

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 713**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/10** (2006.01)

**A61K 9/72** (2006.01)

**A61K 31/573** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005 E 05851715 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1833462**

54 Título: **Procedimiento de fabricación farmacéutica para calentar suspensiones estériles de glucocorticoides.**

30 Prioridad:

**16.11.2004 GB 0425266**

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

**27.06.2013**

73 Titular/es:

**NORTON HEALTHCARE LIMITED (100.0%)  
Regent House 5-7 Broadhurst Gardens Swiss  
Cottage  
London NW6 3RZ, GB**

72 Inventor/es:

**MILLER, JOHN;  
RONALD, PAUL;  
ASHLEY, ADRIAN;  
LAMB, PAUL;  
MACDONALD, DONALD;  
OLIVER, MARTIN y  
POLLARD, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 409 713 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**

Procedimiento de fabricación farmacéutica para calentar suspensiones estériles de glucocorticoides.

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación farmacéutica y particularmente a un procedimiento para esterilizar glucocorticosteroides.

**Antecedentes de la invención**

10 Los fármacos estériles proporcionan muchos beneficios, tanto médicamente como económicamente. Las ramificaciones médicas que requieren preparaciones de fármacos estériles son claras porque el uso de preparaciones no estériles puede someter al paciente a un riesgo innecesario de infección secundaria de microbios contaminantes, microbios que son por lo menos resistentes a los fármacos de la preparación. Además, aunque el contaminante sea inocuo, su crecimiento puede producir pérdida de los fármacos activos *per se* con posible generación concomitante de subproductos tóxicos. Desde el punto de vista económico, los fármacos contaminados tienen una vida útil más corta, lo que requiere un aumento de los gastos de producción para reemplazar productos con mayor frecuencia.

15 Se necesitan métodos para la preparación de productos estériles para uso de los pacientes. Sin embargo, el problema asociado con muchos procedimientos de esterilización es que el procedimiento produce a menudo cambios desfavorables en el perfil del fármaco. Estos cambios en el perfil del fármaco pueden ir desde pérdida de actividad hasta un aumento de los productos de degradación que se crean, o una posible alteración de las características químicas o físicas del compuesto esterilizado. Estos problemas son especialmente acusados cuando se esterilizan glucocorticosteroides.

20 La esterilización de materiales se basa en el aporte de suficiente energía que sea letal para cualquier contaminación microbiana potencial. Se han propuesto numerosos métodos para la esterilización de los glucocorticosteroides incluyendo calor, radiación, y compuestos químicos. Sin embargo, hasta hoy estos métodos a menudo dan como resultado la producción excesiva de degradantes o una pérdida de actividad del glucocorticosteroide que se esteriliza. Adicionalmente, como en el caso de formulaciones de glucocorticosteroides en suspensión para inhalación de dosis medidas, los procedimientos de esterilización utilizados comúnmente a menudo producen cambios inaceptables en el tamaño de partícula del fármaco.

25 La esterilización química, en su mayor parte, se ha basado en la exposición a compuestos tóxicos, por ejemplo, óxido de etileno. Sin embargo, cuando se utiliza óxido de etileno para esterilizar glucocorticosteroides, se ha encontrado que quedan cantidades residuales de óxido de etileno en la preparación del fármaco. El óxido de etileno es tóxico y los niveles residuales están a menudo por encima de los límites farmacéuticamente aceptables fijados por la mayoría de las agencias reguladoras.

30 La esterilización basada en la irradiación es conocida y ha sido recomendada para los glucocorticosteroides (véase Ilium and Moeller en Arch. Pharm. Chemi. Sci., Ed. 2, 1974, pp. 167- 174). Sin embargo, se ha descrito una degradación importante cuando se ha utilizado la irradiación para esterilizar glucocorticosteroides micronizados.

35 El documento WO 00/25746 (Chiesi) describe un procedimiento para preparar una suspensión de un glucocorticosteroide. En una primera etapa se mezcla un vehículo acuoso en un turboemulsificador y se esteriliza por tratamiento con calor o por filtración. En una segunda etapa se añade al vehículo acuoso, un ingrediente activo micronizado (p.ej. un glucocorticosteroide), pre-esterilizado por radiación gamma.

40 El documento WO 03/086347 (Chiesi) describe alguna de las desventajas del documento WO 00/25746 y describe una mejora en el procedimiento de modo que el ingrediente activo se introduce en un turboemulsificador como un polvo haciendo el vacío en el turboemulsificador. De nuevo se esteriliza el ingrediente activo antes de su dispersión en el vehículo acuoso.

45 Ninguno de estos documentos describe la esterilización por calentamiento de una suspensión acuosa de un glucocorticosteroide y por tanto no se ocupan del problema del crecimiento del tamaño de partícula durante las etapas de calentamiento y subsiguiente enfriamiento.

50 El documento US 3.962.430 (O'Neill) describe un método para la producción de soluciones isotónicas estériles de agentes medicinales. El método comprende añadir el agente medicinal a una solución saturada de cloruro de sodio en agua a 100 °C. La solución de fármaco/cloruro de sodio saturado se calienta entonces a 100-130 °C. Este método, que supuestamente se basa en la teoría de que los iones de cloruro de sodio absorben el agua libre con lo que evitan la degradación hidrolítica, no es adecuado para las suspensiones de partículas finas de glucocorticosteroides destinadas a la inhalación, ya que el procedimiento produce cambios desfavorables en el

tamaño de las partículas. Adicionalmente, el procedimiento puede dar como resultado la formación de puentes entre las partículas de fármaco produciendo grandes agregados, que no se rompen durante la administración.

5 Con el fin de resolver el problema del crecimiento de las partículas, en el documento US 6.392.036 (Karlsson) se describe un método para la esterilización por calor seco de los glucocorticosteroides pulverizados que se pueden utilizar después para formulaciones del fármaco. Sin embargo, este método produce niveles inaceptables de productos de degradación por calor.

El documento WO 2004/078102 (Dompe) describe un método para esterilizar una suspensión acuosa de un glucocorticoesteroide que consiste solamente en el glucocorticoesteroide y agua. Se proporcionan detalles mínimos del aparato de esterilización.

## 10 **Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un método para preparar una suspensión estéril de un glucocorticoesteroide que comprende las siguientes etapas:

15 (i) calentar una suspensión de glucocorticoesteroide que comprende un glucocorticoesteroide, agua y un tensioactivo en un recipiente de mezclado que comprende una línea de recirculación que incorpora un homogeneizador, para esterilizar la suspensión de glucocorticoesteroide,

(ii) recircular la suspensión de glucocorticoesteroide mediante el homogeneizador (a) durante la etapa (i), (b) después de la etapa (i), (c) durante y después de la etapa (i), o (d) antes y durante y después de la etapa (i), y posteriormente,

20 (iii) mezclar la suspensión de glucocorticoesteroide con agua estéril o con un líquido excipiente estéril que comprende agua y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

## **Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1: Representación del aparato utilizado para la esterilización de una suspensión de un glucocorticoesteroide de acuerdo con la presente invención.

25 Fig. 2: Diagrama de flujo que muestra la metodología para la esterilización de la suspensión del glucocorticoesteroide utilizando el aparato representado en la Fig. 1.

Figuras 3-5: Representación de partes específicas del aparato representado en la Fig. 1.

## **Descripción detallada de la invención**

30 Como se usa aquí, "glucocorticoesteroide" se refiere a cualquiera de un grupo de hormonas esteroideas (incluyendo derivados, análogos sintéticos, y pro-fármacos), tales como cortisona, que son producidas por la corteza suprarrenal. Estos compuestos están implicados en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, y grasas. Adicionalmente, los glucocorticoesteroides pueden tener propiedades anti-inflamatorias.

35 Los ejemplos no limitantes de glucocorticoesteroides, que se pueden utilizar en la presente invención, incluyen beclometasona, budesonida, ciclesonida, cortivazol, deflazacort, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluticasona, mometasona, rofleponida, tipredano y triamcinolona. Preferiblemente, se utilizan budesonida, beclometasona (p.ej. el dipropionato), ciclesonida, fluticasona, mometasona y triamcinolona. Muy preferiblemente, se utilizan budesonida y beclometasona (p.ej. el dipropionato).

40 Los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el significado comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención, a menos que se defina otra cosa. Se hace referencia aquí a diferentes metodologías y materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de farmacología incluyen Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10<sup>th</sup> Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2001). Cualquiera de los materiales y/o métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para llevar a cabo la presente invención.

45 Las patentes y las publicaciones científicas que se mencionan aquí establecen los conocimientos de los expertos en la técnica. Cualquier discrepancia entre cualquiera de las referencias citadas aquí y las enseñanzas específicas de esta memoria descriptiva se resolverá a favor de esta última. De la misma manera, cualquier discrepancia entre una definición dada por la técnica de una palabra o frase y una definición de la palabra o frase indicada específicamente en esta memoria descriptiva se resolverá a favor de esta última.

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas gramaticales singulares, incluyendo las formas singulares "un," "una" y "el", "la" engloban también específicamente los referentes plurales de los términos a los que se refieren a menos que el contexto indique claramente otra cosa. En adición, como se usa aquí, a menos que se indique específicamente otra cosa, la palabra "o" se utiliza en el sentido de "inclusive" correspondiente a "y/o" y no en el sentido de "exclusive" correspondiente a "uno u otro."

Como se usa en esta memoria descriptiva, tanto si aparecen en una frase de transición como en el núcleo de una reivindicación, los términos "comprende (comprenden)" y "que comprende (que comprenden)" se deben interpretar con un significado abierto. Esto es, los términos se deben interpretar como sinónimos de las frases "que tienen al menos" o "que incluyen al menos". Cuando se usa en el contexto de un procedimiento, el término "que comprende" significa que el procedimiento incluye al menos las etapas detalladas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se usa en el contexto de un compuesto o composición, el término "que comprende" significa que el compuesto o composición incluye al menos las características o componentes detallados, pero puede incluir también características o componentes adicionales.

Más adelante en esta memoria se hace referencia en detalle a realizaciones específicas de la invención. Aunque la invención se describirá conjuntamente con estas realizaciones específicas, se debe entender que no se pretende limitar la invención a tales realizaciones específicas. En la siguiente descripción, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar un mejor entendimiento de la presente invención. La presente invención se puede poner en práctica sin alguno de estos detalles específicos o sin ninguno de ellos. En otros casos, no se han descrito en detalle operaciones de procedimientos bien conocidos, con el fin de no hacer innecesariamente confusa la presente invención

La Fig. 1 muestra una representación esquemática del aparato 1 utilizado para fabricar y llenar lotes de una suspensión estéril de glucocorticosteroide. Se prepara un líquido excipiente, preferiblemente una solución del excipiente, en un primer recipiente 2. Alternativamente, el primer recipiente 2 se carga simplemente con agua. El primer recipiente 2 está provisto de un mezclador 3 y una línea de recirculación 4. Se fabrica entonces una suspensión concentrada de glucocorticosteroide y se esteriliza antes de ser diluida con el agua estéril o con el líquido excipiente estéril. Por lo tanto, el aparato 1 está provisto de un segundo y tercer recipientes 5 y 6. El segundo y tercer recipientes 5 y 6 están conectados al primer recipiente 2 por la línea 7 que tiene un filtro 8 de grado esterilizante. Antes, durante y/o después de la esterilización de la suspensión concentrada de glucocorticosteroide, se recircula la suspensión mediante la línea 9 de recirculación y el homogeneizador 10. Después de la esterilización, se pasa la suspensión concentrada de glucocorticosteroide esterilizada por la línea 11 de recirculación para dilución con el agua o el líquido excipiente estériles en el segundo recipiente 5. Se pasa entonces la suspensión por la línea 12 para llenarla en envases apropiados en la máquina 13 de soplado-llenado-sellado (blow-fill-seal (BFS)). Estas etapas del procedimiento se resumen en la Fig. 2.

Cada etapa será descrita ahora en más detalle.

Se prepara el líquido excipiente en un primer recipiente 2. Antes de la mezcla, se limpia el primer recipiente 2 y se sanitiza o se esteriliza *in situ*, por ejemplo utilizando agua para inyectables (WFI) caliente seguido por sanitización con vapor utilizando vapor a temperaturas no inferiores a 100 °C durante no menos de 15 minutos. Después de sanitización o esterilización se introduce el agua o se prepara el líquido excipiente según se requiera. El líquido excipiente comprende agua y un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tensioactivo y preferiblemente comprende además otros excipientes, diluyentes, etc. farmacéuticamente aceptables, tales como al menos un tampón, al menos una sal, y al menos un agente humectante, agente estabilizante y/o agente isotónico. Los tensioactivos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y son ejemplos de los mismos los polisorbatos, p.ej. polisorbato 80. Los componentes se pueden añadir en cualquier orden aunque preferiblemente la cantidad requerida de agua, p.ej. agua para inyectables, se carga en el recipiente de mezclado seguida por los otros componentes que se añaden al agua circulante por medio de una tolva de alimentación (no se muestra).

En esta etapa se añade preferiblemente al menos aproximadamente el 50 %, más preferiblemente aproximadamente 70-90 % de la cantidad total de tensioactivo requerida en la suspensión de glucocorticosteroide estéril. Después de esta adición, se lava la tolva de alimentación con la solución circulante y se mezcla la solución, p.ej. durante 10 minutos, para asegurar la disolución completa utilizando un mezclador 3 y la línea de recirculación 4 para formar el líquido excipiente que es preferiblemente una solución homogénea de excipiente.

Se prepara y se esteriliza una suspensión concentrada de un glucocorticosteroide en el tercer recipiente 6 (denominado también el "recipiente del concentrado"). El tercer recipiente 6 tiene una línea de recirculación 9 que incorpora un homogeneizador 10. Sin embargo, antes de la esterilización de la suspensión de glucocorticosteroide, el resto del aparato 1 incluyendo el segundo recipiente 5, el tercer recipiente 6 y la línea de filtración 7 así como cualquier componente adicional, se puede limpiar y esterilizar *in situ*, por ejemplo utilizando agua para inyectables caliente seguida por vapor a temperaturas de aproximadamente 122 °C a aproximadamente 138 °C durante no menos de 30 minutos. Después de la esterilización, el segundo recipiente 5 y cualquier otro componente del aparato 1 limpios y esterilizados, se mantienen continuamente con presión positiva para mantener la esterilidad del sistema y

de los contenidos durante la subsiguiente fabricación y llenado del lote. La presión positiva se puede mantener utilizando aire comprimido estéril.

5 Se esteriliza el agua o el líquido excipiente, y el segundo recipiente 5 y el tercer recipiente 6 se cargan con el agua o con el líquido excipiente. La esterilización del agua o del líquido excipiente se completa por filtración mediante un filtro 8 de grado esterilizante durante la transferencia del agua o de la solución del excipiente desde el primer recipiente 2 a ambos, el segundo recipiente 5 y el tercer recipiente 6. Sin embargo, se podrían emplear métodos alternativos de esterilización, tales como el tratamiento con calor del líquido excipiente.

10 El tercer recipiente 6 se aísla del segundo recipiente 5 y el tercer recipiente 6 se abre. En esta etapa se añade el tensioactivo al agua o se puede añadir tensioactivo adicional al líquido excipiente en el tercer recipiente 6 con el fin de facilitar la formación de una suspensión estable. Preferiblemente la concentración del tensioactivo en la suspensión de glucocorticosteroide concentrada es de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 300 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 60 mg/ml. Se añade entonces el glucocorticosteroide al tercer recipiente 6. El glucocorticosteroide no necesita haber sido esterilizado en esta etapa. Se puede añadir un exceso del glucocorticosteroide si hubiera alguna pérdida del glucocorticosteroide en el proceso durante la fabricación y llenado de la suspensión del producto a granel.

15 La concentración del glucocorticosteroide en esta suspensión de glucocorticosteroide "concentrada" es preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 300 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 mg/ml. En adición, se prefiere que al menos el 50 % del glucocorticosteroide en la suspensión de glucocorticosteroide esté en la forma de una suspensión durante el calentamiento, siendo mantenido el resto en solución. Más preferiblemente, al menos el 60 % está en la forma de una suspensión.

Se sella entonces el tercer recipiente 6. Los contenidos del tercer recipiente 6 preferiblemente se recirculan, p.ej. durante al menos aproximadamente 1 min, preferiblemente durante al menos aproximadamente 10 minutos formando una suspensión homogénea de glucocorticosteroide.

25 El tercer recipiente 6 tiene al menos dos aberturas abastecidas por una línea 9 de recirculación. La línea 9 de recirculación permite que el contenido del tercer recipiente 6 sea sacado del tercer recipiente 6 por una primera abertura y re-cargado en el tercer recipiente 6 por una segunda abertura. Se prefiere que la primera abertura esté en el fondo del tercer recipiente 6 y que la segunda abertura esté en la parte superior. La fuerza requerida para recircular el contenido es proporcionada por el homogeneizador 10. El contenido del tercer recipiente 6 se hace pasar también a través del homogeneizador 10 cuando es recirculado. Puesto que la homogenización del contenido, esto es, la suspensión de glucocorticosteroide, tiene lugar cuando pasa a través de la línea 9 de recirculación, el tercer recipiente 6 no requiere ningún mecanismo interno para la agitación del contenido. De hecho, en una realización preferida, el tercer recipiente 6 está libre de cualquier mecanismo de agitación y lo más preferiblemente el tercer recipiente 6 consiste esencialmente en una cubierta metálica (p.ej. de acero inoxidable) que tiene una pluralidad de aberturas para cargar y evacuar el recipiente. Aunque la forma del tercer recipiente 6 no es crítica, con el fin de evitar cualquier espacio muerto donde el contenido pueda llegar a quedar atrapado y a ser incapaz de ser evacuado, el tercer recipiente es preferiblemente cilíndrico y más preferiblemente tiene un fondo cónico estrechado hacia la primera abertura. La simplicidad del tercer recipiente 6 es particularmente ventajosa porque reduce el número de partes activas y el área superficial global sobre la que se pone en contacto la suspensión de glucocorticosteroide, con lo que se reduce cualquier pérdida de fármaco por adhesión a las superficies, reduciendo las posibles fuentes de contaminación y reduciendo el tiempo requerido para la limpieza del aparato.

40 Se aplica calor al tercer recipiente 6 sellado utilizando un calefactor 14, tal como una camisa de vapor. La suspensión de glucocorticosteroide, el tercer recipiente 6, la línea 9 de recirculación y el homogeneizador 10 se esterilizan *in situ* mediante transferencia de calor desde el calefactor. El calentamiento se realiza a una temperatura esterilizante efectiva durante un tiempo efectivo de esterilización, preferiblemente a una temperatura de 45 aproximadamente 101 a aproximadamente 145 °C, más preferiblemente de aproximadamente 122 °C a aproximadamente 138 °C, durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 180 minutos, más preferiblemente durante al menos aproximadamente 30 minutos.

50 En esta etapa, la suspensión de glucocorticosteroide se hace circular alrededor del tercer recipiente 6, de la línea 9 de recirculación y del homogeneizador 10 para asegurar la esterilización efectiva del sistema y de la suspensión de glucocorticosteroide. La Fig. 3 muestra la recirculación de la suspensión de glucocorticosteroide durante la esterilización por calor indicando en detalle la línea 9 de recirculación. Opcionalmente, se puede pre-tratar el concentrado para reducir la distribución del tamaño de partícula del glucocorticosteroide hasta un valor pre-especificado, incluyendo la circulación a través del homogeneizador. La suspensión de glucocorticosteroide se circula preferiblemente durante la etapa de calentamiento aunque se puede circular alternativamente o en adición, después de la etapa de calentamiento, o antes y durante y después de la etapa de calentamiento. Mediante la recirculación de la suspensión concentrada de glucocorticosteroide a través de un homogeneizador 10, se puede evitar un aumento indeseado del tamaño de partícula.

El homogeneizador 10 es un dispositivo conocido en la técnica en el que una suspensión de un material en forma de partículas, aquí la suspensión del glucocorticosteroide, se somete a un cizallamiento energético porque la suspensión se fuerza a pasar a través del mismo. El homogeneizador proporciona una fuerza de cizallamiento suficientemente alta para causar la rotura de los agregados de partículas en la suspensión y una reducción del tamaño de las partículas sólidas. No es apropiado un intervalo numérico preciso para el nivel de cizallamiento, dado que el nivel de cizallamiento dependerá de la viscosidad de la suspensión. El homogeneizador 10 puede ser un homogeneizador de alto cizallamiento en línea (p.ej. un Silverson 150L) o, para una reducción más eficiente y mejor del tamaño de partícula, un homogeneizador de alta presión (p.ej. un Niro Panda). Un homogeneizador de alto cizallamiento tiene típicamente un cabezal mezclador que comprende aspas giratorias y un estator perforado con las aspas del rotor colocadas dentro del estator. Un homogeneizador de alta presión comprende típicamente una bomba, que puede producir presiones de hasta aproximadamente 150 MPa (1500 bares), y una o más cámaras de interacción en las que el paso del fluido a través de los pases de caudal a alta presión y acción de flujo controlada somete al fluido a condiciones de alta turbulencia y cizallamiento.

La suspensión de glucocorticosteroide esterilizada se mezcla entonces con el agua estéril o con la solución estéril de excipiente mantenida dentro del segundo recipiente 5 por medio de una línea 11 de recirculación para formar una suspensión de glucocorticosteroide esterilizada diluida, como se muestra en la Fig. 4. Típicamente la suspensión de glucocorticosteroide se diluye con el agua estéril o con el líquido excipiente estéril hasta una concentración farmacéuticamente adecuada. Preferiblemente la recirculación se realiza durante aproximadamente 45 minutos. La suspensión de glucocorticosteroide diluida se mantiene dentro del segundo recipiente 5 hasta que se requiere para llenado. Durante el mantenimiento de la suspensión se circula la misma de modo continuo mediante la línea 12 de recirculación entre el segundo recipiente 5 y la máquina 13 de soplado-llenado-sellado para mantener el material activo en suspensión, como se muestra en la Fig. 5. Las máquinas de soplado-llenado-sellado son bien conocidas en la técnica y son ejemplos de ellas las máquinas Rommelag Blow Fill Seal 3012, 305 y 4010 y las máquinas Weiler Engineering ASEP-TECH Blow Fill Seal 624, 628 y 640.

Antes del llenado, la máquina 13 de soplado-llenado-sellado se esteriliza, p.ej. por vapor a temperaturas de aproximadamente 122 °C a aproximadamente 138 °C durante no menos de 30 minutos. La máquina 13 de soplado-llenado-sellado puede usar cualquier material de envase primario farmacéuticamente aceptable. Típicamente se utiliza granulado de polietileno de baja densidad para formar el sistema de envase/cierre primario sobre la máquina 13 de soplado-llenado-sellado aunque se pueden utilizar también polietileno de alta densidad, polipropileno, poli(cloruro de vinilo) o tereftalato de polietileno. Se pueden utilizar también mezclas de estos materiales. La máquina 13 de soplado-llenado-sellado está configurada para presentar unidades abiertas en la parte superior al cabezal de llenado para cada ciclo de llenado de la máquina. La suspensión de glucocorticosteroide estéril se llena en las unidades formadas mediante una unidad de dosificación a tiempo/presión que suministra una medida precisa de la suspensión mediante las agujas de llenado. Después del llenado las agujas de llenado se retiran y la sección de cabeza del molde se cierra para sellar las unidades completamente. Las unidades llenas se separan entonces de la máquina 13 de soplado-llenado-sellado.

Ser "estéril" significa que un producto o composición cumple los criterios de esterilidad según la Farmacopea de Estados Unidos 27/NF22, 2004, o su equivalente en otras jurisdicciones, y que proporciona un glucocorticosteroide y/o una formulación farmacéutica terapéuticamente aceptables.

El término "aproximadamente" se usa aquí para significar cerca de, en la región de, en líneas generales, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un intervalo numérico, modifica este intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos indicados. En general, el término "aproximadamente" se usa aquí para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una variación del 20 %.

Como se usa aquí, el detalle de un intervalo numérico para una variable pretende indicar que la invención se puede practicar con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de dicho intervalo. De este modo, para una variable que es inherentemente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero del intervalo numérico, incluyendo los extremos del intervalo. Similarmente, para una variable, que es inherentemente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real del intervalo numérico, incluyendo los extremos del intervalo. Como ejemplo, una variable que se describe con valores entre 0 y 2, puede ser 0, 1 o 2 para las variables que son inherentemente discretas, y puede ser 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualquier otro valor real para las variables que son inherentemente continuas.

Los métodos y composiciones de la presente invención se pretenden utilizar con cualquier mamífero que pueda experimentar los beneficios de los métodos de la invención. Los más importantes entre dichos mamíferos son los seres humanos, aunque no se pretende que la invención se limite a ellos, y es aplicable para uso veterinario. De este modo, de acuerdo con la invención, "mamíferos" o "mamífero que lo necesite" incluyen los seres humanos así como los mamíferos no humanos, particularmente los animales domésticos incluyendo, sin limitación, gatos, perros, y caballos.

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones en suspensión de glucocorticosteroides esterilizados preparadas según los métodos del primer aspecto de la invención descrito antes. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica para tratar o aliviar los síntomas de enfermedades alérgicas y/o inflamatorias en un paciente mamífero. En estas realizaciones, las composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de glucocorticosteroide o glucocorticosteroides lábiles, esterilizados, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para indicar tratamientos a dosis eficaces para alcanzar el resultado terapéutico buscado. Además, los expertos apreciarán que la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención se puede reducir o aumentar mediante un fino ajuste y/o administrando más de un compuesto de la invención, o administrando un compuesto de la invención con otro compuesto. La invención proporciona por tanto un método para ajustar la administración/tratamiento a las exigencias particulares específicas para un mamífero dado.

Otras realizaciones contemplan composiciones que presentan el glucocorticosteroide en combinación con un segundo ingrediente activo. En algunas realizaciones, el segundo ingrediente activo se puede seleccionar de albuterol, bromuro de ipratropio, cromolina, formoterol, tiotropio, oxitropio y azelastina.

En otras realizaciones más de este aspecto, las composiciones de la invención se formulan para que sean adecuadas para administración oral, inhalación, administración rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, e intratraqueal). Preferiblemente la composición se formula para inhalación en cuyo caso el tamaño de partícula del glucocorticosteroide es preferiblemente tal que la  $Dv_{100}$  sea inferior a 20  $\mu\text{m}$ , la  $Dv_{90}$  sea inferior a 10  $\mu\text{m}$  y la  $Dv_{50}$  sea inferior a 5  $\mu\text{m}$ , donde  $Dv_n$  representa el diámetro volumétrico en el percentil n. El diámetro volumétrico es un término conocido en la técnica e indica el diámetro que tendría una esfera cuando tiene el volumen de la partícula. Los tamaños de partícula se pueden medir por técnicas estándar, tales como difracción de láser como se describe en los ejemplos que siguen. Tales tamaños de partícula se pueden alcanzar utilizando las condiciones de esterilización por calor que se describen en esta memoria.

Las formulaciones de las composiciones de la invención se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y se pueden preparar por técnicas farmacéuticas convencionales. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los compuestos de la invención y el vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como un diluyente o un excipiente. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o sólidos finamente divididos o con ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto.

Los glucocorticosteroides estériles preparados según la invención se formulan opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable con cualquiera de los portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos, incluyendo diluyentes y excipientes (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990 y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, 1995). El tipo de portador/vehículo farmacéuticamente aceptable empleado en la generación de las composiciones de este aspecto de la invención variará dependiendo del modo de administración de la composición al mamífero. Generalmente, los vehículos farmacéuticamente aceptables son fisiológicamente inertes y no tóxicos. Las formulaciones de las composiciones según la invención pueden contener más de un tipo de ingrediente farmacológicamente activo útil para el tratamiento del síntoma/enfermedad a tratar.

En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para utilizar las composiciones de la invención para tratar o aliviar los síntomas de enfermedades alérgicas y/o inflamatorias en un paciente mamífero. Dichos métodos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del glucocorticosteroide lábil en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En diferentes realizaciones de este aspecto, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del glucocorticosteroide, ya sea solo o en combinación con un segundo agente activo, es por administración oral, inhalación, administración rectal, oftálmica, vaginal, o parenteral. En algunas realizaciones, el glucocorticosteroide es budesonida mientras que en otras realizaciones más el glucocorticosteroide es beclometasona.

La invención proporciona además un glucocorticosteroide estéril, preferiblemente un glucocorticosteroide anti-inflamatorio, para uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas y/o inflamatorias. Las enfermedades alérgicas y/o inflamatorias a ser tratadas no necesitan estar limitadas a un único sitio anatómico, por ejemplo, la nariz o los pulmones, y las composiciones de la invención se formulan para administración apropiada al sitio del tratamiento. Las enfermedades alérgicas y/o inflamatorias incluyen, sin limitación, dermatitis de contacto, asma, rinitis, o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La invención proporciona también el uso de composiciones de glucocorticosteroides estériles, en la fabricación de un medicamento (preferiblemente un medicamento estéril) para uso en el tratamiento de enfermedades alérgicas y/o inflamatorias.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones de la invención y no son limitantes. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando únicamente la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes de las sustancias y procedimientos específicos descritos aquí.

**Ejemplos**

5 Ejemplos 1 a 3: Esterilización por calor de la budesonida

Se prepararon tres lotes de una suspensión estéril de budesonida. El ejemplo 1 (lote del solicitante W15711) contenía 0,125 mg/ml de budesonida, el ejemplo 2 (lote del solicitante W15641) contenía 0,25 mg/ml de budesonida y el ejemplo 3 (lote del solicitante Z00581) contenía 0,5 mg/ml de budesonida.

10 Se limpió un recipiente de mezclado de 500 L de acero inoxidable utilizando agua para inyectables (WFI) caliente y sanitizada por vapor. Se añadió al recipiente agua para inyectables a 25 °C. Se cargó entonces el recipiente con los siguientes excipientes en el siguiente orden: cloruro de sodio USP, ácido cítrico monohidratado USP, citrato trisódico dihidratado USP, edetato disódico dihidratado USP y polisorbato 80 USP desde una tolva de alimentación. Para los ejemplos 1 y 3, se añadieron en esta etapa 80 g de polisorbato 80. Para el ejemplo 2, se añadieron en esta etapa 30 g de polisorbato 80. Las cantidades de cada componente se indican en la Tabla 1. Se hizo recircular entonces la solución a través de un mezclador y una línea de acero inoxidable durante 10 minutos para asegurar una disolución completa. Durante la circulación, se lavó la tolva de alimentación con la solución circulante.

Tabla 1. Materiales del lote completo

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Agua para inyectables	500 kg	250 kg	500 kg
Cloruro de sodio	4250 g	2125 g	4250 g
Ácido cítrico monohidratado	155 g	77,5 g	155 g
Citrato trisódico dihidratado	250 g	125 g	250 g
Edetato disódico dihidratado	50 g	25 g	50 g
Polisorbato 80	100 g	50 g	100 g

Se limpiaron un recipiente del excipiente de 500 L de acero inoxidable y un recipiente del concentrado de 4 L de acero inoxidable y se esterilizaron *in situ*, utilizando agua para inyectables caliente seguida por vapor.

20 Los recipientes del excipiente y del concentrado se cargaron con el líquido excipiente que había sido pasado por un filtro de grado esterilizante (filtro de 0,1 µm Fluorodyne PVDF, PALL Europe Limited). Se aisló el recipiente del concentrado y se añadieron 20 g adicionales de polisorbato 80. La composición de la suspensión concentrada se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Materiales del concentrado de fármaco (porción de lote que ha sido esterilizada por calor)

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Agua para inyectables	4 kg	4 kg	4 kg
Budesonida	66,7 g	64,1 g	251,2 g
Cloruro de sodio	34 g	34 g	34 g
Ácido cítrico monohidratado	1,24 g	1,24 g	1,24 g
Citrato trisódico dihidratado	2 g	2 g	2 g
Edetato disódico dihidratado	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Polisorbato 80	20,64 g	20,48 g	20,64 g

25 Se esterilizó entonces la suspensión concentrada en las condiciones indicadas en la Tabla 3. Antes, durante y después de la esterilización, la suspensión concentrada se recirculó a través de un homogeneizador Silverson 150L mediante una línea de recirculación de acero inoxidable.

Tabla 3. Condiciones de esterilización

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Temperatura	126-129 °C	124-129 °C	124-132 °C
Tiempo	32 min	32 min	32 min

30

La suspensión de glucocorticosteroide esterilizada se mezcló entonces con la solución del excipiente estéril mantenida en el recipiente del excipiente para formar una suspensión de budesonida esterilizada diluida. La concentración del producto final fue 0,125 mg/ml para la suspensión del ejemplo 1, 0,25 mg/ml para la suspensión del ejemplo 2 y 0,5 mg/ml para la suspensión del ejemplo 3.

- 5 Se analizó una muestra de la suspensión en cuanto a sustancias relacionadas / impurezas utilizando HPLC y los resultados se indican en la Tabla 4. El análisis de la suspensión demostró un nivel de impurezas farmacéuticamente aceptable.

Tabla 4. Sustancias relacionadas / impurezas después de esterilización (% en peso basado en la cantidad de budesonida)

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
21-deshidro-budesonida	0,11	0,11	0,08
Desonida	ND	ND	ND
16 $\alpha$ -hidroxiprednisolona	<0,05	ND	ND
1,2 dihidro-budesonida	ND	ND	ND
Homólogo 22-metilo	ND	ND	<0,05
D-homobudesonida	ND	ND	<0,05
14,15-deshidrobudesonida	ND	ND	ND
S-11-ceto-budesonida	<0,05	<0,05	<0,05
R-11-ceto-budesonida	<0,05	<0,05	<0,05
S-21-acetato-budesonida	ND	ND	ND
R-21-acetato-budesonida	ND	ND	ND
Impureza individual desconocida máxima	<0,05	<0,05	<0,05
Impurezas totales	0,11	0,11	0,08

- 10 (ND = No detectado, <0,05 = Nivel de información)

La suspensión diluida se circuló de forma continua a través de una máquina de soplado-llenado-sellado Rommelag 3012 y se llenó en envases utilizando polietileno de baja densidad.

- 15 Se analizaron muestras de la suspensión en cuanto a distribución del tamaño de partícula por difracción de luz láser utilizando un Malvern Mastersizer S. Los parámetros considerados son los diámetros volumétricos en  $\mu\text{m}$  de los percentiles 10°, 50° y 90° de las partículas, expresados como Dv10, Dv50 y Dv90 respectivamente, que se determinan asumiendo que las partículas tienen una forma geométrica equivalente a una esfera. Los resultados se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución del tamaño de partícula después de esterilización

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Dv10	0,6	0,6	0,7
Dv50	2,3	2,5	2,7
Dv90	4,7	5,4	5,6

- 20 Las distribuciones del tamaño de partícula obtenidas están dentro de la región reconocida requerida para la administración efectiva de los productos por inhalación.

Se sometieron los lotes al ensayo de esterilidad y cumplieron con las exigencias de esterilidad de la Farmacopea Europea y de la Farmacopea de Estados Unidos.

Ejemplos 4 y 5: Esterilización por calor del dipropionato de beclometasona

- 25 Se prepararon dos lotes de una suspensión estéril de BDP (dipropionato de beclometasona). El ejemplo 4 (lote del solicitante W16531) y el ejemplo 5 (lote del solicitante W17211) contenían ambos 0,4 mg/ml de BDP.

- 30 Se limpió un recipiente de mezclado de 500 L de acero inoxidable utilizando agua para inyectables (WFI) caliente y sanitizada por vapor. Se añadió al recipiente agua para inyectables a 25 °C. Se cargó entonces el recipiente con los siguientes excipientes en el siguiente orden: cloruro de sodio EP, polisorbato 20 EP y Span 20 EP desde una tolva de alimentación. Para el ejemplo 4, se añadieron en esta etapa 400 g de polisorbato 20. Para el ejemplo 5, se añadieron en esta etapa 475 g de polisorbato 20 y 95 g de Span 20. Las cantidades de cada componente se indican en la Tabla 6. Se hizo recircular entonces la solución a través de un mezclador y una línea de acero inoxidable

## ES 2 409 713 T3

durante 10 minutos para asegurar una disolución completa. Durante la circulación, se lavó la tolva de alimentación con la solución circulante.

Tabla 6. Materiales del lote completo

	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Agua para inyectables	500 kg	500 kg
Cloruro de sodio	4500 g	4500 g
Polisorbato 20	500 g	500 g
Span 20	100 g	100 g

- 5 Se limpiaron un recipiente del excipiente de 500 L de acero inoxidable y un recipiente del concentrado de 4 L de acero inoxidable y se esterizaron *in situ*, utilizando agua para inyectables caliente seguida por vapor.

- 10 Los recipientes del excipiente y del concentrado se cargaron con el líquido excipiente que había sido pasado por un filtro de grado esterilizante (ejemplo 4 - filtro de 0,1 µm Fluorodyne PVDF, PALL Europe Limited: ejemplo 5 - filtro de 0,2 µm Fluorodyne PVDF, PALL Europe Limited). Se aisló el recipiente del concentrado y se añadieron polisorbato 20 (100 g para el ejemplo 4, 25 g para el ejemplo 5) y Span 20 (100 g para el ejemplo 4, 5 g para el ejemplo 5) adicionales. La composición de la suspensión concentrada se indica en la Tabla 7.

Tabla 7. Materiales del concentrado de fármaco (porción de lote que ha sido esterilizada por calor)

	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Agua para inyectables	4 kg	4 kg
BDP	206 g	210 g
Cloruro de sodio	36 g	36 g
Polisorbato 20	103,2 g	28,8 g
Span 20	100 g	5,8 g

- 15 Se esterilizó entonces la suspensión concentrada en las condiciones indicadas en la Tabla 8. Antes y durante la esterilización, la suspensión concentrada se recirculó a través de una bomba de lóbulos mediante una línea de recirculación de acero inoxidable. Después de esterilización la suspensión concentrada se recirculó a través de un homogeneizador mediante la bomba de lóbulos y la línea de recirculación de acero inoxidable.

Tabla 8. Condiciones de esterilización

	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Temperatura	124-132 °C	124-132 °C
Tiempo	32 min	32 min

- 20 La suspensión de glucocorticosteroide esterilizada se mezcló entonces con la solución del excipiente estéril mantenida en el recipiente del excipiente para formar una suspensión de BDP esterilizada diluida. La concentración del producto final fue 0,4 mg/ml para la suspensión del ejemplo 4 y del ejemplo 5.

- 25 Se analizó una muestra de la suspensión en cuanto a sustancias relacionadas / impurezas utilizando HPLC y los resultados se indican en la Tabla 9. El análisis de la suspensión demostró un nivel de impurezas farmacéuticamente aceptable.

Tabla 9. Sustancias relacionadas / impurezas después de esterilización (% en peso basado en la cantidad de BDP)

	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Beclometasona	ND	ND
Beclometasona 17-propionato	0,05	ND
Beclometasona 21-propionato	ND	ND
Beclometasona 21-acetato 21-propionato	ND	ND
Beclometasona dipropionato 9β, 11 epoxi análogoβ	0,60	0,12
Beclometasona dipropionato 9 bromo análogo	ND	ND
Beclometasona dipropionato δ9, 11 análogo	ND	ND
Beclometasona dipropionato 21-butirato	ND	ND

## ES 2 409 713 T3

Beclometasona dipropionato 6 $\alpha$ -cloro	ND	ND
Beclometasona dipropionato 6 $\alpha$ -bromo	ND	ND
Impureza individual desconocida máxima	0,12	0,08
Impurezas totales	0,89	0,20

(ND = No detectado)

La suspensión diluida se circuló de forma continua por una máquina de soplado-llenado-sellado y se llenó en envases utilizando polietileno de baja densidad.

5 Se analizaron muestras de la suspensión en cuanto a distribución del tamaño de partícula por difracción de luz láser utilizando un Malvern Mastersizer S. Los parámetros considerados son los diámetros volumétricos en  $\mu\text{m}$  de los percentiles 10°, 50° y 90° de las partículas, expresados como Dv10, Dv50 y Dv90 respectivamente, que se determinan asumiendo que las partículas tienen una forma geométrica equivalente a una esfera. Los resultados se indican en la Tabla 10.

Tabla 10. Distribución del tamaño de partícula después de esterilización

	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Dv10	0,4	0,4
Dv50	1,4	1,5
Dv90	3,6	3,6

10

Las distribuciones del tamaño de partícula obtenidas están dentro de la región reconocida requerida para la administración efectiva de los productos por inhalación.

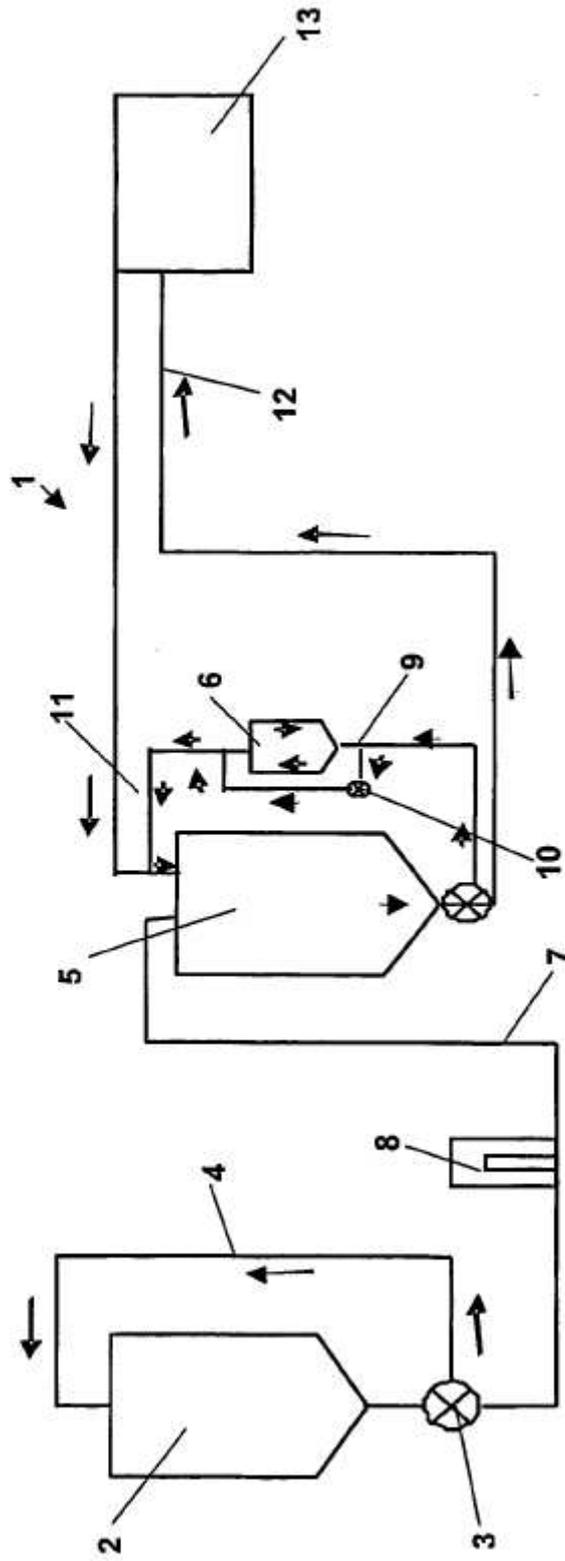
Los lotes se sometieron al ensayo de esterilidad y cumplieron con las exigencias de esterilidad de la Farmacopea Europea.

15

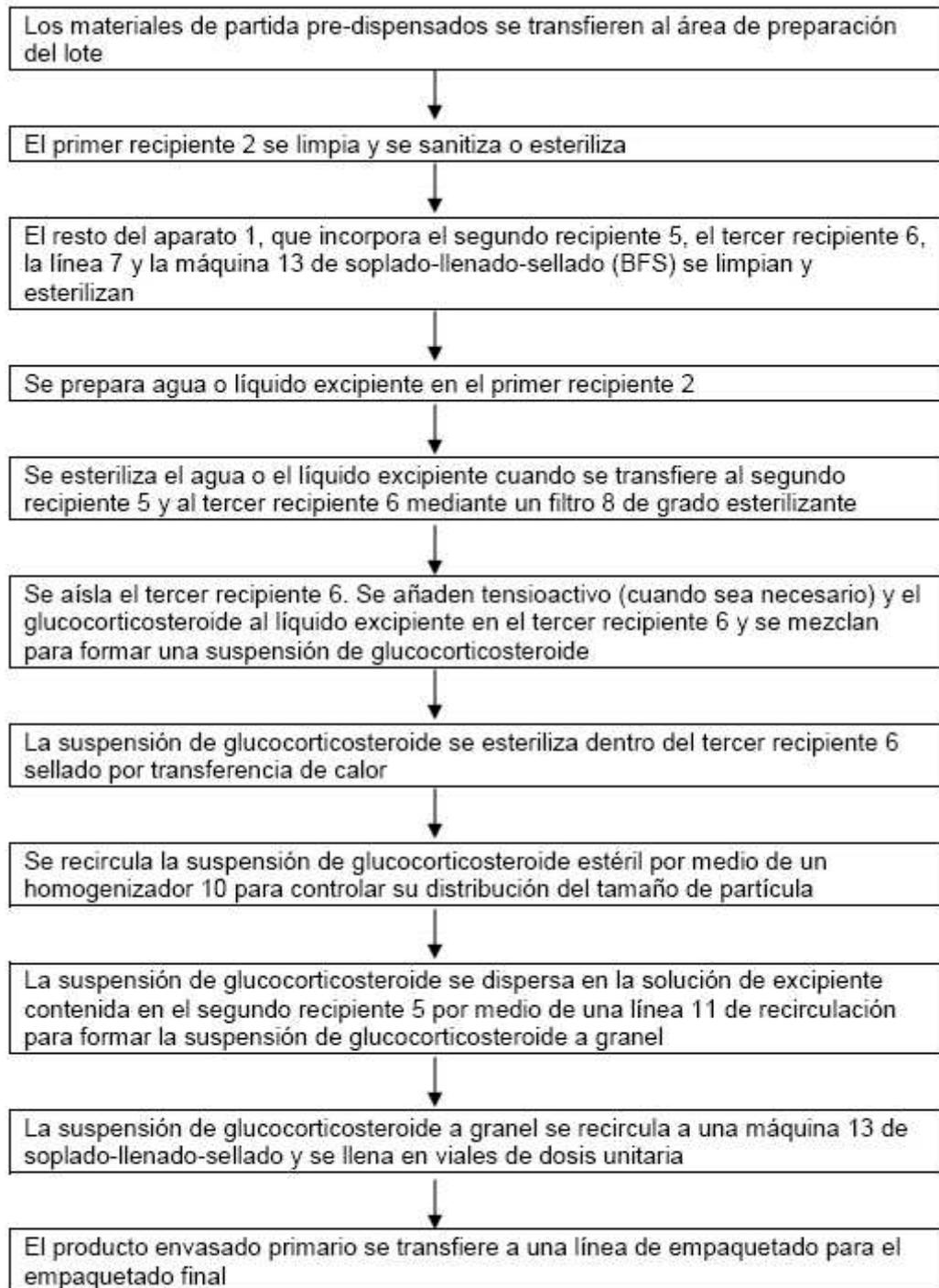
REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una suspensión estéril de un glucocorticoesteroide que comprende las siguientes etapas:
  - (i) calentar una suspensión de glucocorticoesteroide que comprende un glucocorticoesteroide, agua y un tensioactivo en un recipiente de mezclado que comprende una línea de recirculación que incorpora un homogeneizador, para esterilizar la suspensión de glucocorticoesteroide,
  - (ii) recircular la suspensión de glucocorticoesteroide mediante el homogeneizador (a) durante la etapa (i), (b) después de la etapa (i), (c) durante y después de la etapa (i), o (d) antes y durante y después de la etapa (i), y posteriormente,
  - (iii) mezclar la suspensión de glucocorticoesteroide con agua estéril o con un líquido excipiente estéril que comprende agua y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
2. Un método según la reivindicación 1, que comprende además, antes de la etapa (iii), la etapa de preparación del agua estéril o del líquido excipiente estéril pasando agua o un líquido excipiente a través de un filtro de grado esterilizante.
3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde se utiliza un líquido excipiente estéril y los excipientes, uno o más farmacéuticamente aceptables, comprenden un tensioactivo.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los excipientes, uno o más farmacéuticamente aceptables, comprenden al menos uno entre un tampón, una sal, un agente humectante, un agente estabilizante y un agente isotónico.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la recirculación de la etapa (ii) tiene lugar durante el calentamiento de la etapa (i).
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración del glucocorticoesteroide en la suspensión de glucocorticoesteroide es de 15 a 300 mg/ml.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 50 % del glucocorticoesteroide en la suspensión de glucocorticoesteroide está en la forma de una suspensión durante el calentamiento.
8. Un método según la reivindicación 7, en donde al menos 60 % del glucocorticoesteroide en la suspensión de glucocorticoesteroide está en la forma de una suspensión durante el calentamiento.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el glucocorticoesteroide se selecciona de al menos uno entre beclometasona, budesonida, ciclesonida, cortivazol, deflazacort, flumetasona, flunisolida, flucinolona, fluticasona, mometasona, rofleponida, tipredano y triamcinolona.
10. Un método según la reivindicación 8, en donde el glucocorticoesteroide es beclometasona o budesonida.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración del tensioactivo en la suspensión de glucocorticoesteroide es de 0,2 a 300 mg/ml.
12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el calentamiento se realiza a una temperatura de 101 °C a 145 °C.
13. Un método según la reivindicación 12, en donde el calentamiento se realiza a una temperatura de 122 °C a 138 °C.
14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el calentamiento se realiza durante 2 a 180 minutos.
15. Un método según la reivindicación 14, en donde el calentamiento se realiza durante al menos 30 minutos.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el homogeneizador es un homogeneizador en línea o un homogeneizador de alta presión.
17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, en la etapa (iii), la suspensión de glucocorticoesteroide se diluye con el líquido excipiente estéril hasta una concentración farmacéuticamente adecuada.
18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, posteriormente a la etapa (iii), se envasa la suspensión estéril de un glucocorticoesteroide.

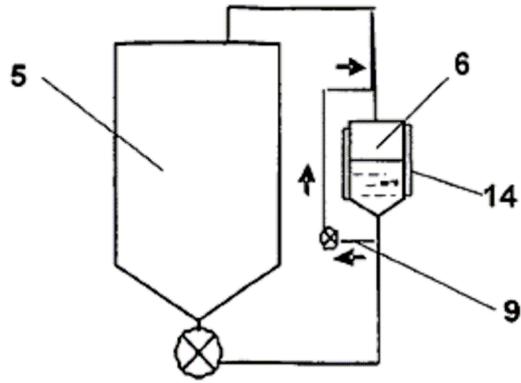
19. Un método según la reivindicación 18, en donde la suspensión estéril de un glucocorticoesteroide se envasa en una máquina de soplado-llenado-sellado (BFS).



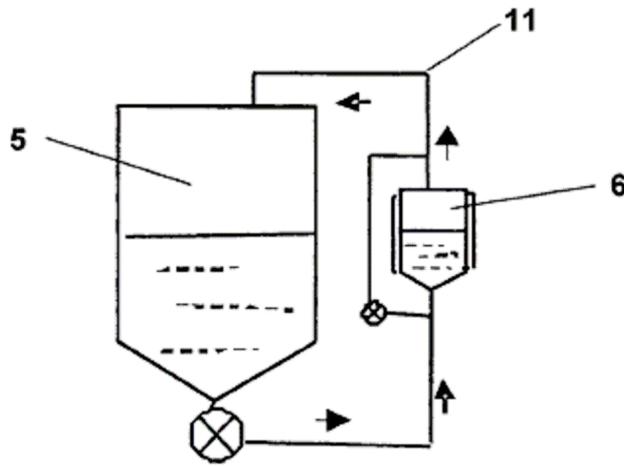
**Fig. 1**



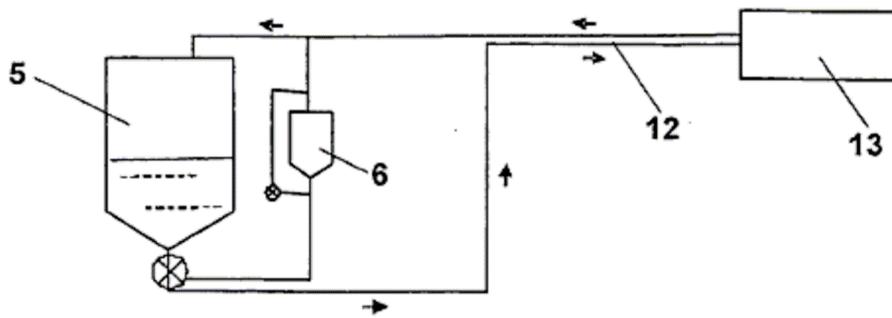
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**