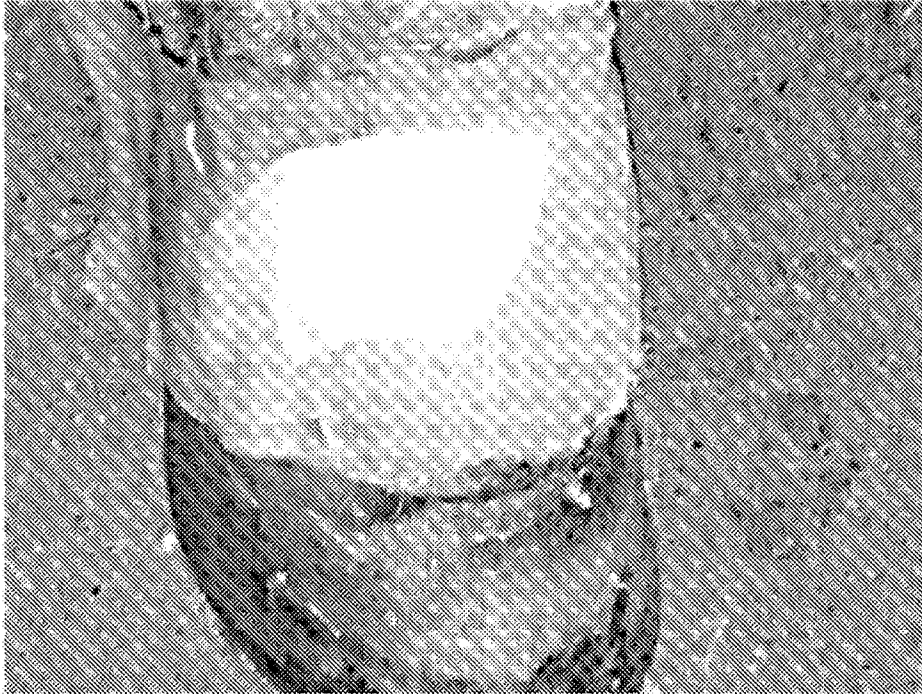


FIG. 4E



FIG. 4F



FIG. 5A

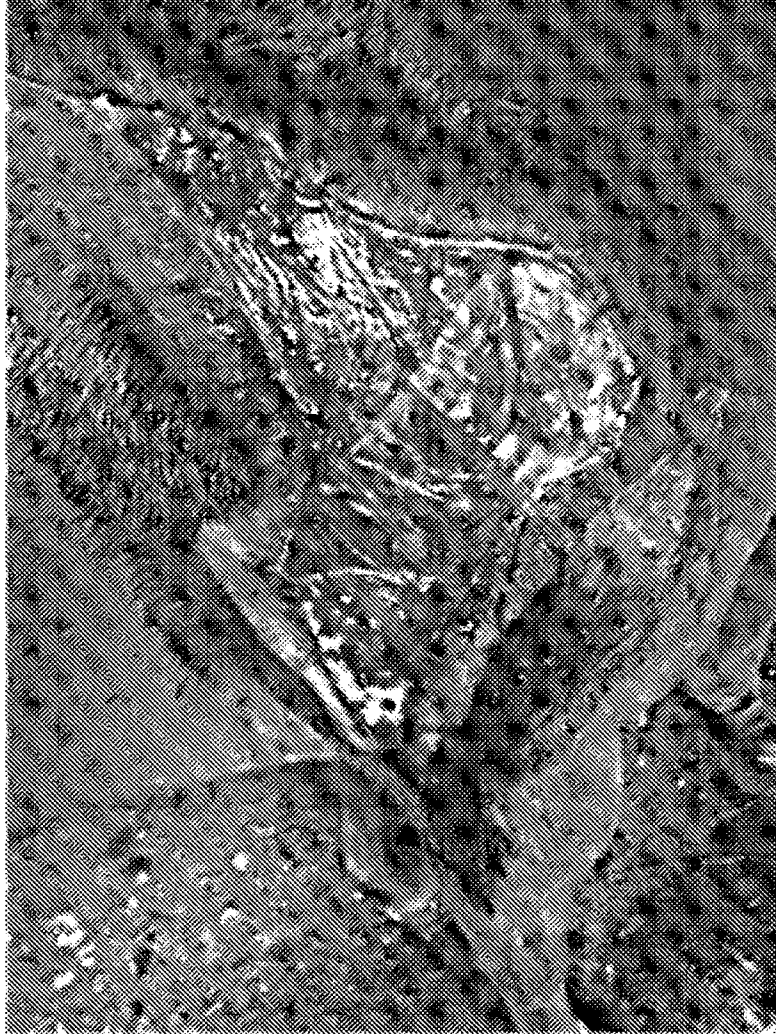


FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 5D

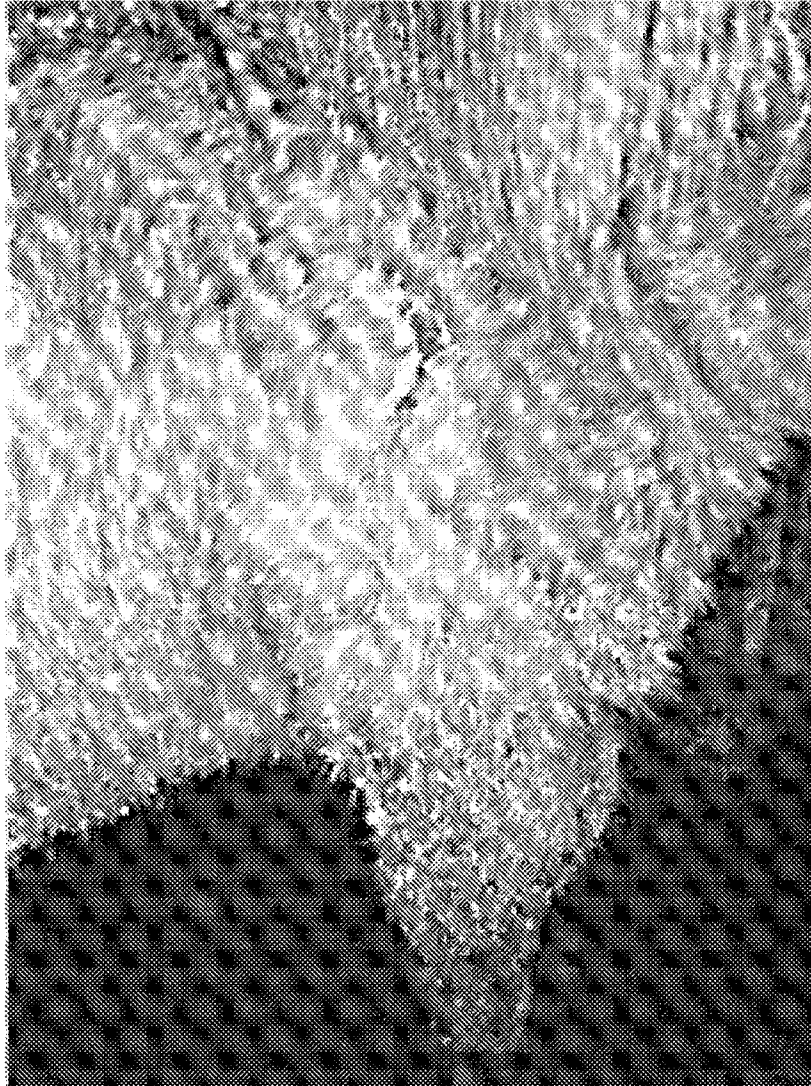


FIG. 5E

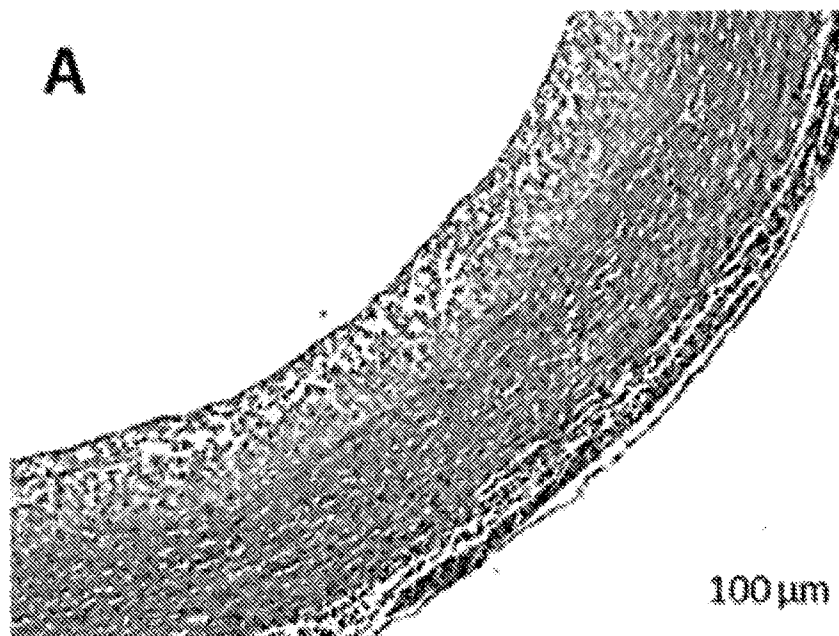


FIG. 6A

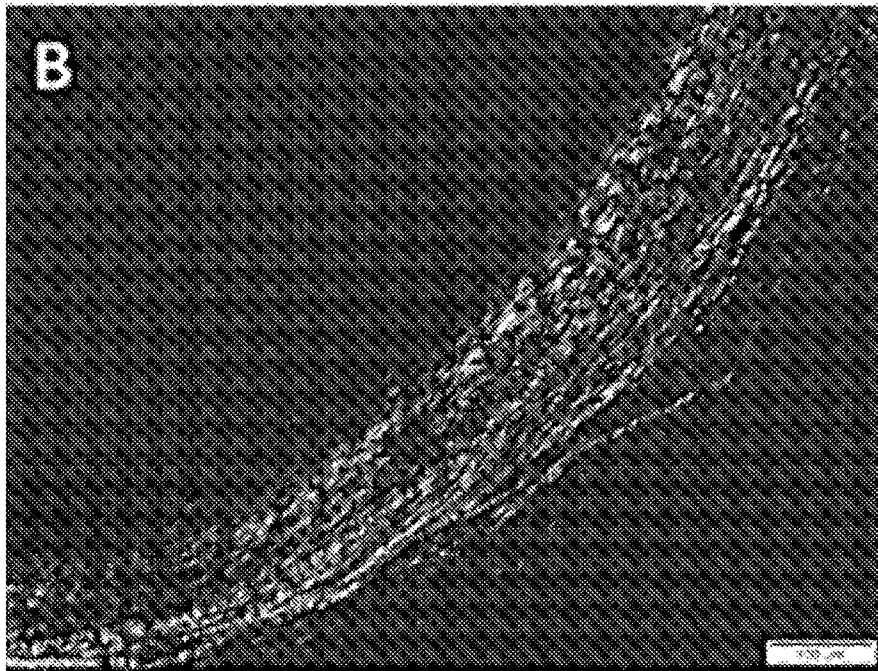


FIG. 6B



FIG. 6C

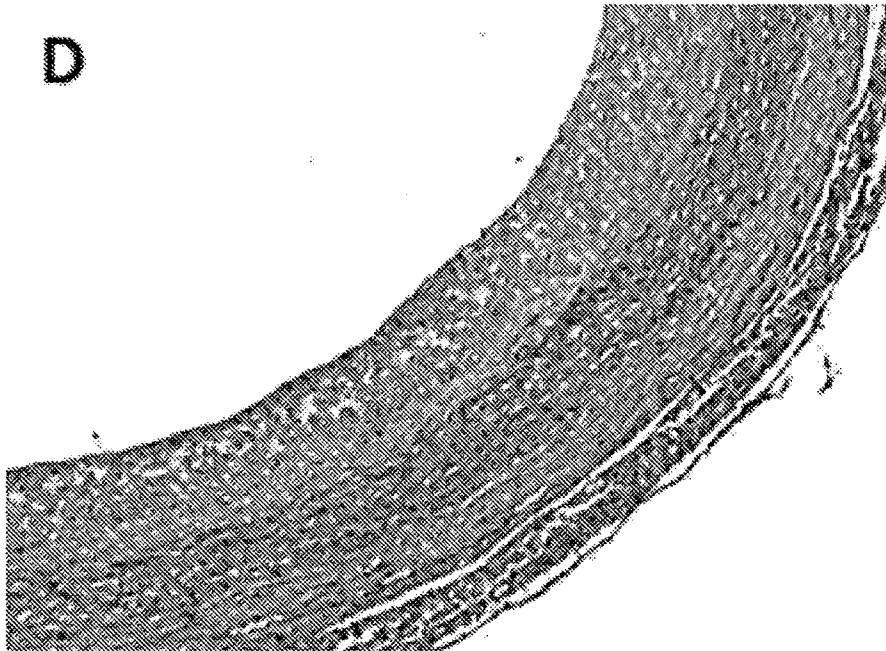


FIG. 6D

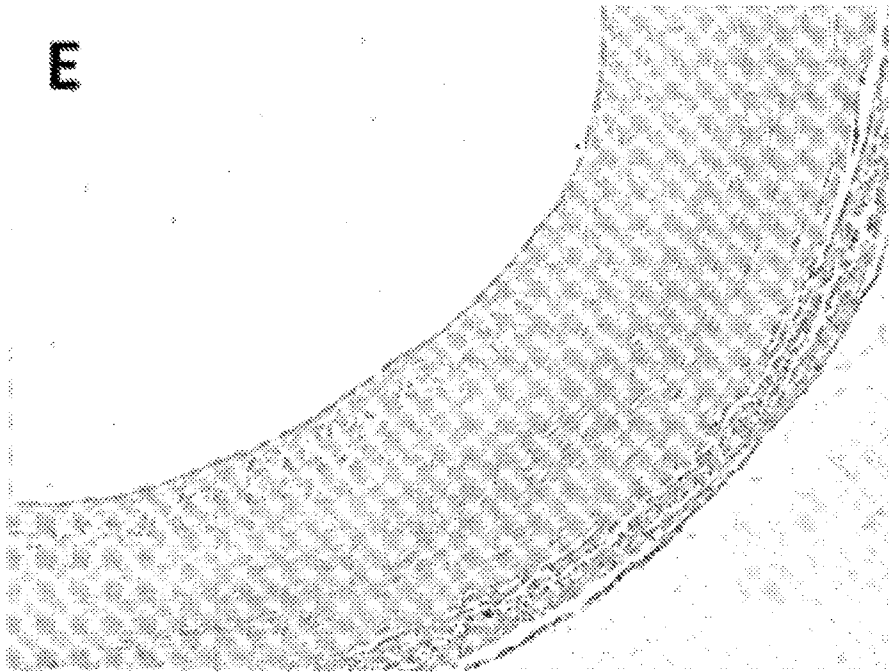


FIG. 6E

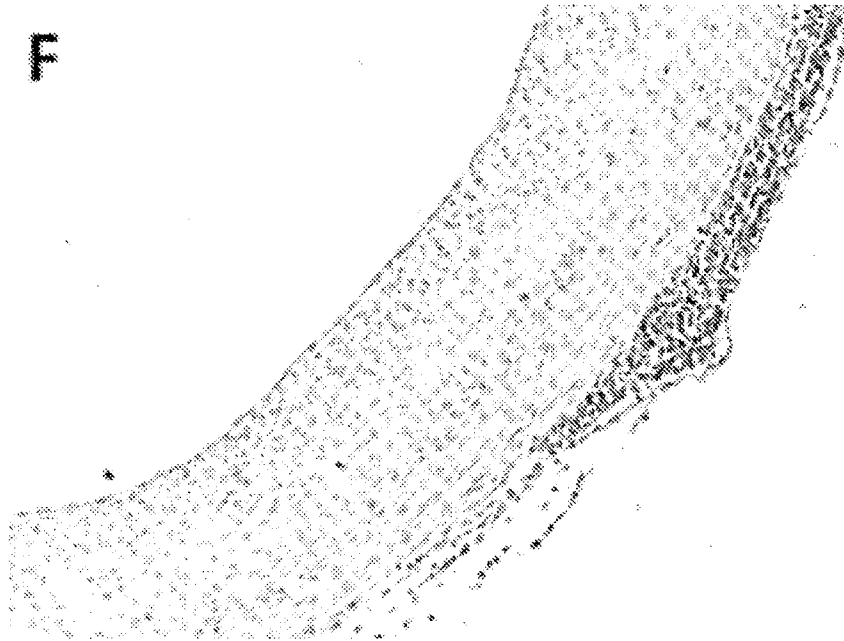


FIG. 6F

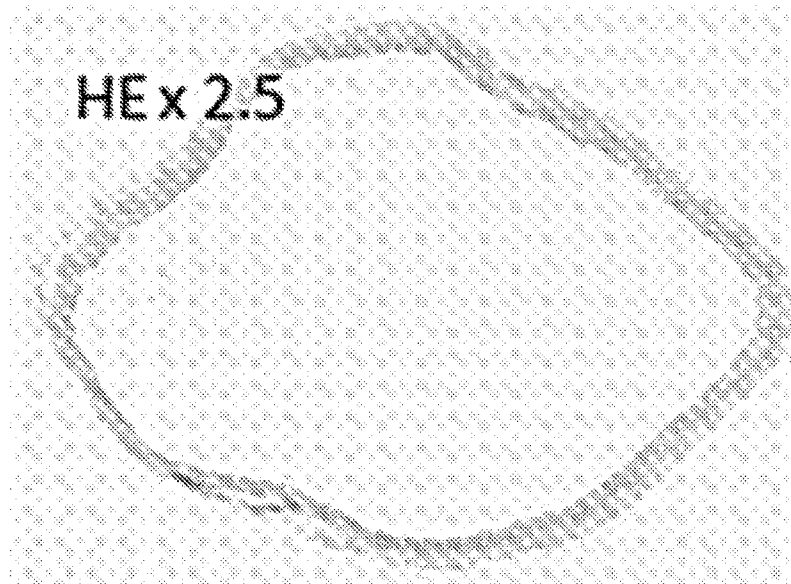


FIG. 7A

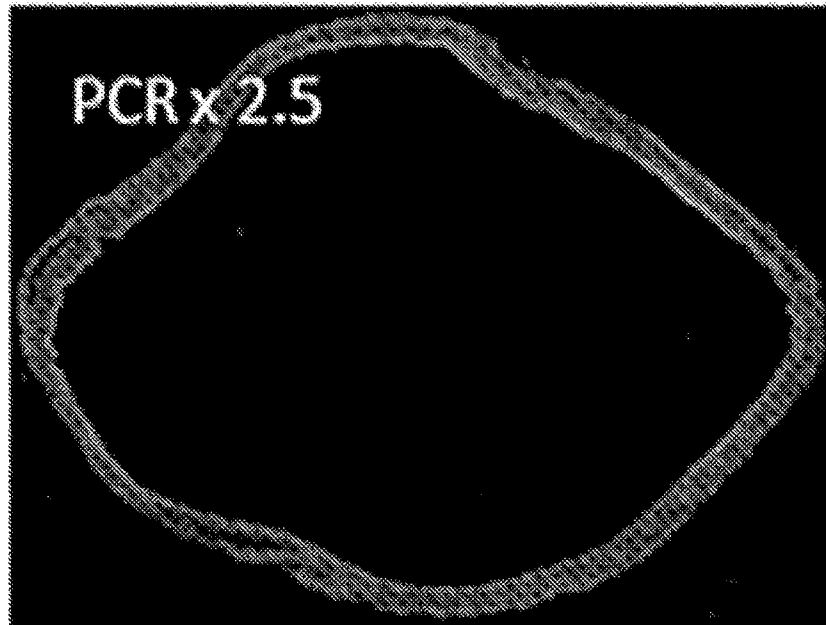


FIG. 7B

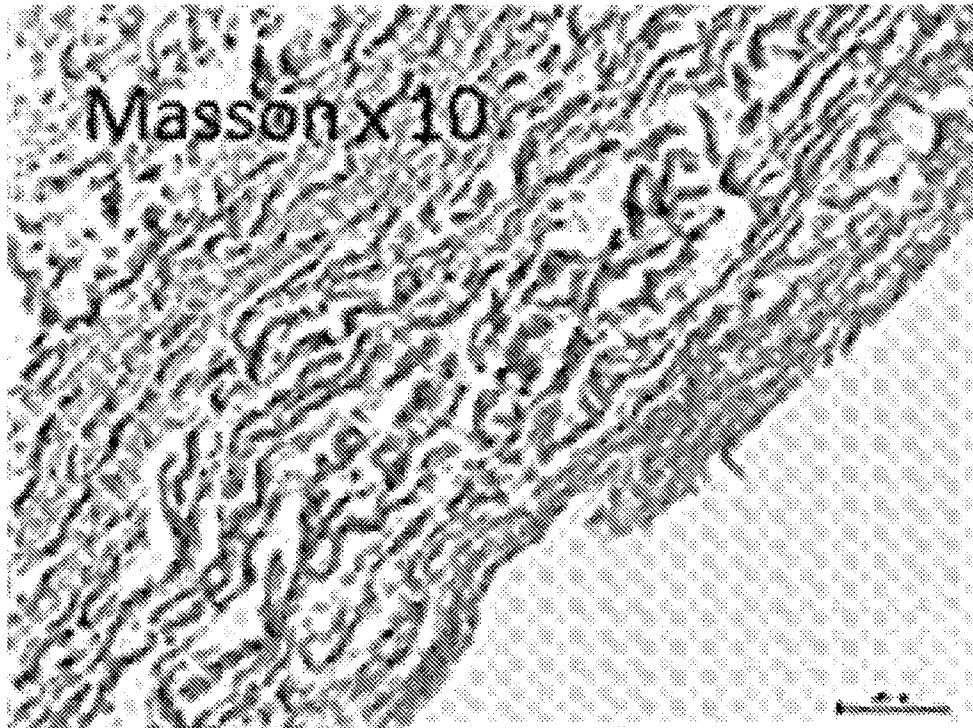


FIG. 7C

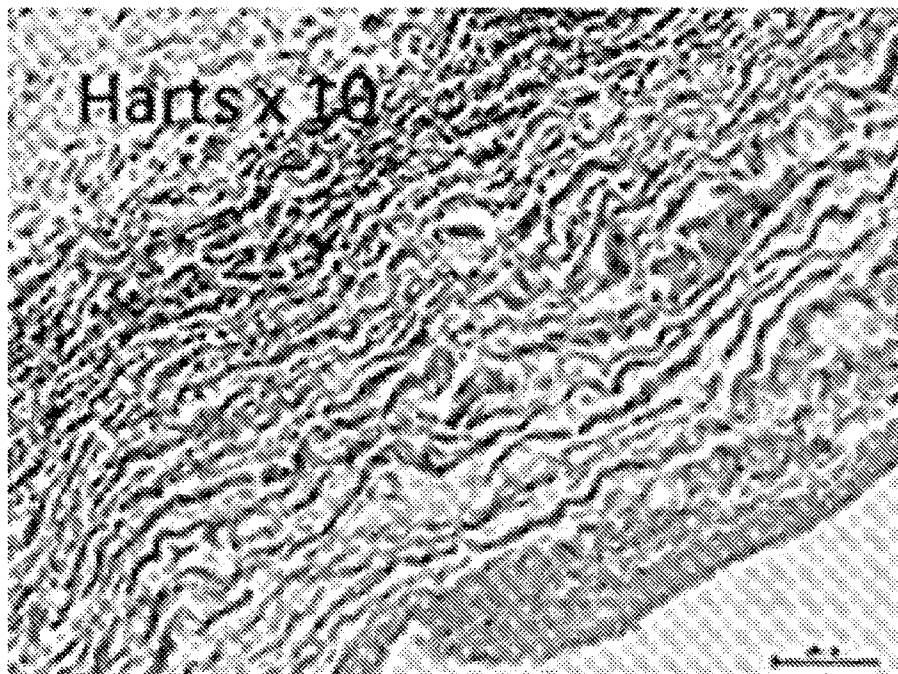


FIG. 7D

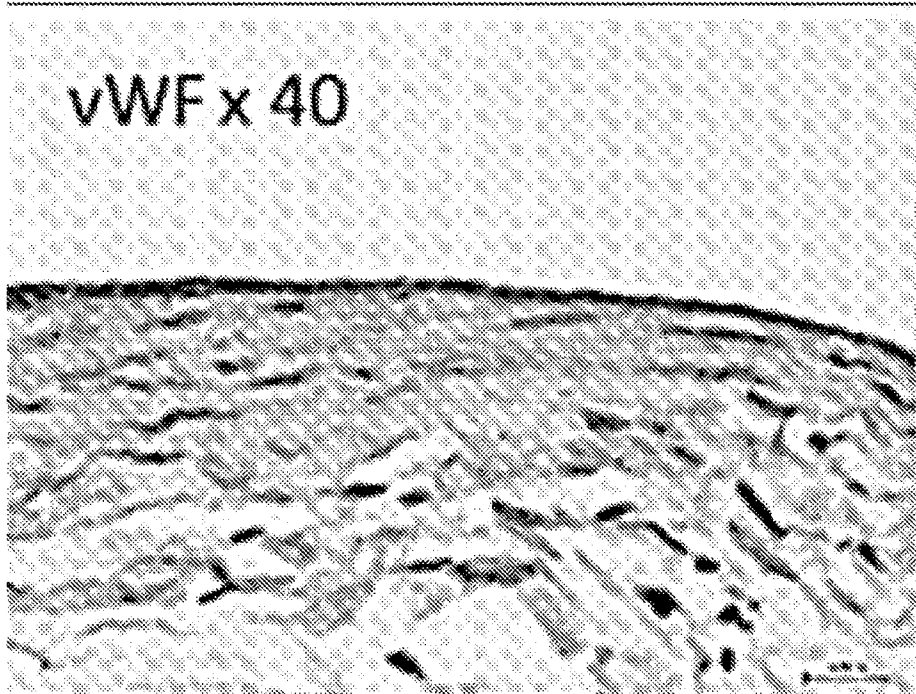


FIG. 7E

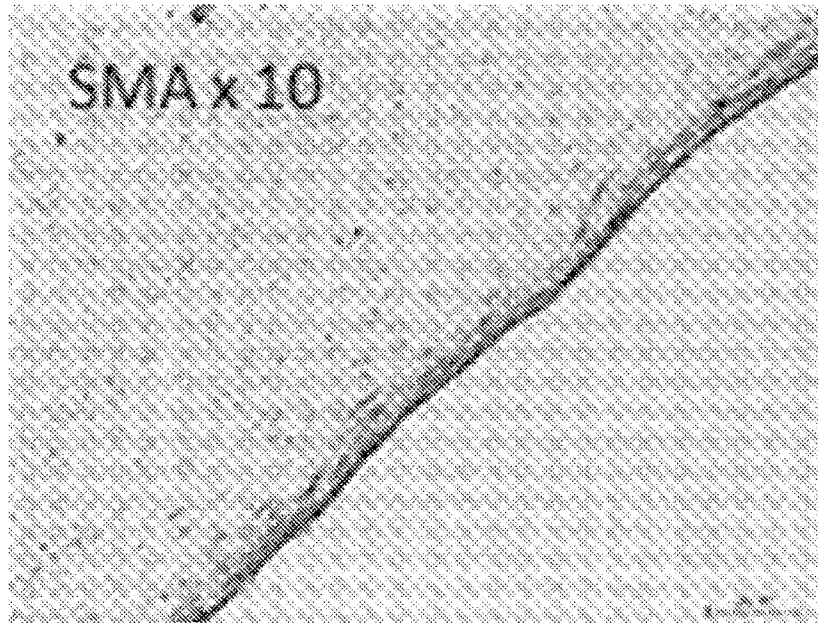


FIG. 7F

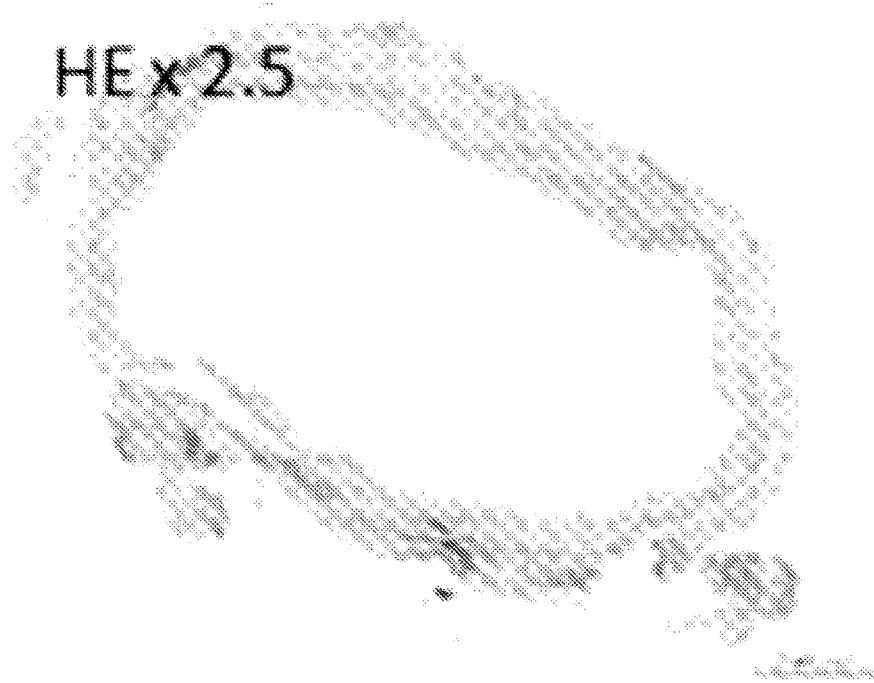


FIG. 8A

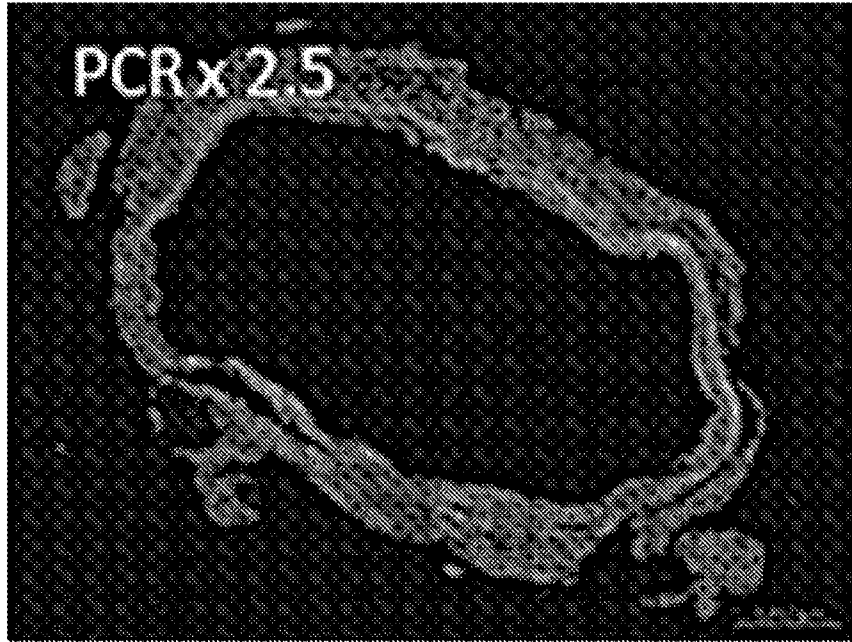


FIG. 8B

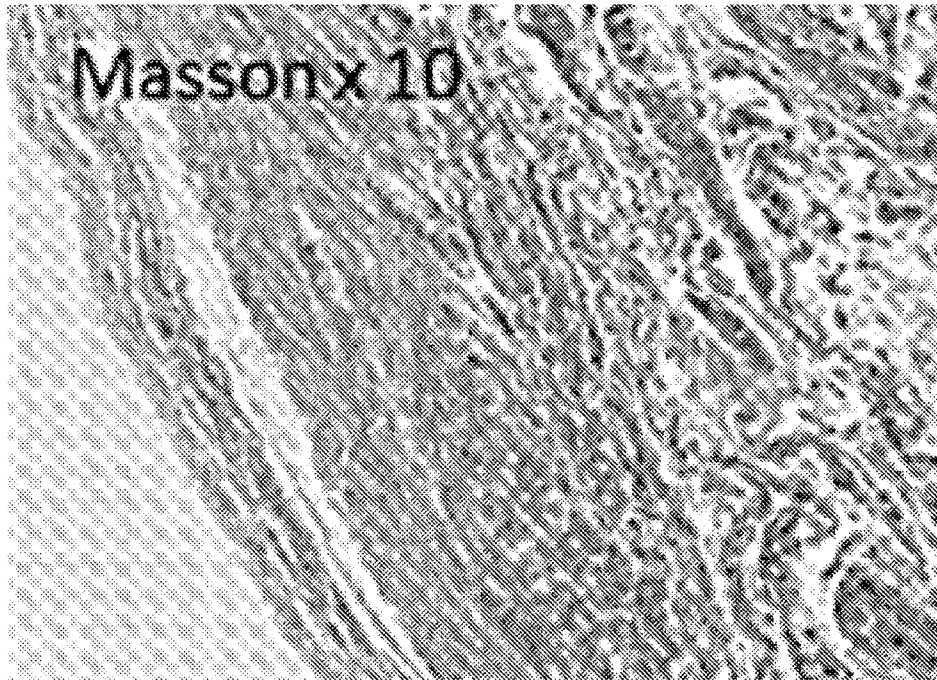


FIG. 8C

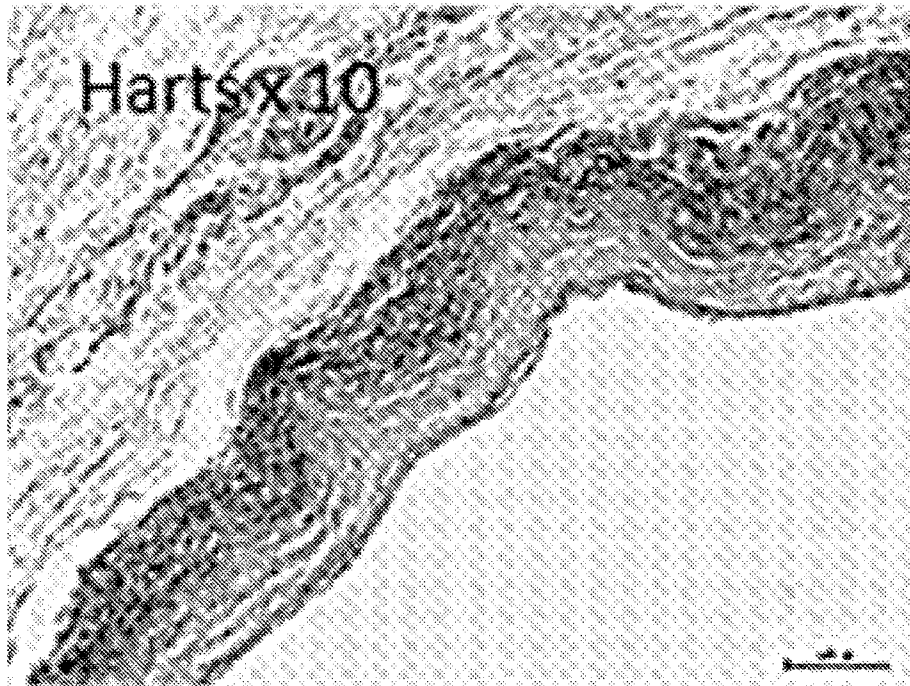


FIG. 8D

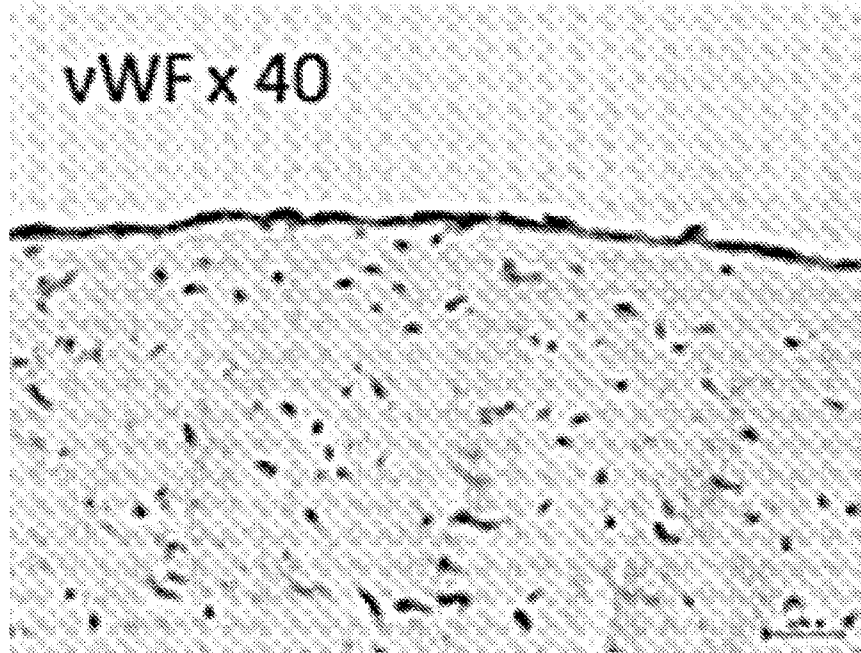


FIG. 8E

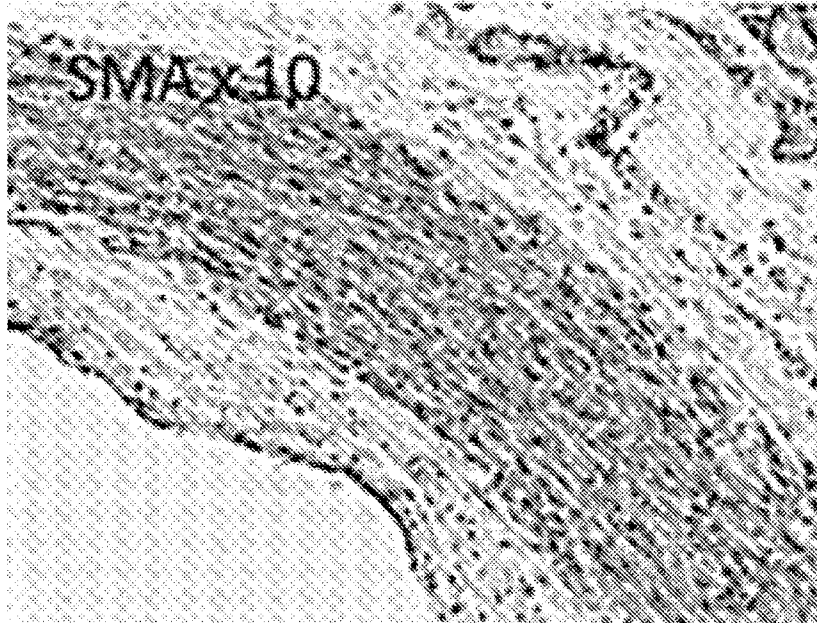


FIG. 8F

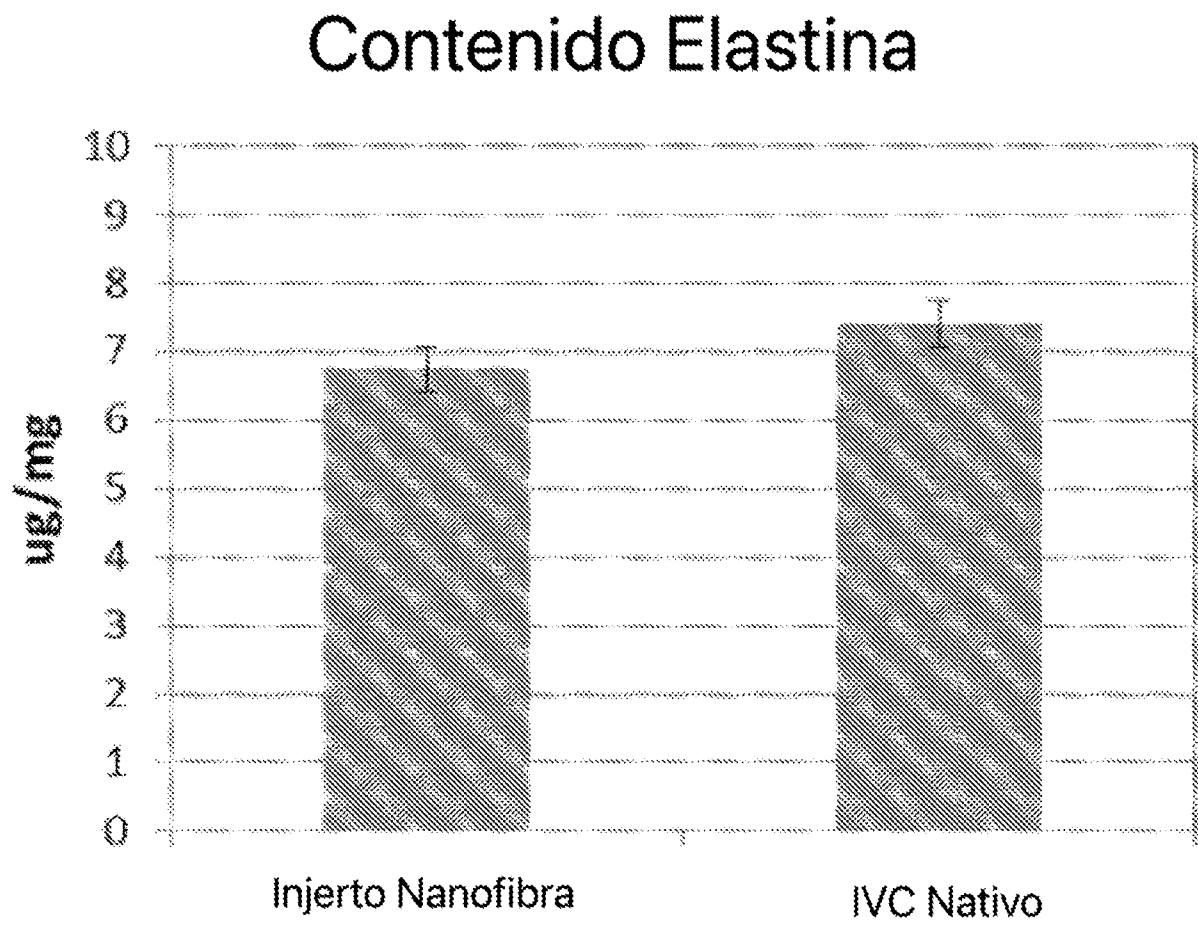


FIG. 9A

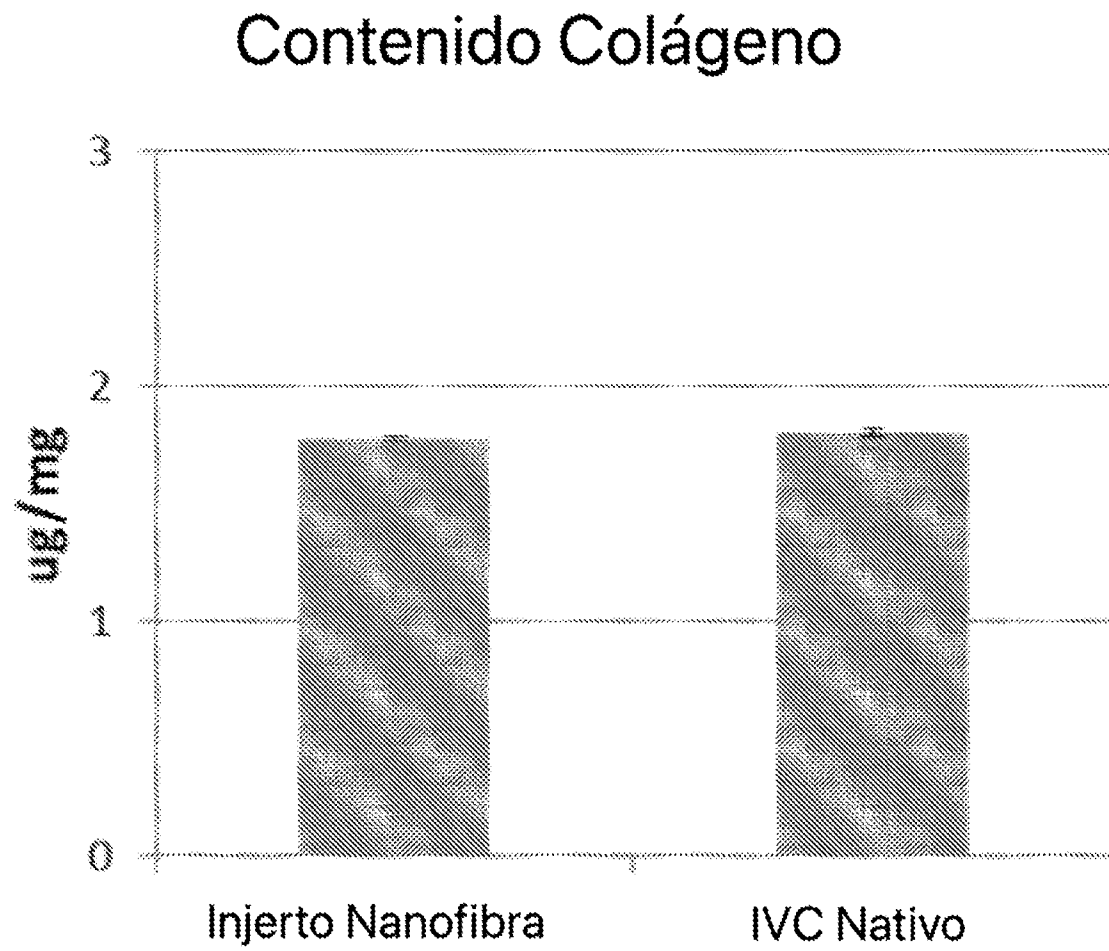


FIG. 9B

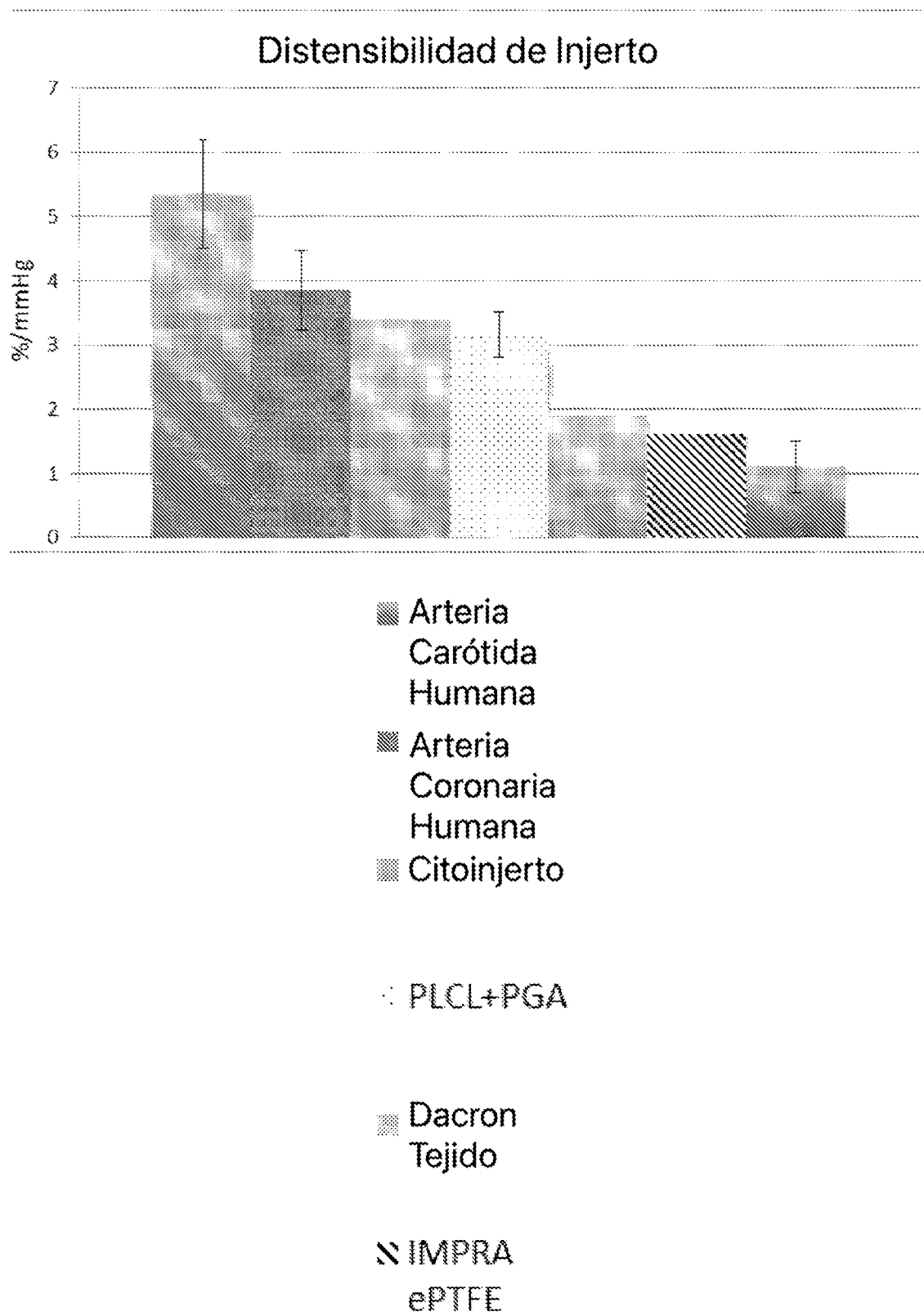


FIG. 10

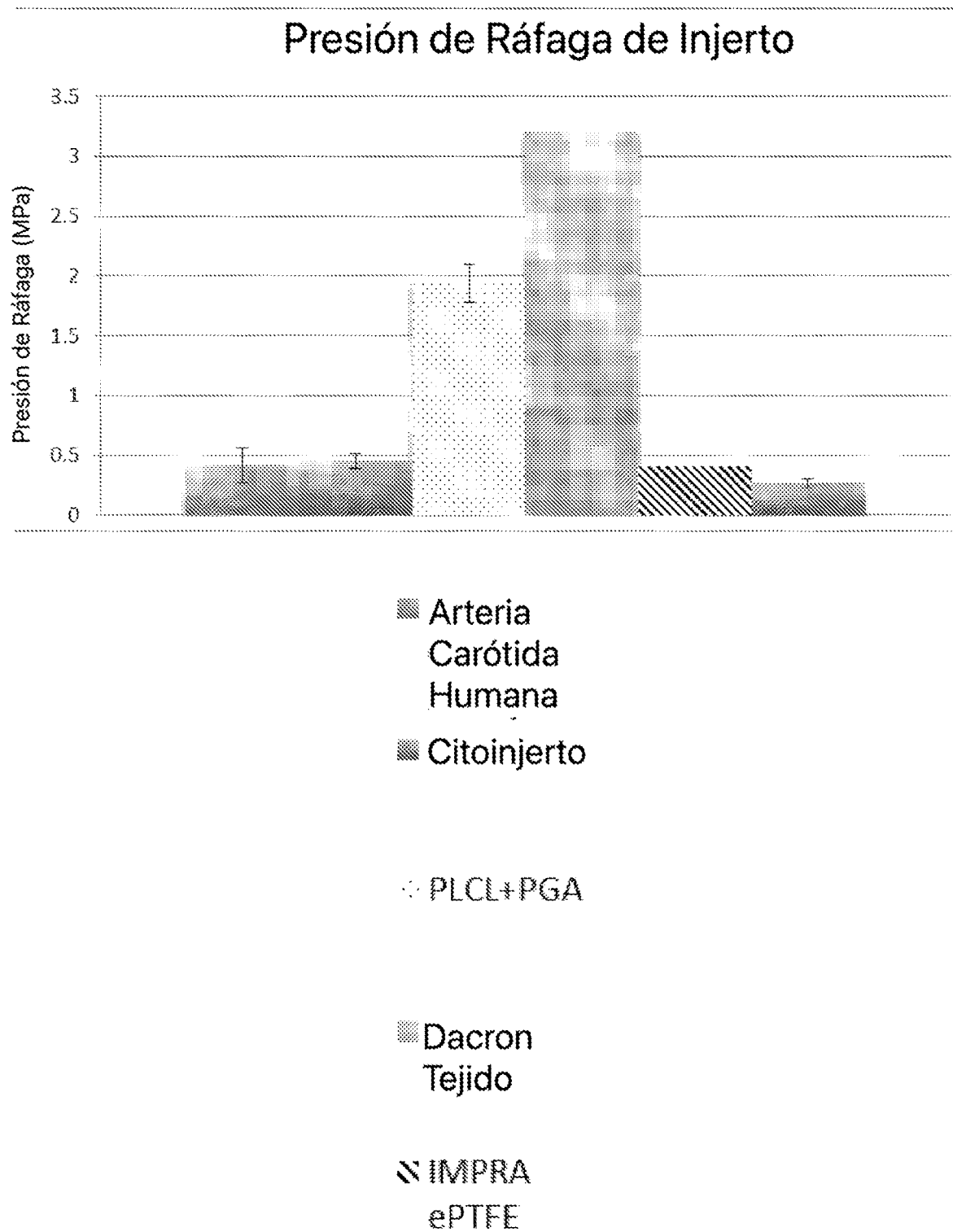


FIG. 11

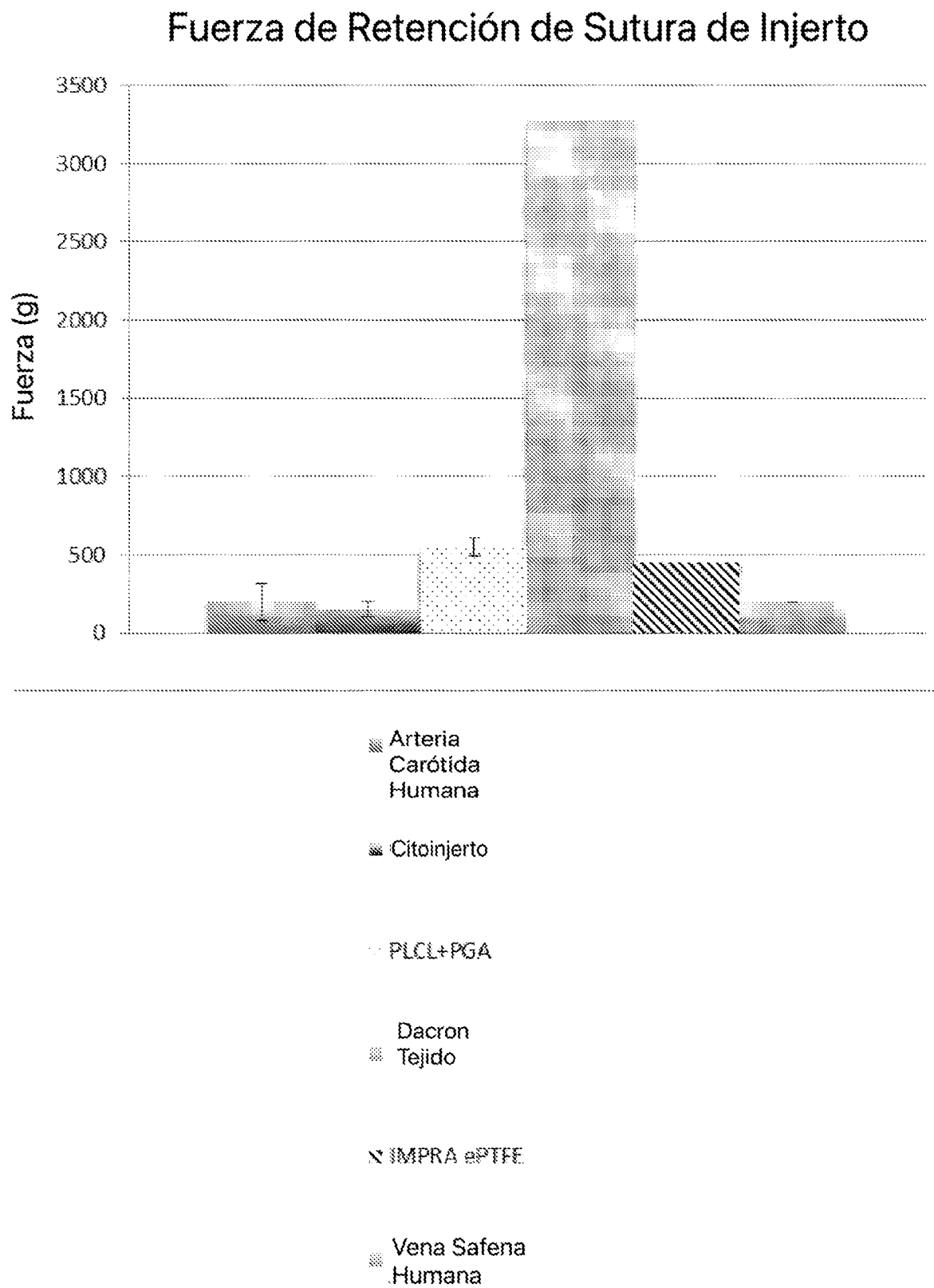


FIG. 12

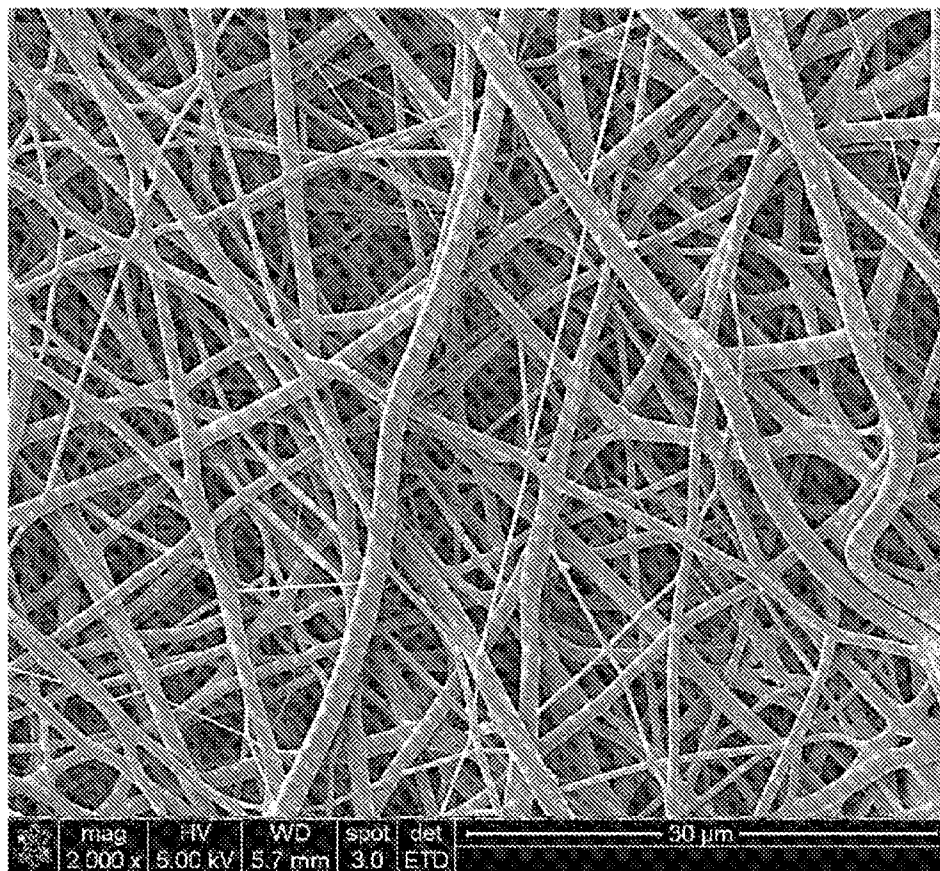


FIG. 13A

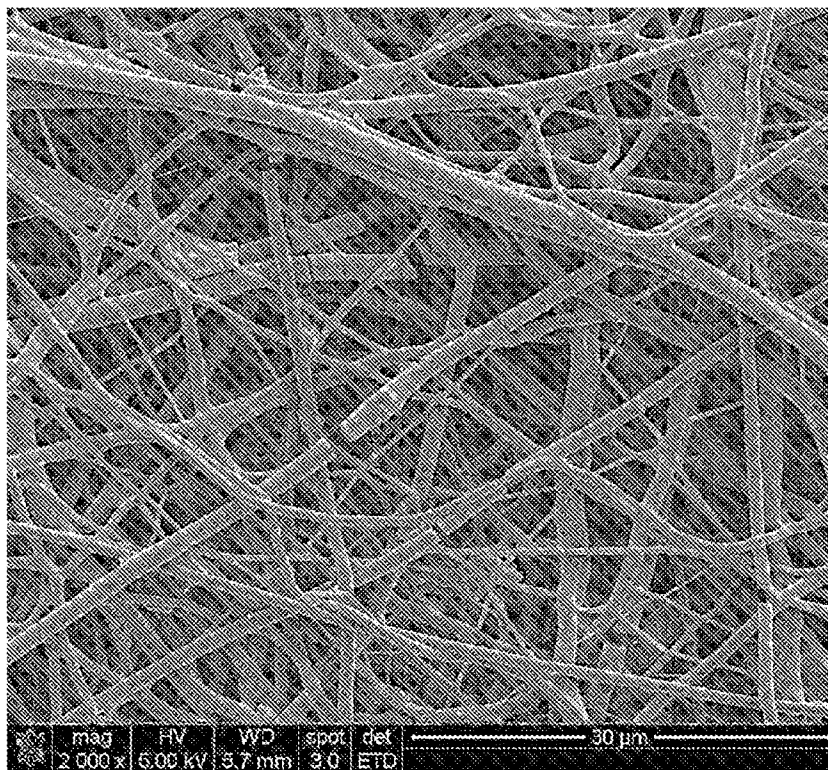


FIG. 13B

UTS

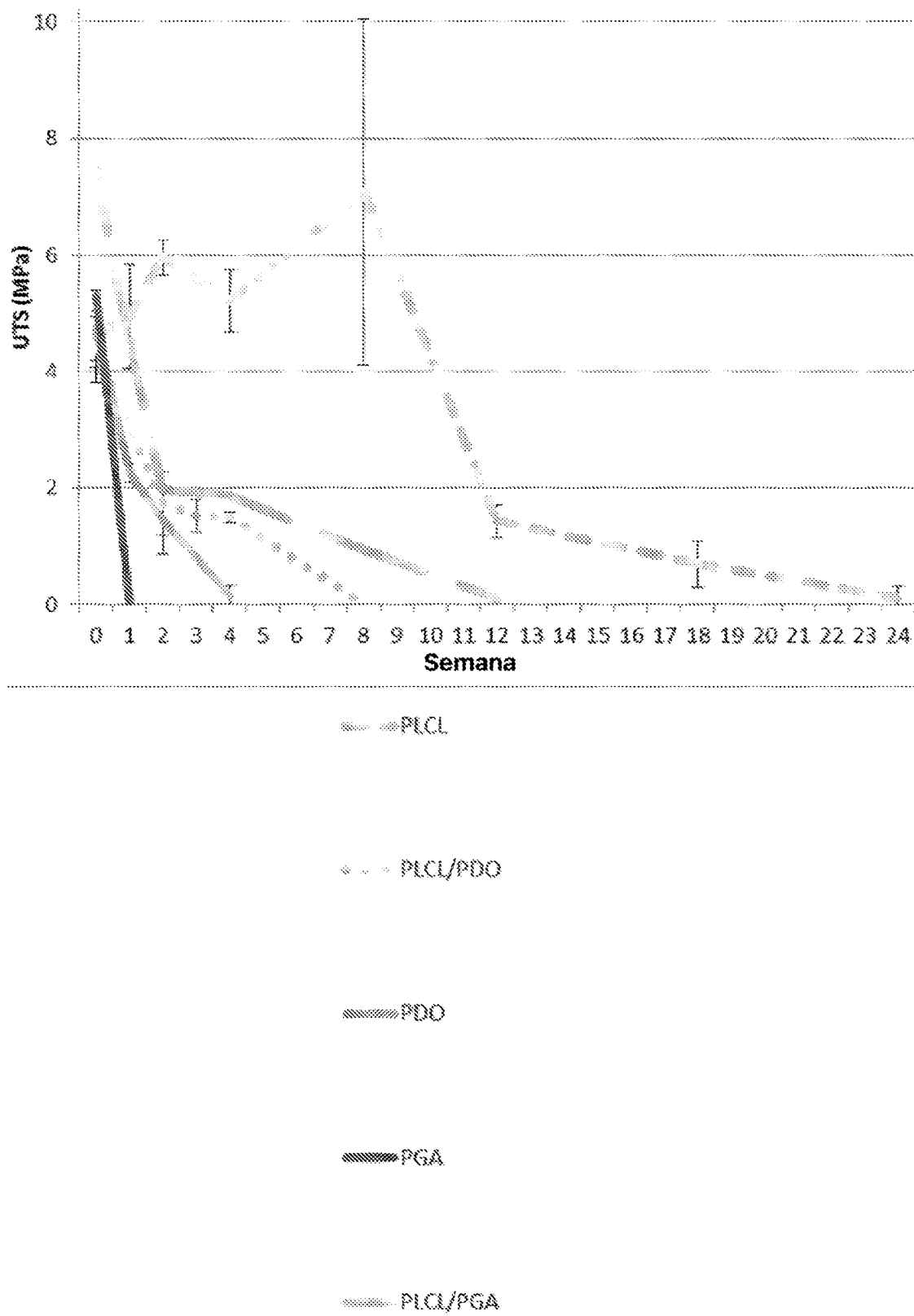


FIG. 14