

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 634**

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2012 PCT/EP2012/002770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13004370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2012 E 12734804 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2726068**

54 Título: **Producción en flujo continuo de nanopartículas de gelatina**

30 Prioridad:

01.07.2011 EP 11005386

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

16.04.2018

73 Titular/es:

**FUTURECHEMISTRY HOLDING B.V. (100.0%)
Toernooiveld 100
6525EC Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BROEK, SEBASTIAAN ANTONIUS
MARTINUSWALTHERUS;
NIEUWLAND, PIETER JOS y
KOCH, KASPAR**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 663 634 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

Producción en flujo continuo de nanopartículas de gelatina

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de nanopartículas basadas en gelatina.

10 En los últimos años, se ha dedicado un esfuerzo significativo para desarrollar nanotecnología para la administración de fármacos dado que ofrece medios adecuados para administrar fármacos de bajo peso molecular, así como macromoléculas tales como proteínas, péptidos o genes mediante administración o bien localizada o bien dirigida al tejido de interés. La nanotecnología se centra en formular agentes terapéuticos en nanomateriales compuestos biocompatibles tales como nanopartículas, nanocápsulas, sistemas micelares y conjugados. Las nanopartículas de proteína (BSA, HAS y gelatina) generalmente varían en tamaño entre 20-500 nm y mantienen ciertas ventajas tales como mayor estabilidad durante el almacenamiento, estabilidad *in vivo*, ausencia de toxicidad, ausencia de antígenos y facilidad de aumento a escala durante la fabricación con respecto a los otros sistemas de administración de fármacos. La estructura primaria de la gelatina ofrece muchas posibilidades para modificación química y unión covalente a fármaco, por ejemplo para administración de fármacos en general, y como sistema inyectable de administración de fármacos en particular.

20 Algunas fracturas sólo se curan lentamente debido a la complejidad de la fractura o debido a que el paciente tiene un crecimiento retardado. Métodos actuales de crecimiento acelerado hacen uso de un factor de crecimiento unido a un tejido, por ejemplo colágeno. Este método activa células óseas para activar el crecimiento. Los métodos existentes se basan en rellenar la fractura con material granulado a partir de recursos naturales o sintéticos. Esto requiere cirugía invasiva, lo que es exigente para el paciente.

25 Otra opción más preferida es usar materiales inyectables. Por ejemplo, el documento US5932245 da a conocer una formulación de dosificación que proporciona la liberación de nanopartículas. Comprende (a) una fase interior que comprende al menos un compuesto de nanopartícula; y (b) una fase exterior que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en gelatina, hidrolizados de colágeno y mezclas de los mismos. El tamaño preferido de nanopartícula está en el intervalo de desde 10-800 nm. Se menciona la libenclamida como compuesto de nanopartícula para el tratamiento de diabetes.

30 El documento US2008/0003292 da a conocer nanopartículas, que consisten esencialmente en un gel acuoso de gelatina, en el que las nanopartículas tienen un diámetro promedio de como máximo 350 nm y un índice de polidispersidad de menos de o igual a 0,15. Las nanopartículas se usan como sistemas portadores para sustancias medicinales. Esta publicación trata con el problema de la amplia distribución de tamaño de nanopartículas lo que es desventajoso con vistas a un comportamiento de transporte y liberación uniforme. En los ejemplos, se disuelve gelatina en agua y se ajusta el valor de pH. La desolvatación de la gelatina se lleva a cabo mediante adición de acetona gota a gota. Se añade disolución acuosa de aldehído glutárico. Se separan las nanopartículas reticuladas de esta manera de la disolución.

40 Los procedimientos conocidos para fabricar nanopartículas de gelatina son difíciles de controlar.

45 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento novedoso para fabricar nanopartículas basadas en gelatina que supere los problemas anteriores y/u otros.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento continuo para la preparación de nanopartículas basadas en gelatina en un reactor que comprende un canal de procedimiento que comprende un elemento de mezclado en el mismo, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

50 A) alimentar por separado una disolución acuosa de gelatina a una primera velocidad y un disolvente orgánico miscible en agua a una segunda velocidad al canal de procedimiento del reactor para mezclarse en el mismo, para formar una suspensión de nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina y

55 B) reticular las nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina,

en el que la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad se elige de manera que el reactor tiene una eficacia de mezclado tal como se determina mediante el método de Villermaux/Dushman de entre 0,1 y 1,5 y

60 el periodo desde el punto de tiempo en el que se alimenta la disolución acuosa de gelatina al reactor hasta el punto de tiempo en el que la mezcla de la disolución acuosa de gelatina y el disolvente orgánico entra en contacto con el elemento de mezclado es como máximo de 15 segundos.

65 Los inventores han encontrado sorprendentemente que pueden fabricarse nanopartículas basadas en gelatina mediante un procedimiento continuo. El procedimiento se lleva a cabo preferiblemente en un microrreactor o reactor de flujo. En el presente documento se entiende que el procedimiento continuo significa un procedimiento en el que se extraen continuamente productos y se reponen continuamente reactivos.

En el procedimiento discontinuo de la técnica anterior, la desolvatación de la gelatina se lleva a cabo mediante adición de acetona gota a gota. En tal procedimiento, la concentración de la acetona en la mezcla se aumenta lentamente, hasta un determinado punto en el tiempo en el que empiezan a formarse nanopartículas de gelatina. Se requiere la adición gota a gota, dado que si la acetona se añade en una etapa, se produce una separación de fases, y al final se formarán grandes agregados. Entonces se mezclan las dos fases para dar una disolución homogénea junto con la formación de grandes agregados en vez de nanopartículas. En la técnica se consideraba que el requisito para el lento aumento en la concentración de acetona garantizado por la adición gota a gota hacía necesario usar un procedimiento discontinuo para la preparación de nanopartículas basadas en gelatina.

La invención se basa en la constatación de que la formación de una mezcla homogénea en la que la concentración del disolvente orgánico es lo bastante alta da como resultado la formación de nanopartículas por desolvatación, y que esto puede lograrse instantáneamente poniendo continuamente en contacto una pequeña cantidad de la disolución de gelatina y una pequeña cantidad del disolvente orgánico, en vez de poner en contacto una pequeña cantidad del disolvente orgánico con una gran cantidad de la disolución de gelatina como en el procedimiento discontinuo. Alimentar un flujo de la disolución de gelatina y un flujo del disolvente orgánico en un reactor permite proporcionar tal mezcla homogénea mientras que se evita la formación de grandes agregados.

Mediante el uso del procedimiento continuo en un reactor, se obtienen continuamente nanopartículas basadas en gelatina que tienen un índice de polidispersidad estrecho, proporcionando ventajosamente un procedimiento eficaz con alta reproducibilidad. Al contrario que en el procedimiento discontinuo de la técnica anterior en el que los resultados dependen de la habilidad de la persona que realiza los experimentos, el procedimiento según la presente invención proporciona nanopartículas de una manera fiable.

Además, el procedimiento según la presente invención permite un alto grado de libertad para los parámetros del procedimiento. Por ejemplo, es posible ajustar el punto de tiempo en el que se añade el agente de reticulación. En el procedimiento discontinuo, el agente de reticulación debe añadirse después de que se complete la formación de las nanopartículas no reticuladas para el lote completo. En comparación, el agente de reticulación puede añadirse a medida que se forman las nanopartículas no reticuladas según el procedimiento de la presente invención.

Sorprendentemente, se encontró que pueden obtenerse nanopartículas de diferentes tamaños controlados según el procedimiento de la presente invención que son diferentes de las nanopartículas obtenidas a partir de los mismos compuestos de partida mediante el procedimiento discontinuo. En particular, se encontró que pueden obtenerse nanopartículas que tienen un diámetro promedio de hasta 800 nm mediante el procedimiento según la presente invención.

La eficacia de mezclado de un reactor se determina alimentando una disolución de KI 0,0319 mol/l, KIO₃ 0,0063 mol/l, H₂BO₃⁻ 0,0898 mol/l y NaOH 0,0898 mol/l desde una entrada y una disolución de H₂SO₄ 0,015 mol/l a otra entrada del reactor a una razón en volumen de 1:1 y midiendo la absorbancia de UV a 286 nm en la salida del reactor. Un número inferior de la eficacia de mezclado indica que tuvo lugar más mezclado en el reactor. El método se describe más en detalle en S. Panic, S. Loebbecke, T. Tuercke, J. Antes, Experimental approaches to a better understanding of mixing performance of microfluidic devices, D. Bošković, Chem. Eng. J. 2004, 101, 409-419.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que puede determinarse el intervalo adecuado de la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad para un reactor dado para realizar el procedimiento de la presente invención realizando el método de Villermaux/Dushman usando las disoluciones anteriormente descritas. Se encontró que dicho intervalo adecuado para la suma de las velocidades de flujo de la disolución de gelatina y el disolvente orgánico es el intervalo en el que la eficacia de mezclado para las disoluciones anteriormente descritas en el reactor es de entre 0,1 y 1,5. Por tanto, puede determinarse si un reactor dado es adecuado para la preparación de las nanopartículas de gelatina y puede determinarse el intervalo adecuado de la suma de velocidades de flujo sin usar la disolución de gelatina y el disolvente orgánico.

Para poder lograr la eficacia de mezclado de 0,1 a 1,5, el reactor debe tener un elemento de mezclado. El elemento de mezclado en el reactor usado en la presente invención está dispuesto de tal modo que puede alcanzarse una eficacia de mezclado de 0,1 a 1,5 eligiendo velocidades de flujo adecuadas.

Se encontró que una eficacia de mezclado demasiado baja o demasiado alta da como resultado o bien al atascamiento del canal (sin formación de nanopartículas) o bien un alto PDI (índice de polidistribución) de las nanopartículas formadas. Preferiblemente, la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad se elige de manera que el reactor tiene una eficacia de mezclado tal como se determina mediante el método de Villermaux/Dushman de entre 0,25 y 1,3, más preferiblemente entre 0,5 y 1,0. En este caso, las nanopartículas resultantes son pequeñas y tienen un bajo PDI.

También se encontró que es preferible que el mezclado empiece lo antes posible tras el contacto de la disolución de gelatina y el disolvente orgánico entre sí. El periodo desde el punto de tiempo en el que se alimenta la disolución acuosa de gelatina al reactor hasta el punto de tiempo en el que la mezcla entra en contacto con el elemento de mezclado es como máximo de 15 segundos. Se encontró experimentalmente que se produce un atascamiento del

canal cuando la mezcla permanece en el canal más de 15 segundos antes de dividirse por el elemento de mezclado. Preferiblemente, el periodo desde el punto de tiempo en el que se alimenta la disolución acuosa de gelatina al reactor hasta el punto de tiempo en el que la mezcla entra en contacto con el elemento de mezclado es de 0,01 a 10 segundos. Más preferiblemente, el periodo es de 0,1 a 5 segundos.

Tal como se usa en el presente documento, un elemento de mezclado es un elemento que divide un flujo en múltiples flujos y recombina los flujos en el reactor. Es posible que los múltiples flujos se hagan rotar durante la etapa de mezclado de división y recombinación. Se conocen muchos tipos de elementos de mezclado. Un elemento de mezclado tiene normalmente unidades de repetición que tienen la misma construcción y la división del flujo se produce normalmente múltiples veces. Se entiende que el punto de tiempo en el que la mezcla entra en contacto con el elemento de mezclado significa el punto de tiempo en el que la mezcla se divide por el elemento de mezclado por primera vez.

Preferiblemente, la división del flujo se produce al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 60 veces o al menos 80 veces. Preferiblemente, la división del flujo se produce como máximo 300 veces, como máximo 250 veces, como máximo 200 veces, como máximo 150 veces o como máximo 100 veces.

El número adecuado de las divisiones para proporcionar la eficacia de mezclado requerida depende, por ejemplo, de las velocidades de flujo del flujo de entrada y la sección transversal de los canales del reactor.

En algunas realizaciones preferidas, el elemento de mezclado proporciona al menos 60 divisiones, la mezcla fluye desde la primera división hasta la última división dentro de un periodo de 60 segundos a 15 minutos y la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad es de 0,4-4,0 ml/min por sección transversal del canal en mm^2 . Se encontró que estas realizaciones proporcionan nanopartículas basadas en gelatina deseables.

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "sección transversal del canal" es la sección transversal del diámetro externo del canal. Preferiblemente, la sección transversal del canal es constante a lo largo del canal, es decir cuando el canal antes de la división tiene una sección transversal de $A \text{ mm}^2$, cada uno de los canales tiene una sección transversal de $A \text{ mm}^2$ tras la división.

La sección transversal del canal es preferiblemente de 0,1 a 100 mm^2 , más preferiblemente de 0,5 a 5 mm^2 , más preferiblemente de 1 a 3 mm^2 .

El elemento de mezclado está preferiblemente dispuesto de manera que la división se produce uniformemente a lo largo del canal.

Las dimensiones específicas y las estructuras de mezcladores adecuados y canales de reacción para lograr el mezclado deseado puede determinarlas el experto en la técnica, por ejemplo tal como se describe en los documentos US2006087048, US2005220915 y WO2004076056 que describen microrreactores para fabricar nanopartículas.

Puede mezclarse la suspensión con la disolución del agente de reticulación inmediatamente después de que se forme la suspensión, o puede ir a través de una fase en la que se forman nanopartículas adicionales, por ejemplo pasando a través de canales adicionales.

Tras completarse la desolvatación, hay una suspensión inestable de nanopartículas basadas en gelatina. Esta suspensión se mezcla con una disolución de agente de reticulación para estabilizar las nanopartículas: grupos amina libre dentro de las cadenas de gelatina de una nanopartícula reaccionan con este agente de reticulación, estabilizando así las cadenas de gelatina en las nanopartículas. Preferiblemente, el agente de reticulación se mezcla con la suspensión a una razón molar de 0,5:1 a 2:1 entre el agente de reticulación y el grupo amina de la gelatina. Más preferiblemente, el agente de reticulación se añade sólo en un ligero exceso, por ejemplo a una razón molar de 1,1:1 a 1,3:1 entre el agente de reticulación y el grupo amina de la gelatina, para evitar reticulación entre partículas: si se añade rápidamente un gran exceso de agente de reticulación, el agente puede producir reticulación entre cadenas de gelatina de dos nanopartículas diferentes. La adición continua del agente de reticulación a la suspensión puede realizarse dentro del reactor en el que se forma la suspensión, o fuera del reactor. En cualquier caso, la disolución del agente de reticulación se alimenta con una velocidad seleccionada para permitir una reticulación apropiada sin reticulación entre partículas. Tras la alimentación continua controlada del agente de reticulación, la mezcla resultante se mantiene fuera del mezclador. Debe observarse que durante la reacción de reticulación, no debe usarse ninguna agitación, ya que la interacción mecánica puede dar como resultado la agregación entre partículas y la posterior reticulación entre partículas.

La disolución de gelatina usada en el procedimiento según la invención tiene preferiblemente un valor de pH de menos de 7,0. Preferiblemente, la disolución de gelatina tiene un pH de 2-4. Esto conduce a nanopartículas más pequeñas.

La razón de velocidades de flujo entre la primera velocidad y la segunda velocidad debe elegirse dependiendo de las concentraciones de los líquidos que van a alimentarse al reactor. La cantidad del disolvente orgánico con respecto al agua debe ser suficiente para que se formen las partículas. Se encontró que cuando la cantidad del disolvente orgánico es demasiado pequeña, se obtiene una disolución transparente en vez de una suspensión de nanopartículas. Preferiblemente, la segunda velocidad es mayor que la primera velocidad. Por consiguiente, la razón de la segunda velocidad con respecto a la primera velocidad es preferiblemente de entre 2 y 4. Se encontró que este intervalo da como resultado un bajo PDI de las nanopartículas resultantes. Lo más preferiblemente, la razón de la segunda velocidad con respecto a la primera velocidad es de 2,75 a 3,25 o de aproximadamente 3. Se encontró sorprendentemente que el tamaño de nanopartícula puede controlarse por la razón entre la primera velocidad y la segunda velocidad cuando se formaron las nanopartículas en un reactor de flujo continuo, al contrario que un procedimiento discontinuo en el que la razón entre el disolvente orgánico y el agua no cambia sustancialmente el tamaño de nanopartícula.

La suma de la primera velocidad y la segunda velocidad es preferiblemente de 0,4-4,0 ml/min por sección transversal del canal en mm^2 .

La disolución acuosa de gelatina alimentada al primer mezclador puede comprender por ejemplo del 0,1 al 25% (p/v) de la gelatina. Se encontró que una concentración mayor lleva a un mayor tamaño de partícula. Preferiblemente, la disolución acuosa de gelatina comprende del 0,1 al 18% (p/v), más preferiblemente del 1 al 15% (p/v) de la gelatina.

La temperatura de reacción puede variar en un intervalo grande siempre y cuando la disolución de gelatina pueda permanecer como una disolución. Por consiguiente, puede mantenerse el mezclador a una temperatura de por ejemplo 37°C- 100°C o 40°C - 70°C.

La disolución del agente de reticulación puede comprender por ejemplo 0,01-1 mol/l del agente de reticulación, preferiblemente 0,05-0,2 mol/l. El disolvente de esta disolución puede ser agua. Alternativamente, también puede usarse una mezcla de agua y el disolvente orgánico añadida al mezclador como disolvente de esta disolución. Esto permite ajustar la razón del disolvente orgánico con respecto a agua en la suspensión final. La razón en volumen del disolvente orgánico con respecto a agua puede ser por ejemplo de 1-5 o de 2-4.

En algunas realizaciones, puede ser importante determinar la velocidad de alimentación de la disolución del agente de reticulación basándose en la razón de los grupos funcionales en el sistema. Preferiblemente, la disolución del agente de reticulación se alimenta en etapa B) de manera que la razón del agente de reticulación con respecto al grupo amina de la gelatina es de 0,5 a 2,0, preferiblemente de 1,1 a 1,3.

La razón de la velocidad de flujo del agente de reticulación con respecto a la primera velocidad puede basarse dependiendo, por ejemplo, de la concentración de los líquidos alimentados al reactor. Dicha razón puede ser por ejemplo de 0,05 - 0,3 o de 0,1 - 0,2.

El disolvente orgánico añadido al reactor se elige preferiblemente del grupo que consiste en metanol, 2-propanol, acetonitrilo y acetona. Se prefiere particularmente la acetona como disolvente orgánico.

El agente de reticulación se elige preferiblemente del grupo que consiste en dialdehídos, formaldehído, isocianatos, diisocianatos, carbodiimidas y dihaluros de alquilo. Se prefiere particularmente glutaraldehído como agente de reticulación.

También pueden añadirse compuestos farmacéuticamente activos, por ejemplo un factor de crecimiento, al sistema. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento en el que las nanopartículas basadas en gelatina comprenden además un compuesto farmacéuticamente activo. Además de componentes activos para nuevo crecimiento óseo, hay muchas otras aplicaciones para nanopartículas de gelatina funcionalizadas, tales como administración de fármacos de ADN, por ejemplo, para terapia génica. Aplicaciones contempladas adicionales son la administración de fármacos al riñón y al corazón. Se mencionan ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos, por ejemplo, en los documentos US5932245, US5560924, WO2005/000265, que se incorporan en el presente documento como referencia. Por ejemplo, en el documento WO2005/000265, se facilita una larga lista de posibles compuestos: los compuestos farmacéuticamente activos pueden seleccionarse de una variedad de clases de fármacos conocidas, incluyendo, por ejemplo, inhibidores de COX-2, retinoides, agentes anticancerígenos, AINE, proteínas, péptidos, nucleótidos, fármacos antiobesidad, productos nutracéuticos, suplementos alimenticios, carotenoides, corticosteroides, inhibidores de la elastasa, antifúngicos, terapias oncológicas, antieméticos, analgésicos, agentes cardiovasculares, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, agentes antiaritmicos, antibióticos (incluyendo penicilinas), anticoagulantes, antidepresivos, agentes antidiabéticos, antiepilépticos, antihistamínicos, agentes antihipertensores, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antineoplásicos, inmunosupresores, agentes anti tiroideos, agentes antivirales, ansiolíticos, sedantes (hipnóticos y neurolepticos), astringentes, agentes bloqueantes de los receptores adrenérgicos beta, hemoderivados y sucedáneos de la sangre, agentes cardiacos inotrópicos, medios de contraste, corticosteroides, antitúxicos (expectorantes y mucolíticos), agentes de diagnóstico, agentes de obtención de imágenes de diagnóstico, diuréticos, dopaminérgicos (agentes antiparkinsonianos), hemostáticos, agentes inmunológicos, agentes de regulación de

lípidos, relajantes musculares, parasimpaticomiméticos, calcitonina paratiroidea y bifosfonatos, prostaglandinas, productos radiofarmacéuticos, hormonas sexuales (incluyendo esteroides), agentes antialérgicos, estimulantes y anoréticos, simpaticomiméticos, agentes tiroideos, vasodilatadores, xantinas, formulaciones de alfa-hidroxilo, terapias contra la fibrosis quística, terapias contra el asma, terapias contra el enfisema, terapias contra el síndrome de dificultad respiratoria, terapias contra la bronquitis crónica, terapias contra la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, terapias contra el rechazo al trasplante de órganos, terapias para tuberculosis y otras infecciones pulmonares, y terapias contra enfermedades respiratorias asociadas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Los ejemplos de agentes activos representativos útiles en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aciclovir, alprazolam, altretamina, amilorida, amiodarona, mesilato de benzotropina, bupropion, cabergolina, candesartán, cerivastatina, clorpromazina, ciprofloxacino, cisaprida, claritromicina, clonidina, clopidogrel, ciclobenzaprina, ciproheptadina, delavirdina, desmopresina, diltiazem, dipiridamol, dolasetrón, maleato de enalapril, enalaprilato, famotidina, felodipina, furazolidona, glipizida, irbesartán, ketoconazol, lansoprazol, loratadina, loxapina, mebendazol, mercaptopurina, lactato de milrinona, minociclina, mitoxantrona, mesilato de nelfinavir, nimodipina, norfloxacin, olanzapina, omeprazol, penciclovir, pimizida, tacolimus, quazepam, raloxifeno, rifabutina, rifampina, risperidona, rizatriptán, saquinavir, sertralina, sildenafil, acetil-sulfisoxazol, temazepam, tiabendazol, tioguanina, trandolapril, triamtereno, trimetrexato, troglitazona, trovafloxacin, verapamilo, sulfato de vinblastina, micofenolato, atovacuna, atovacuna, proguanil, ceftazidima, cefuroxima, etopósido, terbinafina, talidomida, fluconazol, amsacrina, dacarbazina, tenipósido y acetilsalicilato. Se dan a conocer productos nutracéuticos y suplementos alimenticios a modo de ejemplo, por ejemplo, en Roberts *et al.*, *Nutraceuticals: The Complete Encyclopedia of Supplements, Herbs, Vitamins, and Healing Foods* (American Nutraceutical Association, 2001), que se incorpora específicamente como referencia. Un producto nutracéutico o suplemento alimenticio, también conocido como productos fitoquímicos o alimentos funcionales, es generalmente cualquiera de una clase de suplementos alimenticios, vitaminas, minerales, hierbas o alimentos curativos que tienen efectos médicos o farmacéuticos sobre el organismo. Los productos nutracéuticos o suplementos alimenticios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, luteína, ácido fólico, ácidos grasos (por ejemplo, DHA y ARA), extractos de frutas y verduras, suplementos vitamínicos y minerales, fosfatidilserina, ácido lipoico, melatonina, glucosamina/condroitina, Aloe Vera, Guggul, glutamina, aminoácidos (por ejemplo, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina), té verde, licopeno, alimentos integrales, aditivos alimentarios, hierbas, fitonutrientes, antioxidantes, constituyentes de flavonoides de frutas, aceite de onagra, semillas de lino, aceites de pescado y de animales marinos, y probióticos. Los productos nutracéuticos y suplementos alimenticios también incluyen alimentos producidos por bioingeniería modificados por ingeniería genética para tener una propiedad deseada, también conocidos como "farmalimentos". Puede encontrarse una descripción de estas clases de agentes activos y una lista de especies dentro de cada clase en Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, vigesimonovena edición (The Pharmaceutical Press, Londres, 1989), incorporado específicamente como referencia. Los agentes activos están disponibles comercialmente y/o pueden prepararse mediante técnicas conocidas en la técnica.

Los componentes farmacéuticamente activos pueden añadirse en diferentes etapas del procedimiento. Por ejemplo, los compuestos farmacéuticamente activos pueden añadirse a la disolución acuosa de gelatina y/o al disolvente orgánico miscible en agua. En este caso, los compuestos se incorporan en las nanopartículas a medida que se forman las nanopartículas. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento en el que la disolución acuosa de gelatina y/o el disolvente orgánico miscible en agua comprenden el compuesto farmacéuticamente activo.

También pueden añadirse los componentes farmacéuticamente activos después de mezclarse la disolución de gelatina y el disolvente orgánico pero antes de añadir el agente de reticulación. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento en el que el compuesto farmacéuticamente activo se alimenta al reactor después de la formación de la suspensión de las nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina.

También pueden añadirse los componentes farmacéuticamente activos después de añadir el agente de reticulación. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento en el que el compuesto farmacéuticamente activo se añade a la suspensión recogida desde el reactor.

Es posible alimentar los compuestos farmacéuticamente activos en un medio líquido por separado a la parte del reactor en la que se forman las nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina. En este caso, los compuestos se incorporan en las nanopartículas a medida que se forman las nanopartículas. Alimentar los compuestos por separado es ventajoso porque su velocidad de flujo puede controlarse independientemente de la disolución acuosa de gelatina y el disolvente orgánico miscible en agua.

Se observa que la invención se refiere a todas las posibles combinaciones de características descritas en el presente documento, especialmente las características indicadas en las reivindicaciones.

Ahora se explicará la invención con referencia a las siguientes figuras en las que:

la figura 1 es una representación esquemática de un ejemplo de un sistema de reactor usado en el procedimiento según la presente invención;

las figuras 2-5 muestran una representación esquemática de varios ejemplos de un sistema de reactor usado en el

procedimiento según la presente invención;

la figura 6 muestra una representación esquemática de un ejemplo del reactor para la medición del método de Villermaux/Dushman y

la figura 7 muestra una representación esquemática de ejemplos de un elemento de mezclado usado en el procedimiento según la presente invención.

La figura 1 muestra un ejemplo de un sistema de reactor para producir nanopartículas basadas en gelatina según el procedimiento de la presente invención. El sistema comprende un reactor 100. El reactor 100 comprende un primer mezclador 10, un canal 30 de reacción y un segundo mezclador 20. La temperatura del reactor se controla mediante un controlador de temperatura. El primer mezclador tiene una primera entrada 11 y una segunda entrada 12. Una disolución acuosa de gelatina se alimenta a la primera entrada 11 a una velocidad controlada. La disolución de gelatina se mantiene a una temperatura a la que la disolución de gelatina permanece líquida. Un disolvente orgánico se alimenta a la segunda entrada 12 a una velocidad controlada. Los líquidos se mezclan en el primer mezclador 10 y fluyen hacia fuera desde la salida 13. La mezcla entra en el canal 30 de reacción a través de su entrada 31 de canal de reacción. Para cuando la mezcla líquida alcanza la salida 32 de canal de reacción, se ha completado el procedimiento de desolvatación y una suspensión de nanopartículas basadas en gelatina fluye en la salida 32 de canal de reacción. Se apreciará que puede que la salida 13 del primer mezclador 10 y la entrada 31 de canal de reacción no sean necesariamente distinguibles de manera clara sino que formen un único canal. El primer mezclador 10 puede tener la estructura tal como se ilustra en la figura 7.

La suspensión procedente del canal 30 de reacción sale desde su salida 32 de canal de reacción y entra al segundo mezclador a través de su primera entrada 21. También se alimenta una disolución de reticulante al segundo mezclador 20 a través de su segunda entrada 22. La suspensión procedente de la primera entrada 21 y la disolución de reticulante procedente de la segunda entrada 22 se mezclan en el segundo mezclador 20 en el que se produce la reticulación de nanopartículas. Las nanopartículas reticuladas se recogen a partir de la salida 23.

Hay muchas variaciones posibles de esta realización. En una variación, se alimenta al sistema una disolución o una dispersión de un compuesto farmacéuticamente activo. El primer mezclador 10 o el segundo mezclador 20 pueden comprender una entrada adicional a través de la cual se alimenta el compuesto farmacéuticamente activo. El microrreactor 10 puede comprender un mezclador adicional al que se alimenta el compuesto farmacéuticamente activo, mezclador adicional que puede alimentarse adicionalmente con el líquido procedente del primer microrreactor, el canal de reacción o el segundo microrreactor. De este modo, pueden formarse nanopartículas basadas en gelatina que comprenden el compuesto farmacéuticamente activo.

La figura 2 muestra un ejemplo adicional del sistema de reactor para producir nanopartículas basadas en gelatina según el procedimiento de la presente invención. Este ejemplo es el mismo que en la figura 1 excepto porque el reactor 100 no comprende ningún canal 30 de reacción, pero el mezclador 10 es mayor que en la figura 1 para garantizar el tiempo de reacción prolongado para proporcionar las nanopartículas.

La figura 3 muestra un ejemplo adicional del sistema de reactor para producir nanopartículas basadas en gelatina según el procedimiento de la presente invención. Este ejemplo es el mismo que en la figura 1 excepto porque el reactor 100 no comprende un segundo mezclador, sino que se usa un divisor en T para la adición del agente de reticulación.

La figura 4 muestra un ejemplo adicional del sistema de reactor para producir nanopartículas basadas en gelatina según el procedimiento de la presente invención. Este ejemplo es el mismo que en la figura 2 excepto porque el reactor 100 no comprende un segundo mezclador, sino que se usa un divisor en T para la adición del agente de reticulación.

La figura 5 muestra un ejemplo adicional del sistema de reactor para producir nanopartículas basadas en gelatina según el procedimiento de la presente invención. Este ejemplo es el mismo que en la figura 2 excepto porque el reactor 100 no comprende un segundo mezclador y el agente de reticulación se añade fuera del reactor.

La figura 6 muestra un ejemplo del sistema de reactor para medir la eficacia de mezclado mediante el método de Villermaux/Dushman. En esta figura, la salida del microrreactor está conectada a una celda UV que está acoplada a un ordenador para analizar la absorción UV. Se puede determinar la eficacia de mezclado de los reactores ilustrados en las figuras 1-5 estableciendo la velocidad de flujo Q a cero y realizando por tanto la configuración de la figura 6.

La figura 7 muestra dos ejemplos de un elemento de mezclado usado en el procedimiento según la presente invención. El elemento de mezclado de la figura 7 puede usarse como el primer mezclador 10 en las figuras 1-6.

Experimentos

Se llevaron a cabo experimentos usando las siguientes disoluciones:

Disolución A (0,0165 M): Gelatina A de piel de cerdo (CAS: 9000-70-8) (al 5% p/v) en agua (se ajusta el pH a 2,5)

Disolución B: Acetona p.a.

5 Disolución Q (0,1 M): Glutaraldehído (al 1% p/v) en agua/acetona (1:2,57 v/v)

Nota: se preparó la disolución Q mediante dilución de GTA (al 25% p/v) en agua con agua/acetona (1:3 v/v)

La razón del agente de reticulación con respecto al grupo amina de la gelatina era de 1,1.

10

Experimento 1

Se usó el sistema de reactor ilustrado en la figura 4. La primera unidad de mezclado tenía una estructura tal como se ilustra en la figura 7(a).

15

El volumen de reactor era de 2,4 ml. El número de divisiones en el reactor era de 70. La sección transversal del canal era de $1,0 \text{ mm}^2$.

20

Se mantuvo la disolución A a una temperatura elevada mediante calentamiento de la disolución madre con una manta calorífica y se mantuvo a 40°C. Se alimentaron las disoluciones A, B y Q al sistema a una velocidad de flujo tal como se muestra en la tabla 1. En la tabla 1 también se muestra el periodo desde el punto de tiempo en el que se alimentaron los flujos a las entradas del reactor hasta el punto de tiempo en el que la corriente mezclada entró en contacto con el primer divisor.

25

En cada ejemplo, la mezcla líquida que salía del canal de reacción era una suspensión lechosa, indicando que se obtuvo una suspensión de nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina. Sin embargo, en los ejemplos 1-5 el reactor se atascó después de un breve periodo de tiempo.

30

Se dejaron las suspensiones de nanopartículas resultantes durante 16 horas para permitir completarse la reacción de reticulación de GTA. Se diluyeron de 3 a 4 gotas de la disolución hasta ~ 1 ml de agua mQ y se analizaron con dispersión de luz dinámica (DLS). Después de eso, se añadieron ~ 5 ml (un volumen aproximadamente igual al de la suspensión) de disolución de glicina (100 mM) para bloquear el GTA sin reaccionar. Se lavaron las suspensiones de nanopartículas 3 veces usando ciclos de centrifugación y resuspensión de nanopartículas en agua MilliQ. Tras la tercera centrifugación, se resuspendieron las nanopartículas en una mezcla de acetona y agua MilliQ (1:3) y se liofilizaron para dar un polvo seco.

35

Tabla 1

Ejemplo	Flujo A	Flujo B	Suma de velocidad de flujo de A+B	Flujo Q	Periodo desde la entrada hasta la primera división (s)	Tiempo de residencia (min)	Tamaño (nm)	PDI
1-1	0,10	0,30	0,40	0,0165	4,25	6,00	219	0,04
1-2	0,20	0,60	0,80	0,033	2,13	3,00	207	0,03
1-3	0,40	1,20	1,60	0,066	1,06	1,50	160	0,02
1-4	1,00	3,00	4,00	0,165	0,43	0,60	154	0,03
1-5*	2,00	6,00	8,00	0,33	0,21	0,30	145	0,06
1-6	0,20	0,60	0,80	0,033	2,13	3,00	191	0,10

40 *Después de 30 minutos el reactor se arruina en este tipo y tamaño de reactor, debido a ensuciamiento del reactor

Todas las velocidades de flujo están en ml/min. En el ejemplo 1-6 se cambió la gelatina A (disolución A) por gelatina B (piel bovina (CAS: 9000-70-8)). El procedimiento era idéntico a la producción de nanopartículas a partir de gelatina A.

45

Se determinó la eficacia de mezclado para la suma de las velocidades de flujo de A+B usadas en cada ejemplo según el método de Villermaux/Dushman usando disoluciones X e Y, tal como se muestra en la tabla 2.

Especificaciones de las disoluciones X e Y

Disolución X (en agua desmineralizada):	KI 0,0319 mol/l KIO ₃ 0,0063 mol/l H ₂ BO ₃ ⁻ 0,0898 mol/l NaOH 0,0898 mol/l
Disolución Y (en agua desmineralizada):	H ₂ SO ₄ 0,015 mol/l

Se bombearon las disoluciones X e Y a través del reactor con una razón de velocidades de flujo de 1:1 tal como se representa en la tabla 2. La temperatura del reactor era de 22°C. Se bombeó el flujo de salida del reactor directamente al interior de la celda UV (marca: Avantes, véanse las especificaciones) para medir la absorción UV a 286 nm (altura de pico). Se conectaron el reactor y la celda UV con un tubo de 1,0 metro con un D.I. de 0,02". La absorbancia medida es igual a la eficacia de mezclado.

Especificaciones de la celda UV:

Avantes (Avalight DHc y AvaSpec-ULS3648)

Datos técnicos de la celda UV

Tipo de celda de flujo	Microcelda de flujo Z-1,5
Intervalo de longitud de onda	200 – 2500 nm
Longitud del camino óptico	1,5 mm
Volumen de muestra	3 µl
D.E. de tubo de conexión	1,5 mm (1/16")
Escala de presión	10 bar
Acoplamiento de fibra óptica	Casquillo de 1,6 mm
Dimensiones / material	32 x 38 x 13 mm / PEEK

Software

Versión 7 del software del espectrómetro para Windows95/98/2000/NT/ME/XP/Vista para AvaSpec (AvaSoft 7.5.3).

Tabla 2

Ejemplo	Flujo X	Flujo Y	Suma de velocidad de flujo de X+Y	Eficacia de mezclado Ab (286 nm)
1-1	0,20	0,20	0,40	1,36
1-2	0,40	0,40	0,80	1,01
1-3	0,80	0,80	1,60	0,65
1-4	2,00	2,00	4,00	0,42
1-5	4,00	4,00	8,00	0,21
1-6	0,40	0,40	0,80	1,01

Para cada suma de la velocidad de flujo, se determinó la eficacia de mezclado tal como se muestra en la tabla 2. Comparando las tablas 1 y 2, puede observarse que la suma de las velocidades de flujo de 8,00 que da como resultado una eficacia de mezclado de más de 0,21 lleva a un procedimiento relativamente inestable para la preparación de las nanopartículas de gelatina. Por tanto, la suma de las velocidades de flujo se elige preferiblemente de manera que la eficacia de mezclado sea de más de 0,21, por ejemplo al menos 0,25.

Experimento 2

Se usó el sistema de reactor ilustrado en la figura 4. La primera unidad de mezclado tiene una estructura tal como se ilustra en la figura 7(b). La segunda unidad de mezclado no tenía una estructura para dividir y recombinar el flujo.

El volumen de reactor era de 3,0 ml. El número de divisiones en el reactor era de 135. La sección transversal del canal era de 1,0 mm².

Excepto por el tipo de reactor (diferente tipo de divisiones y volumen de reactor), el experimento se realizó del mismo modo que en el experimento 1.

En cada ejemplo, la mezcla líquida que salía del canal de reacción era una suspensión lechosa, indicando que se obtuvo una suspensión de nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina. Ya después de la 30ª división, la mezcla líquida era una suspensión lechosa.

Se trataron y analizaron las disoluciones de nanopartículas resultantes de la misma manera que en el experimento 1. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Ejemplo	Flujo A	Flujo B	Suma de velocidad de flujo de A+B	Flujo Q	Periodo desde la entrada hasta la primera división (s)	Tiempo de residencia (min)	Tamaño (nm)	PDI
2-1	0,10	0,30	0,40	0,0165	4,45	7,50	140	0,10
2-2	0,20	0,60	0,80	0,033	2,22	3,75	129	0,08
2-3	0,50	1,50	2,00	0,0825	0,89	1,50	139	0,05
2-4	1,00	3,00	4,00	0,165	0,45	0,75	105	0,07
2-5	2,00	6,00	8,00	0,330	0,22	0,375	101	0,05

5 Se obtuvo una dispersión de nanopartículas mediante un procedimiento estable. Se espera que la eficacia de mezclado para el reactor usado en este experimento para las velocidades de flujo tal como se indica en la tabla 3 sea de entre 0,1 y 1,5.

Experimento 3: experimento discontinuo: 1,25 g

10 Se disolvieron 1,25 g de gelatina A en 25 ml de agua MilliQ a 50°C. A continuación, se añadieron 25 ml de acetona de una sola vez y se dejó enfriar la disolución hasta temperatura ambiente durante una hora. Se desechó el sobrenadante y volvió a disolverse el residuo en 25 ml de agua MilliQ. Se ajustó el pH a 3,0 con adición de HCl 1 N. Se calentó la disolución hasta 50°C y se agitó a 600 rpm. Se añadieron 75 ml de acetona con una velocidad de flujo de 1,76 ml/min. Una vez que se completó la adición de la acetona, se añadieron 4,125 ml de glutaraldehído y se
15 agitó la disolución durante otras 16 horas. Se diluyeron de 3 a 4 gotas de la disolución hasta ~1 ml de agua mQ y se analizaron con dispersión de luz dinámica (DLS).

Experimento 4: experimento discontinuo: 12,5 g

20 Se disolvieron 12,5 g de gelatina A en 250 ml de agua MilliQ a 50°C. A continuación, se añadieron 250 ml de acetona de una sola vez y se dejó enfriar la disolución hasta temperatura ambiente durante una hora. Se desechó el sobrenadante y volvió a disolverse el residuo en 250 ml de agua MilliQ. Se ajustó el pH a 3,0 con adición de HCl 1 N. Se calentó la disolución hasta 50°C y se agitó a 600 rpm. Se añadieron 750 ml de acetona con una velocidad de flujo de 17,6 ml/min. Una vez que se completó la adición de la acetona, se añadieron 41,25 ml de glutaraldehído y se
25 agitó la disolución durante otras 16 horas. Se diluyeron de 3 a 4 gotas de la disolución hasta ~1 ml de agua mQ y se analizaron con dispersión de luz dinámica (DLS).

Tabla 4

Experimento	Escala	Tamaño (nm)	PDI
3	1,25 g	419	0,19
4	12,5 g	289	0,24

30 Puede observarse que el tamaño y el PDI de las nanopartículas de gelatina difieren sustancialmente dependiendo de la escala de la producción para el procedimiento discontinuo. Se encuentra que el PDI es muy alto.

Ejemplo 5

35 Se usó el sistema de reactor ilustrado en la figura 4. La unidad de mezcla tiene una estructura tal como se ilustra en la figura 7(a).

40 Excepto por la concentración de la disolución de gelatina, el experimento se realizó de la misma manera que en el experimento 1. Se hizo variar la concentración de la disolución de gelatina tal como se indica en la tabla 6.

En cada ejemplo, la mezcla líquida que salía del canal de reacción era una suspensión lechosa, indicando que se obtuvo una suspensión de nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina obtenidas.

45 Se trataron y analizaron las disoluciones de nanopartículas resultantes de la misma manera que en el experimento 1. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Ejemplo	Concentración (%)	Flujo A	Flujo B	Suma de velocidad de flujo de A+B	Flujo Q	Periodo desde la entrada hasta la primera división	Tiempo de residencia (min)	Tamaño (nm)	PDI
6-1	2,5	0,2	0,6	0,8	0,033	2,13	3,00	128	0,09
6-2	5	0,2	0,6	0,8	0,033	2,13	3,00	207	0,03
6-3	7,5	0,2	0,6	0,8	0,033	2,13	3,00	216	0,03
6-4	10	0,2	0,6	0,8	0,033	2,13	3,00	246	0,03

El ejemplo 6-2 es idéntico al ejemplo 1-2.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento continuo para la preparación de nanopartículas basadas en gelatina en un reactor que comprende un canal de procedimiento que comprende un elemento de mezclado en el mismo, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:
- 5
- A) alimentar por separado una disolución acuosa de gelatina a una primera velocidad y un disolvente orgánico miscible en agua a una segunda velocidad al canal de procedimiento del reactor para mezclarse en el mismo, para formar una suspensión de nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina y
- 10 B) reticular las nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina,
- en el que la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad se eligen de manera que el reactor tiene una eficacia de mezclado tal como se determina mediante el método de Villermaux/Dushman de entre 0,1 y 1,5,
- 15 el periodo desde el punto de tiempo en el que se alimenta la disolución acuosa de gelatina al reactor hasta el punto de tiempo en el que la mezcla de la disolución acuosa de gelatina y el disolvente orgánico entra en contacto con el elemento de mezclado es como máximo de 15 segundos,
- y en el que la eficacia de mezclado se determina alimentando una disolución de KI 0,0319 mol/l, KIO₃ 0,0063 mol/l, H₂BO₃⁻ 0,0898 mol/l y NaOH 0,0898 mol/l desde una entrada y una disolución de H₂SO₄ 0,015 mol/l a otra entrada del reactor a una razón en volumen de 1:1 y midiendo la absorbancia de UV a 286 nm en la salida del reactor.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en la que la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad se elige de manera que el procedimiento tiene una eficacia de mezclado tal como se determina mediante el método de Villermaux/Dushman de entre 0,25 y 1,3, más preferiblemente entre 0,5 y 1,0.
- 25
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el periodo desde el punto de tiempo en el que se alimenta la disolución acuosa de gelatina al reactor hasta el punto de tiempo en el que la mezcla de la disolución acuosa de gelatina y el disolvente orgánico entra en contacto con el elemento de mezclado es de 0,01 a 10 segundos.
- 30
4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la disolución acuosa de gelatina comprende del 0,1 al 18% (p/v) de la gelatina.
- 35
5. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que se alimenta una disolución de un agente de reticulación en la etapa B) de manera que la razón del agente de reticulación con respecto al grupo amina de la gelatina es de 0,5 a 2,0, preferiblemente de 1,1 a 1,3.
- 40
6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la razón de la segunda velocidad con respecto a la primera velocidad es de entre 2 y 4, preferiblemente de 2,75 a 3,25.
7. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la sección transversal del canal de procedimiento es de 0,5 a 5 mm², más preferiblemente de 1 a 3 mm².
- 45
8. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el elemento de mezclado proporciona al menos 10 veces una división del flujo.
9. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la suma de la primera velocidad y la segunda velocidad es de 0,4 a 4,0 ml/min por sección transversal del canal en mm².
- 50
10. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la disolución de gelatina tiene un pH de 2 a 4.
11. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el disolvente orgánico se elige del grupo que consiste en metanol, 2-propanol, acetonitrilo y acetona.
- 55
12. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el agente de reticulación se elige del grupo que consiste en dialdehidos, formaldehído, isocianatos, diisocianatos, carbodiimidas y dihaluros de alquilo.
13. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que las nanopartículas basadas en gelatina comprenden además un compuesto farmacéuticamente activo.
- 60
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la disolución acuosa de gelatina y/o el disolvente orgánico miscible en agua comprende el compuesto farmacéuticamente activo.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el compuesto farmacéuticamente activo se alimenta al reactor tras la formación de la suspensión de las nanopartículas no reticuladas basadas en gelatina.

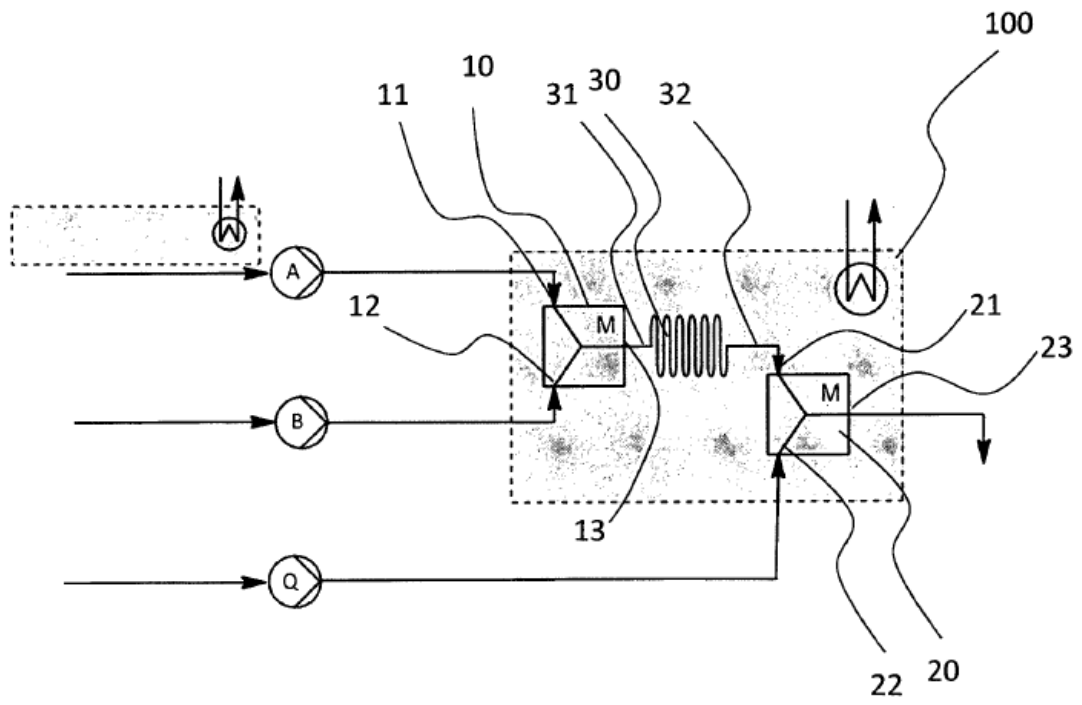


Fig. 1

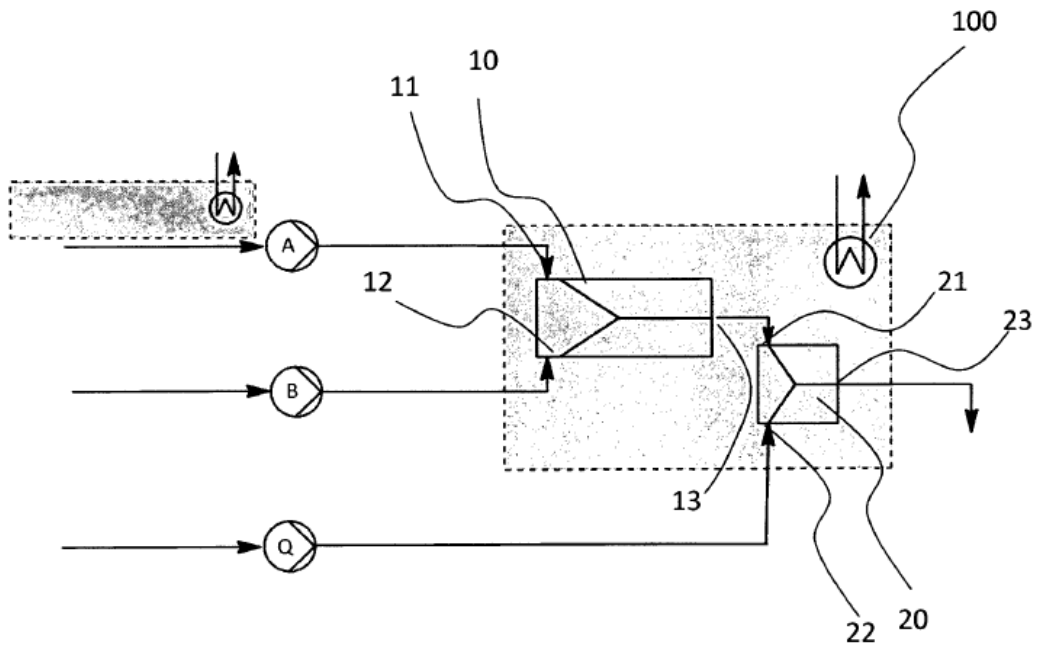


Fig. 2

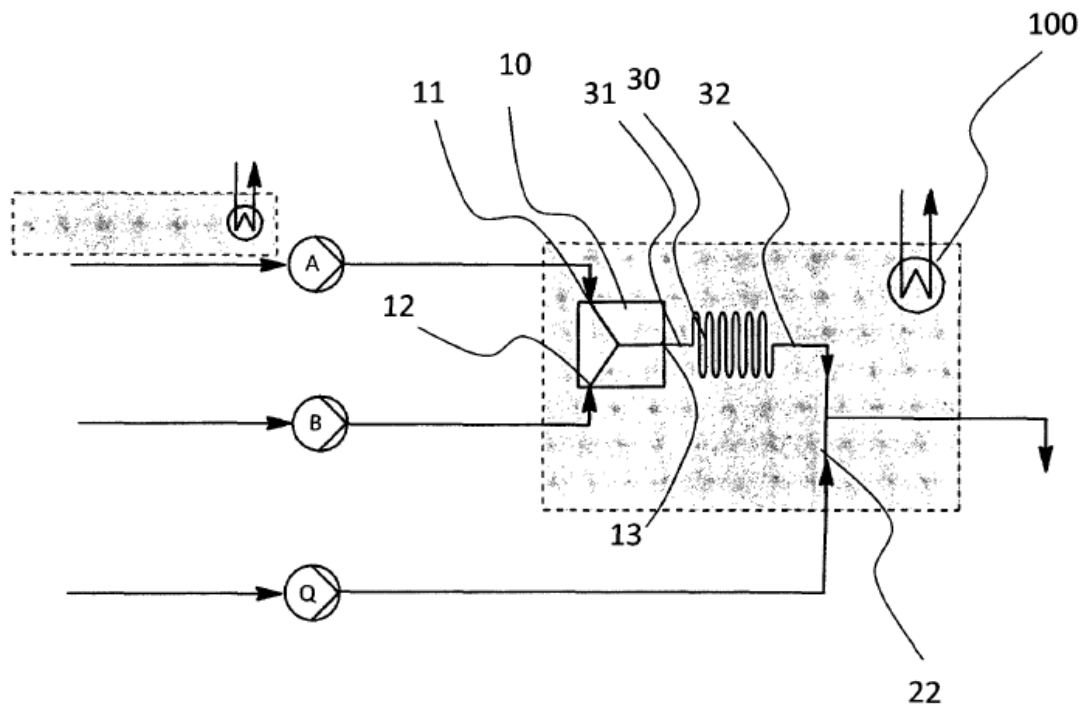


Fig. 3

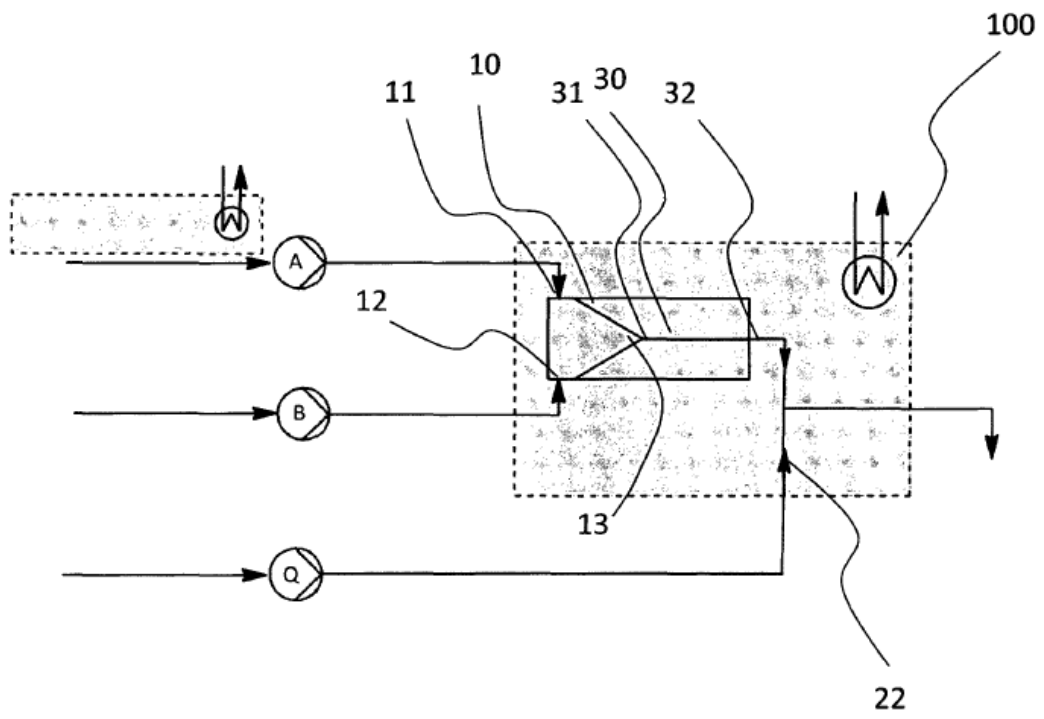


Fig. 4

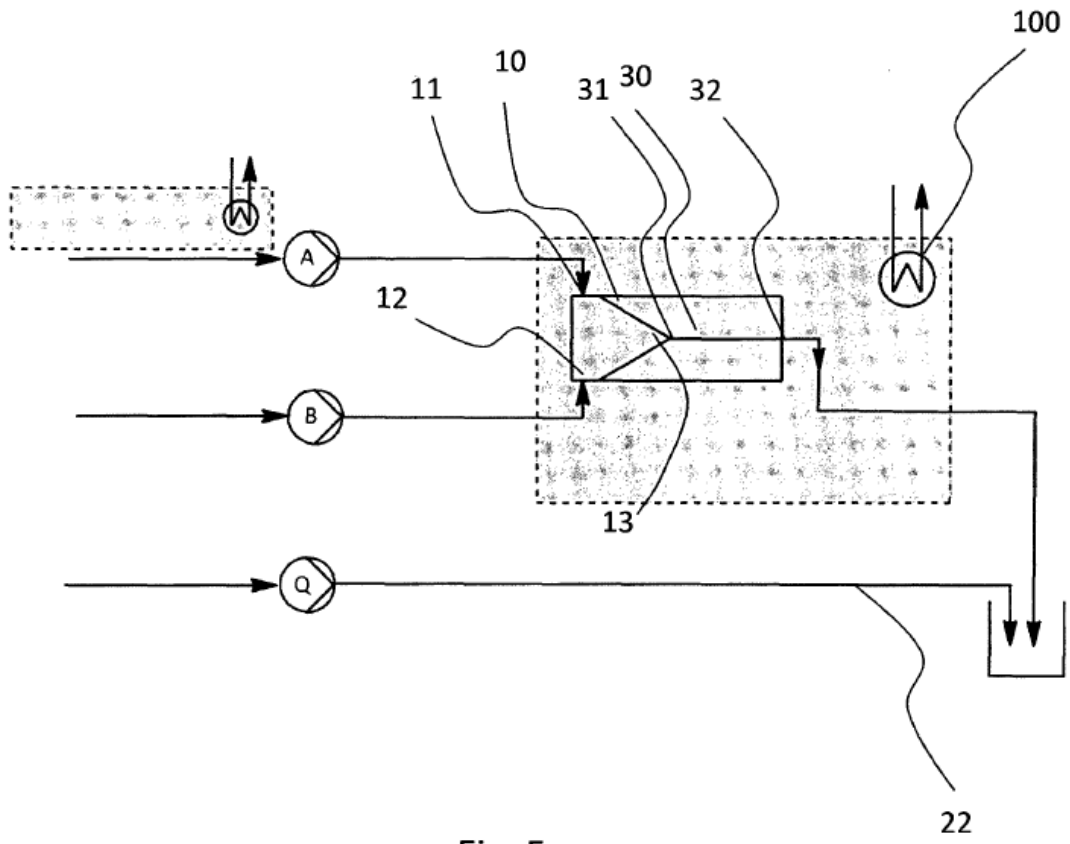


Fig. 5

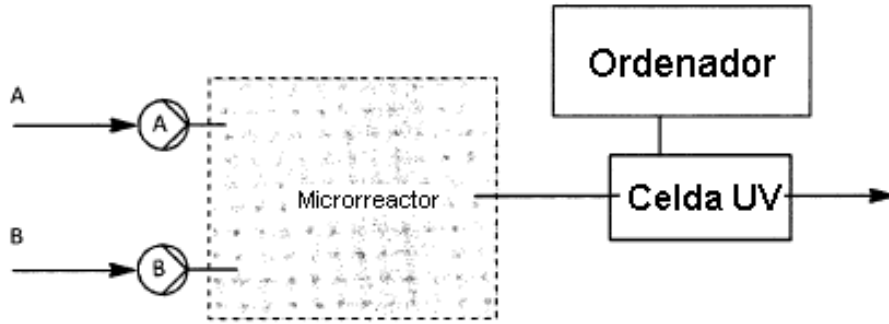


Fig. 6

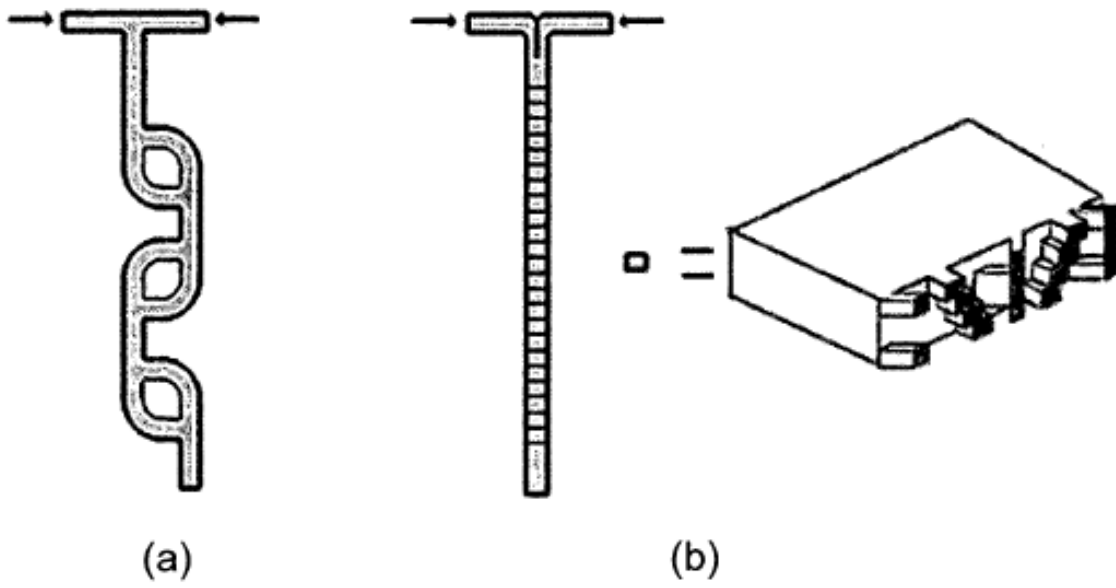


Fig. 7