

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 098**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2011 PCT/EP2011/070951**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069591**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011 E 11790937 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2643022**

54 Título: **Composiciones de disgregación rápida que comprenden Nabilona y β ciclodextrina metilada de manera aleatoria**

30 Prioridad:

25.11.2010 EP 10192497

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

23.10.2018

73 Titular/es:

**AOP ORPHAN PHARMACEUTICALS AG (100.0%)
Wilhelminenstrasse 91/II f
1160 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**VIERNSTEIN, HELMUT;
TOEGEL, STEFAN y
SCHUELLER, REGINA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 687 098 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

Composiciones de disgregación rápida que comprenden Nabilona y β ciclodextrina metilada de manera aleatoria

5 La presente invención proporciona una nueva composición que comprende Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB), en donde la razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) entre Nabilona y RAMEB es de 1:60 - 1:140.

10 La Nabilona es un cannabinoide totalmente sintético y cristalino con uso terapéutico como agente antiemético y ansiolítico y como analgésico adjunto para el dolor neuropático. La Nabilona se aprobó por primera vez en los Estados Unidos en 1985 bajo el nombre comercial "Cesamet" en forma de cápsulas de gelatina rígida. El efecto positivo del uso de Nabilona para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia (CINV) y el aumento de la calidad de vida de los pacientes se demostró en varios estudios clínicos.

15 La solubilidad acuosa de la Nabilona es extremadamente baja, inferior a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 25°C. La aparición de al menos cuatro formas polimorfas distintas con diferentes características de biodisponibilidad complica aún más el desarrollo de una forma de dosificación estable.

20 Hasta el presente, debido a su escasa solubilidad en agua, la Nabilona está disponible solo como cápsula de gelatina, lo que es muy desventajoso, especialmente para pacientes que sufren náuseas y tienen dificultades para tragar estas cápsulas.

25 Las ciclodextrinas están bien establecidas como excipientes farmacéuticos que forman complejos anfitrión-huésped con moléculas hidrófobas, lo que aumenta la solubilidad en agua de la molécula huésped. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que consisten en unidades de α -D-glucopiranosas unidas (α -1,4), con una cavidad central lipófila y una superficie externa hidrófila. Las ciclodextrinas típicas están constituidas por 6-8 unidades de glucopiranosido y pueden representarse topológicamente como toroides, exponiendo las aberturas más grandes y más pequeñas del toroide al disolvente secundario y a los grupos hidroxilo primarios, respectivamente. Debido a esta disposición, el interior de los toroides no es hidrófobo, sino considerablemente menos hidrófilo que el entorno acuoso y, por lo tanto, capaz de albergar otras moléculas hidrófobas. Por el contrario, el exterior es suficientemente hidrófilo para convertir la solubilidad en agua de las ciclodextrinas o sus complejos.

La formación de los compuestos de inclusión modifica en gran medida las propiedades físicas y químicas de la molécula huésped, principalmente en términos de solubilidad en agua.

35 En el documento WO03/070774 se ha descrito el uso de diversas ciclodextrinas para aumentar la solubilidad de los cannabinoides clásicos de origen natural aislados de Cannabis. Haazekamp A y Verpoorte R. describen las pruebas de solubilidad del cannabinoide de origen natural clásico Tetrahydrocannabinoide en presencia de varias ciclodextrinas (European J. of Pharm Sciences 29 (2006), 340-347).

Souter R., "Nabilone", Analytical Profiles of Drug Substances, vol. 10, 1981, 499-512 describe las características físico-químicas de la Nabilona.

40 Szejtli J., "Cyclodextrins in Pharmaceuticals", 1988, Cyclodextrin Technology, 186-307 describe el uso de ciclodextrina como sustancia auxiliar.

Mannila J. et al., Europ. J. Pharm. Sciences, 26 (2005), 71-77 describen formulaciones sublinguales de cannabinoides.

45 No se describió ningún aumento de la solubilidad de los cannabinoides sintéticos.

El objeto de la presente invención es proporcionar Nabilona en una formulación que pueda superar las desventajas que se enumeran anteriormente.

El objeto se resuelve mediante las realizaciones de la presente invención.

50 Breve descripción de la invención:

55 La presente invención proporciona una formulación preferiblemente para una forma de administración de disgregación rápida como, por ejemplo, un comprimido, que contiene Nabilona en donde la Nabilona tiene una mayor solubilidad en soluciones acuosas y una mayor estabilidad. La mejor solubilidad puede así superar el alto metabolismo de primer paso y las propiedades de baja disolución.

La composición de la invención comprende específicamente Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB), en donde la razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) entre Nabilona y RAMEB es de aproximadamente 1:60 - 1:140, preferiblemente la razón en peso es de aproximadamente 1:90 - 1:110.

60 Específicamente, la composición de la invención comprende Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB) a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110, en donde la Nabilona y la RAMEB están comprendidas como un complejo soluble acuoso. Sorprendentemente, se ha demostrado que la solubilidad de la Nabilona aumentaba mucho cuando se utilizaba RAMEB como agente formador de complejos, estando presente en la composición en el intervalo mencionado

anteriormente.

De acuerdo con una realización de la invención, la Nabilona está presente en la composición en una cantidad de 0,01 a 100 mg, preferiblemente de 0,1 a 50 mg, más preferido de 0,25 a 40 mg, más preferido en una cantidad de aprox. 30 mg con respecto a la forma de medicación.

La composición de la invención puede comprender adicionalmente al menos un vehículo, coadyuvante o aditivo farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos. Específicamente, el aditivo es un agente disgregante. Más específicamente, el agente disgregante se selecciona entre celulosa microcristalina, almidones, sal de sodio de glicolato de almidón, croscarmelosa sódica, crospovidona, povidona, silicato de calcio.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, la composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo de estearato de magnesio, fumarato de magnesio, hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico, talco, sorbitol, manitol, carboximetilcelulosa, lactosa, hidroxipropilmetilcelulosa, colidona o carbopol.

De acuerdo con una realización específica, Nabilona y RAMEB están incluidas como complejo liofilizado en la composición. Alternativamente, Nabilona y RAMEB también pueden estar incluidas como complejos de cuerpo de inclusión, complejos de cuerpo sin inclusión o como producto coprecipitado. La Nabilona no complejada puede estar incluida adicionalmente en la composición de la invención. Más específicamente, la composición comprende un complejo de Nabilona y RAMEB junto con hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico y/o crospovidona, en donde Nabilona y RAMEB están presentes a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110.

La composición de la invención puede ser de cualquier forma útil para la administración de Nabilona, específicamente puede ser un comprimido, una cápsula, una pulverización, una solución o una goma de mascar. Aún más específicamente, la solución comprende aproximadamente 30% en peso de RAMEB.

La ruta oral, preferiblemente sublingual o bucal, es la ruta de administración preferida de la composición de la invención.

Los comprimidos de disgregación rápida (FDT) son formas de administración preferidas ya que se disgregan y/o se disuelven rápidamente para liberar el fármaco tan pronto como entran en contacto con la saliva, obviando así la necesidad de agua durante la administración, un atributo que las hace altamente atractivas para los pacientes que padecen dificultad para tragar comprimidos tales como los pacientes con náuseas persistentes. Además, la absorción puede dar como resultado una mejor biodisponibilidad y, como resultado de una dosificación reducida, un mejor rendimiento clínico a través de una reducción de los efectos no deseados.

De acuerdo con una realización específica de la invención, se proporciona un FDT que comprende entre 10 y 15% en peso, preferiblemente aproximadamente 11,5% en peso de complejo de Nabilona-RAMEB, entre 60 y 95% en peso, preferiblemente aproximadamente 87,5% en peso de agente disgregante y entre 0,5 y 5% en peso, preferiblemente aproximadamente 1% en peso de vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición de la invención se puede utilizar como un medicamento. Específicamente se puede utilizar para la prevención o el tratamiento de náuseas, espasmos musculares, esclerosis múltiple, cólicos uterinos e intestinales, trastornos del movimiento, dolor, incluyendo migrañas, glaucoma, asma, inflamación, insomnio, presión arterial alta y/o una afección que responde a un agente estimulante del apetito, esclerosis lateral amiotrófica, agente anticancerígeno, oxitóxico, ansiolítico, anticonvulsivo, antidepresivo y antipsicótico.

La presente invención proporciona además un método para producir un complejo de RAMEB y Nabilona, en donde Nabilona y RAMEB están presentes a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110 y en donde dicha RAMEB se combina con Nabilona en un estado heterogéneo o en un estado sólido, incluyendo el uso de métodos seleccionados entre liofilización, secado por pulverización, amasado, trituración, método de suspensión, coprecipitación y neutralización, y opcionalmente separación del complejo obtenido.

Específicamente, el método para producir Nabilona soluble acuosa comprende la etapa de complejar la Nabilona con RAMEB.

Adicionalmente, se proporciona un método para aumentar la biodisponibilidad de Nabilona a partir de una preparación administrada por vía sublingual o bucal, que comprende la etapa de complejar la Nabilona con RAMEB y conformar el complejo así obtenido en una forma de dosificación administrada sublingualmente o bucalmente.

La presente invención también proporciona un método para aumentar la solubilidad de Nabilona en solución acuosa

formando complejos de Nabilona y RAMEB en donde la Nabilona se agita durante aproximadamente 96 h en presencia de RAMEB a aproximadamente 25% o 30% y manteniendo una temperatura de reacción constante de aproximadamente 25°C.

5 Figuras:

Fig. 1: Estructura química de Nabilona

Fig. 2: Curva patrón de Nabilona

Fig. 3: Curva patrón del complejo Nabilona-RAMEB

10 Fig. 4: La solubilidad de Nabilona en agua como una función de la concentración de RAMEB a 25°C.

Fig. 5: La solubilidad de Nabilona en soluciones de RAMEB como una función del tiempo de reacción.

Fig. 6: La solubilidad de Nabilona en soluciones de RAMEB (5-50%) a 25°C.

Fig. 7: La solubilidad de Nabilona en soluciones RAMEB después de un tiempo de reacción de 96 h a diferentes temperaturas de reacción.

15 Fig. 8: Isotermas de solubilidad del complejo de Nabilona-RAMEB después de un tiempo de reacción de 96 h a diferentes temperaturas de reacción.

Fig. 9: Los espectros NIR de Nabilona (línea inferior), RAMEB (línea superior) y el complejo de Nabilona-RAMEB (línea media).

Fig. 10: Los espectros FTIR de Nabilona.

20 Fig. 11: Los espectros FTIR de RAMEB (línea superior) y el complejo de Nabilona-RAMEB (línea inferior) en un intervalo de 1.800 y 900 cm^{-1} .

Fig. 12: Los espectros FTIR de RAMEB (línea inferior) y el complejo de Nabilona-RAMEB (línea superior) en un intervalo de 3.000 y 2.700 cm^{-1} .

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca una composición que comprende Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB) a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110, en donde Nabilona y RAMEB están incluidas como un complejo soluble acuoso. Como una realización alternativa, la composición puede comprender adicionalmente Nabilona no complejada adicional, específicamente en el intervalo de aproximadamente 0,001 - 0,01:60, más específicamente de aproximadamente 0,001 - 0,01:140.

35 Alternativamente, la invención proporciona una composición que comprende Nabilona y RAMEB, en donde la razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) entre Nabilona y RAMEB es de aproximadamente 1:60 a 1:140, preferiblemente la razón en peso es de aproximadamente 1:90 a 1:110.

De acuerdo con la presente invención, el término "complejo" denota un complejo de cuerpos de inclusión, un complejo de cuerpos de no inclusión, un coprecipitado o un complejo liofilizado. Preferiblemente, es un complejo liofilizado o un complejo de inclusión.

40 Sorprendentemente, se descubrió que la presencia de RAMEB en el intervalo específico de razones en peso puede aumentar la solubilidad acuosa de Nabilona significativamente. Por lo tanto, se supone que el uso de RAMEB como agente formador de complejos en el intervalo de concentración específico es esencial para el notable aumento de la solubilidad acuosa de la Nabilona. También se demostró mediante la presente invención que otras ciclodextrinas que son, de acuerdo con la técnica anterior, equivalentes como potenciadores de la solubilidad, no mostraron un efecto significativo sobre la solubilidad de la Nabilona. La inclusión de Nabilona en RAMEB da como resultado una afinidad mucho mayor que con β -CD no metilada o con el compuesto trimetilado. La selección de RAMEB es esencial para la presente invención.

50 Por lo tanto, se pueden lograr altas concentraciones de Nabilona en soluciones acuosas. La razón en peso más preferida (peso seco con respecto a peso seco) está entre 1:60 y 1:140, preferiblemente entre 1:90 y 1:110. Cuando se utiliza RAMEB en una solución acuosa, tal solución preferiblemente contiene RAMEB a una concentración de aproximadamente 20 a 35%, preferiblemente de aproximadamente 25 a 30% en peso. La RAMEB a una concentración de 40% en peso o más da como resultado una disminución en la solubilidad de la Nabilona. También se puede proporcionar una formulación para un comprimido de disgregación rápida que comprende Nabilona que tiene complejos de Nabilona-RAMEB como principio activo, proporcionando así una mayor solubilidad de la Nabilona en soluciones acuosas y evitando la inestabilidad del fármaco asociado con formas polimórfas. Específicamente, dichos complejos son complejos de inclusión y/o de no inclusión.

60 La composición de la invención puede contener adicionalmente vehículos, coadyuvantes o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica. El aditivo puede ser, por ejemplo, un agente disgregante. Los agentes disgregantes son conocidos en la técnica, por ejemplo, Ludiflash® es un acelerador bien conocido para proporcionar formas de administración de disgregación rápida. Ludiflash® comprende manitol, crospovidona, povidona y polivinilpirrolidona.

- 5 Específicamente para preparar formas de administración oral como comprimidos de disgregación rápida (FDT) o cápsulas, se pueden utilizar agentes disgregantes, específicamente agentes como celulosa microcristalina, almidones, sal de sodio de glicolato de almidón, croscarmelosa sódica, polivinilpirrolidona, povidona o silicato de calcio o combinaciones de los mismos.
- 10 Otros vehículos farmacéuticamente aceptables como estearato de magnesio, fumarato de magnesio, hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico, talco, sorbitol, manitol, carboximetilcelulosa, lactosa, hidroxipropilmetilcelulosa, colidona y carbopol pueden estar presentes en la composición de la invención.
- 15 Como es bien sabido en la técnica, también se pueden agregar otros ingredientes adicionales para mejorar el sabor de las formas de administración oral.
- Más específicamente, la composición del complejo de Nabilona/RAMEB puede comprender agentes adicionales como hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico y crospovidona y combinaciones de los mismos.
- 20 De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona una FDT que comprende entre 10 y 15% en peso de complejo de Nabilona-RAMEB, entre 60 y 95% en peso de agente disgregante y entre 0,5 y 5% en peso de vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 Más específicamente, la formulación de FDT comprende aproximadamente 11,5% de complejo de Nabilona/RAMEB, aproximadamente 87,5% de agente disgregante y aproximadamente 1% de vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier agente disgregante y material de vehículo y cualquier combinación de los mismos.
- De acuerdo con una realización específica, el agente disgregante es Ludiflash® y/o croscarmelosa y el vehículo farmacéuticamente aceptable es hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico y/o talco.
- 30 Una composición específica puede contener Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB) a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110 en donde Nabilona y RAMEB están incluidas como un complejo soluble en agua, hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico y crospovidona o cualquier combinación de los mismos. Como una realización adicional, la Nabilona no complejada puede estar incluida adicionalmente en dicha composición.
- 35 Adicionalmente, también pueden estar incluidos en la composición de la invención polímeros mucoadherentes para el suministro bucal tales como agarosa, quitosano, gelatina, ácido hialurónico, diversos cauchos, derivados de celulosa como CMC, CMC tiolada, HEC, HPC, HPMC; poliacrilatos, metacrilatos, polioxietileno, PVA, polímeros tiolados o combinaciones de los mismos.
- 40 La composición de la invención puede ser de cualquier forma útil para administrar Nabilona, específicamente puede estar en forma de un comprimido, por ejemplo, un comprimido bioadherente para suministro bucal, una cápsula, una pulverización, una solución o una goma de mascar. Alternativamente, también se proporciona la administración tópica de la composición, como cremas, ungüentos, jaleas, soluciones o suspensiones en donde la composición se formula junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, también se pueden proporcionar formas de administración pulmonar o nasal.
- 45 Si el complejo está en forma de una solución, la solución preferiblemente comprende aproximadamente 30% en peso de RAMEB. Cuando se utiliza RAMEB como agente formador de complejo, se ha demostrado que las soluciones que comprenden entre 25 y 35%, específicamente ≥ 25 y $\leq 35\%$, preferiblemente aproximadamente 30% de RAMEB conducen a una solubilidad acuosa altamente incrementada de Nabilona.
- 50 La composición puede ser una composición farmacéutica utilizada como medicamento, específicamente para uso oral, más específicamente para uso sublingual o bucal.
- 55 Cuando los comprimidos son la forma de administración seleccionada, la presente invención también proporciona un método optimizado para la producción de comprimidos de disgregación rápida en donde la fuerza de compresión optimiza la dureza y el tiempo de disgregación de dichos comprimidos que contienen Nabilona que pueden aumentar la disponibilidad óptima del agente activo. La fuerza de compresión es de aproximadamente 1,2 kN y parece específicamente ventajosa para la producción de comprimidos de disgregación rápida que contienen el complejo de la invención de Nabilona-RAMEB.
- 60 La dosis terapéutica de Nabilona puede variar dependiendo de la edad y el peso corporal del individuo, así como de la afección concreta que se vaya a tratar y de la forma de administración. La dosis puede ser determinada fácilmente por una persona experta.

De acuerdo con una realización específica, la cantidad de Nabilona presente en la composición para uso oral puede ser de 0,01 mg a 5 g, preferiblemente de 0,01 mg a 100 mg, preferiblemente de 0,1 a 50 mg, más preferido de 0,25 y 15 mg, más preferido en una cantidad de aproximadamente 0,3 mg. La composición puede administrarse varias veces al día según corresponda.

Debido a la mayor biodisponibilidad de la composición del complejo de Nabilona-RAMEB de la invención y a la superación de la pérdida de agente activo debido al metabolismo de primer paso, también se pueden administrar dosis más pequeñas de Nabilona.

La composición de la invención se puede utilizar para el tratamiento de cualquier enfermedad en donde sea aplicable la administración de un cannabinoide sintético. Por ejemplo, se puede utilizar para el tratamiento de náuseas, espasmos musculares, esclerosis múltiple, cólicos uterinos e intestinales, trastornos del movimiento, dolor, incluyendo migraña, glaucoma, asma, inflamación, insomnio, presión arterial alta y/o para el tratamiento de una afección que responde a un agente estimulante del apetito, esclerosis lateral amiotrófica, anticancerígeno, oxitóxico, ansiolítico, anticonvulsivo, antidepresivo y antipsicótico.

La presente invención también proporciona un método para producir un complejo de RAMEB y Nabilona, en donde la Nabilona y la RAMEB están presentes a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110 y en donde dicha RAMEB se combina con Nabilona en un estado heterogéneo o en estado sólido utilizando métodos seleccionados entre liofilización, secado por pulverización, amasado, molienda, método de suspensión, coprecipitación y neutralización, y opcionalmente separación del complejo obtenido.

Mediante la liofilización de una solución que contiene RAMEB y Nabilona, se puede proporcionar Nabilona en forma de un polvo homogéneo que tiene excelentes propiedades de disolución. En este polvo, la Nabilona se compleja con RAMEB formando cuerpos de inclusión. La tasa de disolución de la Nabilona aumenta debido a las excelentes propiedades de solubilidad y disolución de RAMEB.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para producir Nabilona soluble acuosa que comprende la etapa de complejar la Nabilona con RAMEB.

También se proporciona un método para aumentar la biodisponibilidad de Nabilona en una preparación administrada por vía sublingual o bucal que comprende las etapas de complejar la Nabilona con RAMEB y formular el complejo obtenido como una forma de dosificación administrable por vía sublingual o bucal.

Como una realización alternativa, la presente invención proporciona adicionalmente un método para aumentar la solubilidad de la Nabilona en solución acuosa al complejar Nabilona y RAMEB en donde la Nabilona se agita durante aproximadamente 96 h en presencia de aproximadamente 25% a aproximadamente 30% en peso de RAMEB y manteniendo una temperatura de reacción constante de aproximadamente 25°C.

Los ejemplos descritos en la presente memoria son ilustrativos de la presente invención y no se pretende que sean limitantes de la misma. Se han descrito diferentes realizaciones de la presente invención de acuerdo con la presente invención. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de las técnicas descritas e ilustradas en la presente memoria sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por consiguiente, se debe entender que los ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplos:

50 Materiales

La Nabilona se obtuvo de Loba Feinchemie (Fischamend, Austria). La Gamma-ciclodextrina (γ -CD; Gamma W8 Pharma), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD; Cavasol W7 HP Pharma) y la β -citodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB; Cavasol® W7 M) se adquirieron de Wacker Chemie (Munich, Alemania). La alfa-ciclodextrina (α -CD; Cavamax W6) y la beta-ciclodextrina (β -CD; Kleptose) se obtuvieron de International Specialty Products Inc (Colonia, Alemania) y Roquette (Lestrem, Francia), respectivamente. La sal de sodio de éter sulfobutílico de β -CD (SBE- β -CD; Captisol) fue proporcionada por Cydex Pharmaceuticals (Lenexa, USA). Para la HPLC, se preparó agua bidestilada utilizando un Buchi Fontavapor 285 (Essen, Alemania) mientras que el acetonitrilo se obtuvo de Sigma (Viena, Austria). Para la preparación de la formulación FDT, se obtuvo Ludiflash® de BASF (Viena, Austria). La sal de sodio de carboximetilcelulosa entrecruzada (Na-CMC, Croscarmelosa, Croscarmelosa sódica®) se obtuvo de FMC (Bruselas, Bélgica). El hidrogenocarbonato sódico y el anhídrido del ácido cítrico se obtuvieron de Kwizda (Viena, Austria).

Métodos

Preparación de Nabilona - complejos de inclusión de ciclodextrina

Para la preparación de las isotermas de solubilidad, se añadió un exceso de Nabilona a una serie de dilución de ciclodextrinas en agua destilada. El exceso de Nabilona fue aproximadamente de 130% la cantidad máxima de Nabilona que podría resolverse teóricamente en la solución de ciclodextrina. Para la preparación de curvas patrón, se añadió una cantidad exactamente ponderada de Nabilona a una solución acuosa de RAMEB. A continuación, las suspensiones se agitaron a 600 rpm a una temperatura constante (4°C - 40°C) en una sala fría o en una cámara de simulación ambiental durante los periodos de tiempo indicados. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm y se filtraron para eliminar las partículas no disueltas antes de la liofilización o análisis por HPLC.

Liofilización de Nabilona - complejos de inclusión de ciclodextrina

Las soluciones filtradas de los complejos de Nabilona - ciclodextrina se congelaron en forma de una película delgada sobre el lado interno del recipiente de vidrio de fondo redondo en un baño de metanol - hielo seco. La liofilización se realizó durante 20 h utilizando un aparato Heto Power Dry LL3000 (Thermo Fisher Scientific).

Estimación del contenido de Nabilona en los productos liofilizados

Los productos liofilizados se agitaron con acetonitrilo durante 30 minutos para promover la disociación del complejo y la extracción de la Nabilona. Las muestras se centrifugaron y el residuo se lavó dos veces nuevamente con acetonitrilo. Los sobrenadantes de acetonitrilo combinados se evaporaron a vacío y el residuo se disolvió en una cantidad definida de acetonitrilo. Después de la centrifugación (10.000 rpm, 5 min), se midió el contenido de Nabilona utilizando HPLC y se relacionó con 1 ml de la solución de reacción inicial.

*Análisis del Complejo de Nabilona - RAMEB**HPLC*

El análisis por HPLC del complejo de Nabilona-RAMEB se realizó de acuerdo con procedimientos convencionales.

Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR)

Los espectros de infrarrojo cercano en la región de 12.500-4.000 cm^{-1} se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker MPA FT-NIR (Bruker Optics Inc). Las mediciones se realizaron insertando el Módulo de Fibra Óptica en muestras en polvo de Nabilona, RAMEB, o el complejo de Nabilona-RAMEB liofilizado.

Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR se midieron con un aparato Bruker Tensor 27 FTIR (Bruker Optics, Billerica, MA) equipado con un detector de mercurio-cadmio-telururo (MCT) refrigerado por nitrógeno líquido. Se prepararon soluciones acuosas al 2% de RAMEB y complejo de Nabilona-RAMEB, así como una solución al 0,1% de Nabilona en acetonitrilo y se cargaron 20 μl de cada muestra en la celda de BioATR II. Se obtuvieron barridos espectrales en el intervalo de 900-4.000 cm^{-1} y corrigieron por sustracción de los espectros de disolvente como fondo. Los datos fueron recogidos y analizados utilizando el soporte lógico OPUS proporcionado con el aparato.

Modelado molecular

Inicialmente, el centro de masa de la Nabilona se insertó en el centro de masa de la molécula de β -CD, seguido de la optimización de MM+ del complejo de inclusión utilizando el paquete de soporte lógico HyperChem. Esta estructura preliminar se utilizó como punto de partida para la optimización geométrica del complejo de Nabilona-CD mediante un método DFT (Teoría Funcional de la Densidad) más avanzado (B3LYP/6-31G (d,p)) implementado en el paquete de programas GAUSSIAN03. Ambas moléculas aisladas del complejo (Nabilona y β -CD también se optimizaron mediante este método y las diferencias de las energías se calcularon para obtener energías de interacción de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E_{\text{int}} = E_{\text{complejo}} - E_{\text{CD}} - E_{\text{Nabilona}}$$

*Preparación de una formulación FDT que contiene el complejo de Nabilona-RAMEB**Liofilización del complejo de Nabilona-RAMEB*

Una solución al 30% de RAMEB se agitó con un exceso de Nabilona a 25°C como se describió previamente. Después de la filtración de la suspensión a través de una membrana de 0,22 μm , el producto filtrado se congeló utilizando hielo seco y metanol. La liofilización se realizó como se describió anteriormente y el contenido de Nabilona que formaba el complejo se determinó por medio de HPLC.

Formulación

Se prepararon comprimidos con pesos definidos comprimiendo directamente formulaciones que contenían 30 mg de RAMEB liofilizada o complejo de Nabilona-RAMEB, talco al 1% (p/p, basándose en la masa del comprimido) y diferentes cantidades de Ludiflash® (Tabla 1). Los componentes se mezclaron "lege artis" y los comprimidos se prensaron con un aparato Korsch EK0 (Instrumentation by Hottinger Baldwin Messtechnik-DCM plus, Software: BEAM). Se eligió 500 mg como el límite superior del peso del comprimido para seguir las directrices de la FDA para "Comprimidos que se disgregan por vía oral", que recomiendan que el peso de dichos comprimidos no exceda de 500 mg. Además, se prepararon algunos comprimidos de 260 mg reemplazando el 10% de Ludiflash® por Croscarmelosa sódica® o una mezcla de hidrogenocarbonato de sodio y anhídrido de ácido cítrico. Además, la fuerza de compresión se varió para producir comprimidos con diferentes características de dureza.

Tabla 1:

Composición				
Peso del comprimido (mg)	RAMEB liofilizada o Complejo de Nabilona-RAMEB (mg)	Ludiflash® (mg)	Talco (mg)	Otros excipientes (mg)
200	30	168	2	-
260	30	227,5	2,5	-
400	30	366	4	-
Composición				
Peso del comprimido (mg)	RAMEB liofilizada o Complejo de Nabilona-RAMEB (mg)	Ludiflash® (mg)	Talco (mg)	Otros excipientes (mg)
500	30	465	5	-
260	30	204,4	2,6	Croscarmelosa sódica® 23
260	30	204,4	2,6	Hidrogeno carbonato de Na y anhídrido de ácido cítrico (1:1) 23

15 *Características FDT**Dureza*

La dureza de los comprimidos se controló utilizando un aparato Pharma Test PTB 311 (Hainburg, Alemania).

20

Disgregación

La FDA describe los "Comprimidos que se Disgregan Oralmente" como preparaciones orales sólidas que se disgregan rápidamente en la cavidad oral, con un tiempo de disgregación in vitro de aproximadamente 30 segundos o menos, basándose en el método de prueba de disgregación de la USP convencional. Sin embargo, este método no siempre parece apropiado para probar FDT y no puede reflejar adecuadamente las condiciones in vivo. Por lo tanto, el método de disgregación de la USP se ha modificado de la siguiente manera. La disgregación se controló sumergiendo los comprimidos en 2 ml de agua destilada a 25°C o 37°C. Con el fin de simular las condiciones de la cavidad oral, las muestras se agitaron horizontalmente a 40 rpm utilizando un aparato de sacudimetro Inova 4000 (Nueva Jersey, USA). Se registró el tiempo necesario para la disgregación completa de los comprimidos.

30

Disolución

Para controlar la disolución de Nabilona de la formulación FDT, se pesó una cantidad de complejo de Nabilona-RAMEB correspondiente al contenido en una carga de comprimido. Tanto el complejo pesado como el FDT se solubilizaron en 1 ml de agua y se cuantificó el contenido de Nabilona en el sobrenadante utilizando HPLC. Resultados

35

Análisis por HPLC de Nabilona en acetonitrilo

40

Se analizó una serie de dilución de Nabilona pesada con precisión en acetonitrilo utilizando HPLC. La Figura 2 muestra la curva patrón resultante.

Comparación de diferentes complejos de Nabilona-ciclodextrina

Muchas ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina no son solubles en acetonitrilo, que por el contrario es el disolvente óptimo para Nabilona, evitando el análisis de los complejos de Nabilona-ciclodextrina con HPLC. Con el fin de comparar directamente diferentes ciclodextrinas con respecto a su capacidad para complejar la Nabilona, se ha decidido liofilizar los complejos de ciclodextrina-Nabilona y, después, extraer el fármaco del complejo utilizando acetonitrilo.

La Tabla 2 muestra la cantidad de Nabilona ($\mu\text{g/ml}$) que se solubilizó en 1 ml de 6 ciclodextrinas diferentes. Las concentraciones de las soluciones de ciclodextrina se adaptaron a su solubilidad en agua. Siempre que fue posible, se seleccionaron concentraciones de 15%, 20% y 30%. En general, la mayoría de las soluciones de ciclodextrina estudiadas, excepto la de γ -CD y SBE- β -CD, aumentaron la solubilidad de la Nabilona en comparación con el agua ($<0,5 \mu\text{g/ml}$). Mientras que la β -CD aumentó la solubilidad de Nabilona aproximadamente 4 veces ($2,3 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ al 1,5%), el uso de α -CD dio como resultado un aumento de 30 veces ($17,1 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ al 12%). Por el contrario, 1 ml de HP- β -CD al 30% solubilizó $44,5 \pm 0,8 \mu\text{g}$ de Nabilona (aumento de 90 veces). Es de destacar que se logró un notable aumento de la solubilidad acuosa de Nabilona utilizando RAMEB como agente formador de complejos. Las soluciones acuosas de RAMEB aumentaron de manera dependiente de la dosis la solubilidad de Nabilona hasta 9.000 veces según se determinó utilizando este protocolo, dando como resultado $4.460 \pm 180 \mu\text{g/ml}$ de Nabilona con RAMEB al 30%.

Basándose en estos experimentos, se seleccionó RAMEB como agente potenciador de la solubilidad para posteriores estudios.

Tabla 2. La cantidad de Nabilona solubilizada en 1 ml de diversas soluciones de ciclodextrina según se determina por extracción del fármaco de complejos liofilizados.

25

		Nabilona ($\mu\text{g/ml}$)
H₂O		0,5
RAMEB	15%	2620 \pm 70
	20%	3330 \pm 390
	30%	4460 \pm 180
HP-β-CD	15%	16,2 \pm 5,4
	20%	32,2 \pm 0,1
	30%	44,5 \pm 0,8
α-CD	8%	15,3 \pm 0,4
	10%	13,8 \pm 7,7
	12%	17,1 \pm 1,3
β-CD	1%	2,0 \pm 0,4
	1,25%	2,8 \pm 0,6
	1,50%	2,3 \pm 0,3
SBE-β-CD	30%	< 1
γ-CD	20%	< 1

Curva patrón del complejo de Nabilona-RAMEB

Además de la notable capacidad de formación de complejos de RAMEB con Nabilona, RAMEB también es beneficiosa en cuanto a su solubilidad en acetonitrilo, lo que permite el análisis por HPLC directo del complejo.

La Figura 3 muestra una serie de diluciones del complejo de Nabilona-RAMEB, analizadas utilizando HPLC. Se descubrió que las medidas superiores a 1 mg/ml de Nabilona exceden el intervalo de linealidad, lo que indica la necesidad de diluir muestras del complejo de Nabilona-RAMEB por debajo de 1 mg/ml.

Es de destacar que la similitud de los datos en la Figura 2 y la Figura 3 indica que los resultados de la HPLC del complejo de Nabilona-RAMEB de hecho resultan de la inclusión de Nabilona en la cavidad de RAMEB.

Isotermas de solubilidad del complejo de Nabilona-RAMEB

A diferencia de las otras ciclodextrinas estudiadas, RAMEB aumentó notablemente la solubilidad acuosa de Nabilona y permitió el análisis HPLC directo del complejo sin el rodeo de la liofilización y la extracción con disolvente.

5 La Figura 4 muestra el aumento en la solubilidad de Nabilona con concentraciones crecientes de RAMEB después de varios periodos de tiempo para la complejación a 25°C. A partir de la isoterma de solubilidad después de 96 h, se calculó una constante de solubilidad de $K = 270.000$. Basándose en la solubilidad de Nabilona en agua (0,5 µg/ml), la inclusión de Nabilona en RAMEB (30%, 92 h) dio como resultado un aumento de los valores de solubilidad > 10.000 veces (7,14 mg/ml).

10 La figura 5 presenta los datos como una función del tiempo de reacción. Después de 4 días de agitación, el procedimiento de inclusión parece terminado, ya que después no se observó un aumento de la solubilidad de la Nabilona.

15 La Figura 6 indica que no se produjo un aumento adicional de la solubilidad de Nabilona utilizando concentraciones de RAMEB superiores a 30%. En contraste, el uso de RAMEB al 40% o 50% causó una ligera disminución en la solubilidad de Nabilona.

20 La Figura 7 muestra la influencia de la temperatura de reacción sobre la formación del complejo entre RAMEB y Nabilona. Los resultados indican claramente que una temperatura de reacción de 25°C indujo el mayor aumento de la solubilidad de la Nabilona en las soluciones de RAMEB a todas las concentraciones probadas. Es de destacar que la formación del complejo de Nabilona-RAMEB disminuyó significativamente a temperaturas de reacción por encima de 25°C, es decir, 32°C o 40°C.

25 La Figura 8 muestra las isotermas de solubilidad del complejo de Nabilona-RAMEB a 5 temperaturas de reacción diferentes. Las isotermas de solubilidad se caracterizan por una ligera forma sigmoidea y un alto coeficiente de determinación ($R^2=0,940 - 0,997$).

Características de FDT

30 *Efecto de la cantidad de Ludiflash® sobre las características de FDT*

Los experimentos anteriores han demostrado que, para proporcionar una dosis única de 0,3 mg de Nabilona, se deben utilizar aproximadamente 30 mg del complejo de Nabilona-RAMEB para la preparación de 1 forma de dosificación de FDT. Se encontró que la adición de RAMEB a cualquier formulación de FDT da como resultado tiempos de disgregación significativamente mayores. Para la preparación de FDT, se utilizó Ludiflash® como un excipiente ya preparado que contiene manitol, aglutinante soluble y agente superdisgregante. Con el fin de optimizar la razón entre Ludiflash® y RAMEB utilizada para una formulación de FDT, se investigó el efecto de cantidades crecientes de Ludiflash® sobre la dureza y el tiempo de disgregación de los FDT que contienen 30 mg de RAMEB liofilizada. Para este propósito, los comprimidos se comprimieron con una fuerza de compresión de 1,2 kN. Como resultado, cantidades crecientes de Ludiflash® disminuyeron significativamente la dureza del comprimido y el tiempo de disgregación de los comprimidos. Aunque los comprimidos de 500 mg se disgregaron más rápido que los de 260 mg, los últimos se seleccionaron para desarrollos posteriores ya que los comprimidos con ≥ 400 mg parecían poco prácticos.

45 En este punto, parece necesario recordar que es poco probable que el tiempo de disgregación, controlado utilizando el método in vitro descrito, refleje el tiempo real de disgregación in vivo. En experimentos preliminares in vivo, se ha observado que el tiempo de disgregación de los FDT de 260 mg que contienen 30 mg de RAMEB disminuye significativamente en comparación con el método in vitro.

50 *Selección de la fuerza de compresión adecuada para comprimidos de 260 mg*

Se prepararon comprimidos de 260 mg que contenían 30 mg de RAMEB liofilizada, 2,6 mg de talco y 227,5 mg de Ludiflash® utilizando diferentes fuerzas de compresión. Aunque los comprimidos que se habían comprimido con 0,5 kN mostraron tiempos de disgregación de 60 s, se supone que su dureza (<15 N) podría no ser adecuada para los procedimientos de envasado y la administración. En conjunto, una fuerza de compresión de 1,2 kN parece factible para la producción de FDT que contienen el complejo de Nabilona-RAMEB.

60 *Impacto de los super-disgregantes sobre las características de FDT*

Con el fin de mejorar aún más el tiempo de disgregación de los comprimidos de 260 mg, se investigó la influencia de super-disgregantes adicionales y agentes efervescentes. Se reemplazó Ludiflash® al 10% por Croscarmelosa sódica® o una mezcla de hidrogenocarbonato de Na y anhídrido de ácido cítrico. Los comprimidos se comprimieron utilizando una fuerza de compresión de 1,2 kN.

Disolución de Nabilona a partir de FDT

- 5 Como se indica en la Tabla 4, no se observó ninguna diferencia entre la disolución de Nabilona del complejo y el FDT, lo que sugiere que los excipientes de FDT utilizados no interfieren en la disolución de la Nabilona.
 Tabla 4. Disolución de Nabilona a partir del complejo de Nabilona-RAMEB y de una formulación de FDT que contiene Ludiflash® y el complejo.

Disolución de Nabilone a partir de	Prueba 1 (mg/ml)	Prueba 2 (mg/ml)
el complejo	0,166	0,220
la formulación de FDT	0,176	0,216

10 **Conclusión**

- En conclusión, el enfoque de mejorar la solubilidad en agua de la Nabilona formando complejos de inclusión con ciclodextrinas parece prometedor. En este caso, el uso de RAMEB es preferible al uso de otras ciclodextrinas tales como α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD o SBE- β -CD. Las condiciones de complejación optimizadas incluyen (1) el uso de RAMEB al 25% o 30%, (2) agitación con Nabilona durante 96 h, y (3) mantenimiento de una temperatura de reacción constante de 25°C. De ese modo, la solubilidad de la Nabilona en solución acuosa se puede aumentar >10.000 veces, en comparación con la solubilidad extremadamente baja de Nabilona en agua (0,5 μ g/ml). Además, el complejo de Nabilona-RAMEB se puede procesar fácilmente a FDT. Para proporcionar una dosis única de 0,3 mg de Nabilona, se puede esperar utilizar aproximadamente 30 mg del complejo de Nabilona-RAMEB para la preparación de 1 forma de dosificación de FDT. Dado que la adición de RAMEB al FDT interfiere en la velocidad de disgregación, la composición de la formulación se optimizó, así como la fuerza de compresión para la formación de los comprimidos. Una formulación factible incluye (1) 30 mg del complejo de Nabilona-RAMEB, (2) talco al 1%, (3) 23 mg de una mezcla de hidrogenocarbonato de Na y anhídrido de ácido cítrico y (4) Ludiflash® hasta 100%, comprimido con 1,2 kN a FDT de 260 mg. Se demostró que estas condiciones de fabricación proporcionan una disgregación rápida del FDT y la disolución completa del complejo en fluidos corporales acuosos. Se espera que el uso del complejo de Nabilona-RAMEB en formas de dosificación FDT afecte favorablemente a la estabilidad y la biodisponibilidad de la Nabilona.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende Nabilona y β -ciclodextrina metilada de manera aleatoria (RAMEB) a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110 y en donde la Nabilona y la RAMEB se incluyen como un complejo soluble acuoso.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la Nabilona está presente en una cantidad de 0,01 a 100 mg, preferiblemente de 0,1 a 50 mg, más preferiblemente de 0,25 a 10 mg, más preferido en una cantidad de 30 mg.
- 15 3. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha composición comprende adicionalmente Nabilona no complejada.
- 20 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un aditivo, en donde el aditivo es un agente disgregante, seleccionado específicamente entre celulosa microcristalina, almidones, sal de sodio de glicolato de almidón, croscarmelosa sódica, crospovidona, povidona, silicato de calcio.
- 25 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo de estearato de magnesio, fumarato de magnesio, hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico, talco, sorbitol, manitol, carboximetilcelulosa, lactosa, hidroxipropilmetilcelulosa, colidona, carbopol.
- 30 6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la solución comprende RAMEB a una concentración de 25% a 30% en peso.
- 35 7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la Nabilona y la RAMEB están comprendidas en forma de un complejo liofilizado.
- 40 8. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un complejo de Nabilona y RAMEB, hidrogenocarbonato de sodio, anhídrido de ácido cítrico y crospovidona, en donde la Nabilona y la RAMEB están presentes a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110.
- 45 9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como medicamento.
- 50 10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso oral, preferiblemente sublingual o bucal.
- 55 11. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso su en el tratamiento de náuseas, espasmos musculares, esclerosis múltiple, cólicos uterinos e intestinales, trastornos del movimiento, dolor, incluyendo migraña, glaucoma, asma, inflamación, insomnio, tensión arterial alta y/o una afección que responde a un agente estimulante del apetito, esclerosis lateral amiotrófica, agente anticancerígeno, oxitóxico, ansiolítico, anticonvulsivo, antidepresivo y antipsicótico.
- 60 12. Un método para producir un complejo de RAMEB y Nabilona, en donde la Nabilona y la RAMEB están presentes a una razón en peso (peso seco con respecto a peso seco) de 1:60 - 1:140, preferiblemente a una razón en peso de 1:90 - 1:110 y en donde dicha RAMEB se combina con Nabilona en un estado heterogéneo o en estado sólido, incluyendo el uso de métodos seleccionados entre liofilización, secado por pulverización, amasado, molienda, método de suspensión, coprecipitación y neutralización, y opcionalmente separación del complejo obtenido.
13. Un método para producir Nabilona soluble acuosa de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende la etapa de complejar la Nabilona con RAMEB.
14. Un método para aumentar la biodisponibilidad de Nabilona en una preparación administrada por vía sublingual o bucal que comprende la etapa de complejar la Nabilona con RAMEB de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, y formular el complejo obtenido como una forma de dosificación administrable por vía sublingual o bucal.
15. Un método para aumentar la solubilidad de la Nabilona en solución acuosa complejando la Nabilona y la RAMEB de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la Nabilona se agita durante aproximadamente 96 h en presencia de RAMEB al 25% o 30% en peso y manteniendo una temperatura de reacción constante de aproximadamente 25°C.
16. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende entre 10 y 15% en peso, preferiblemente aproximadamente 11,5% en peso de complejo de Nabilona-RAMEB, entre 60 y 95% en

peso, preferiblemente aproximadamente 87,5% en peso de agente disgregante y entre 0,5 y 5% en peso, preferiblemente aproximadamente 1% en peso de vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

Fig. 1

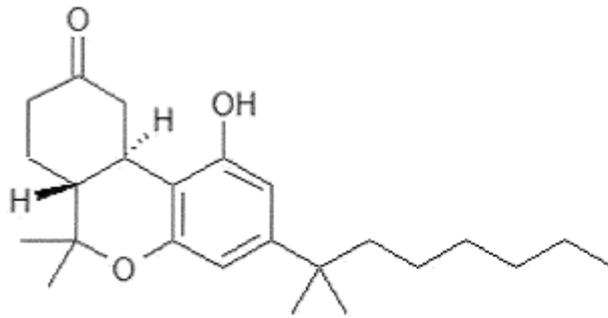


Fig. 2

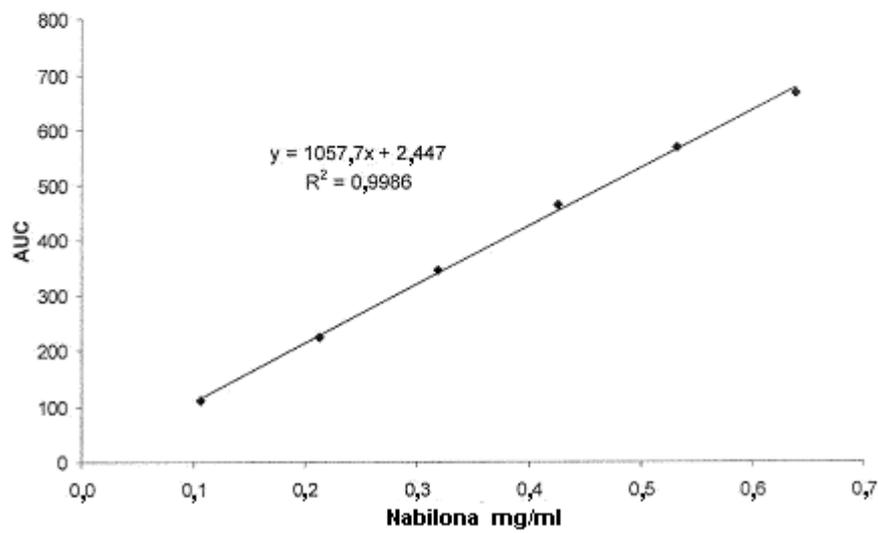


Fig. 3

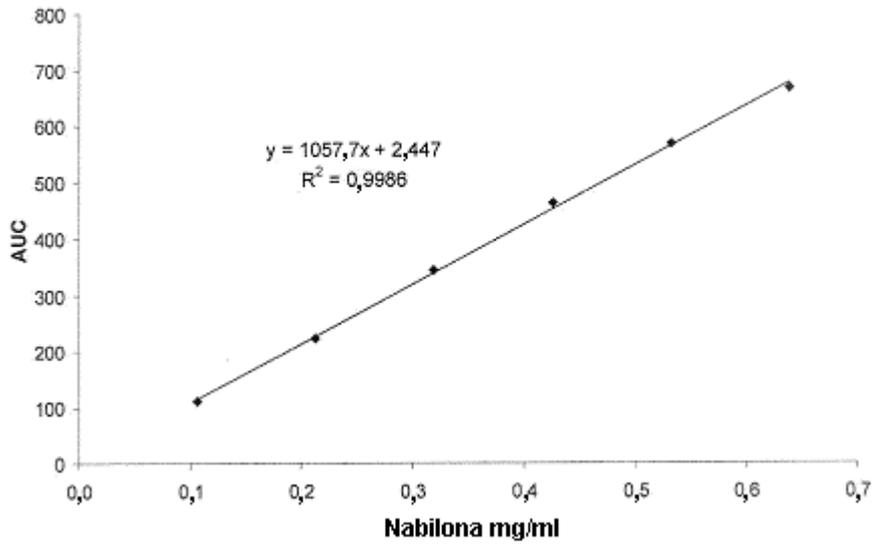


Fig. 4

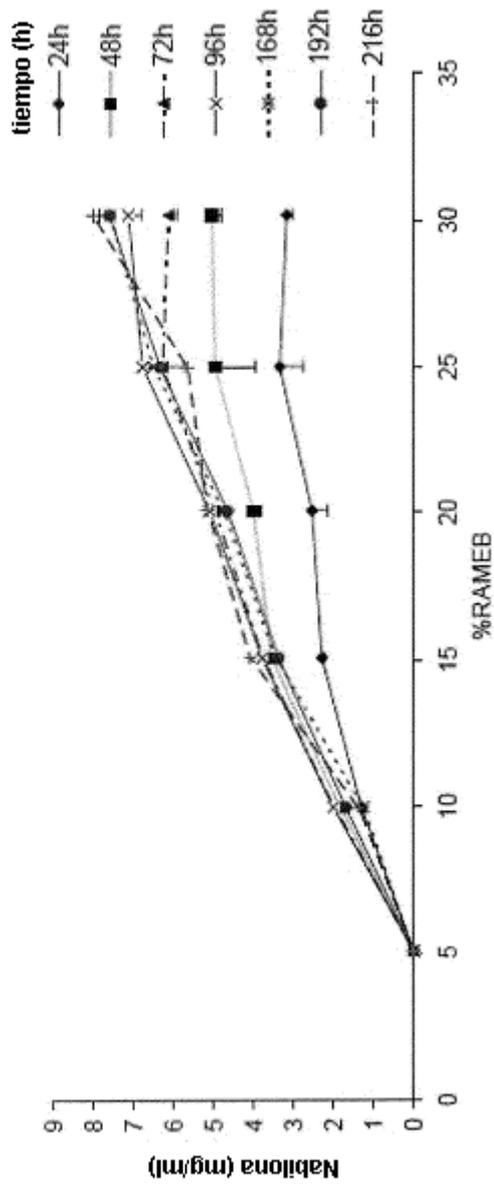


Fig. 5

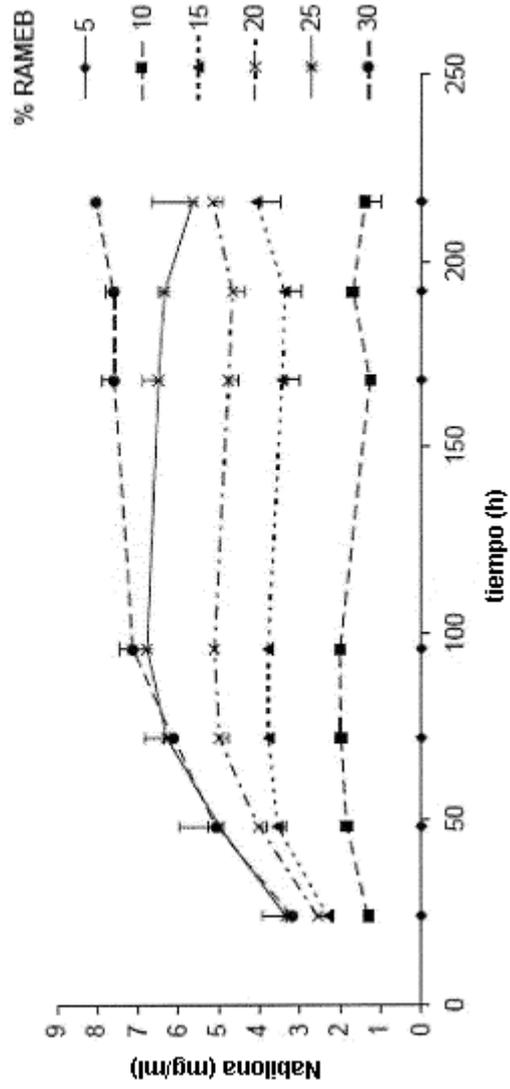


Fig. 6

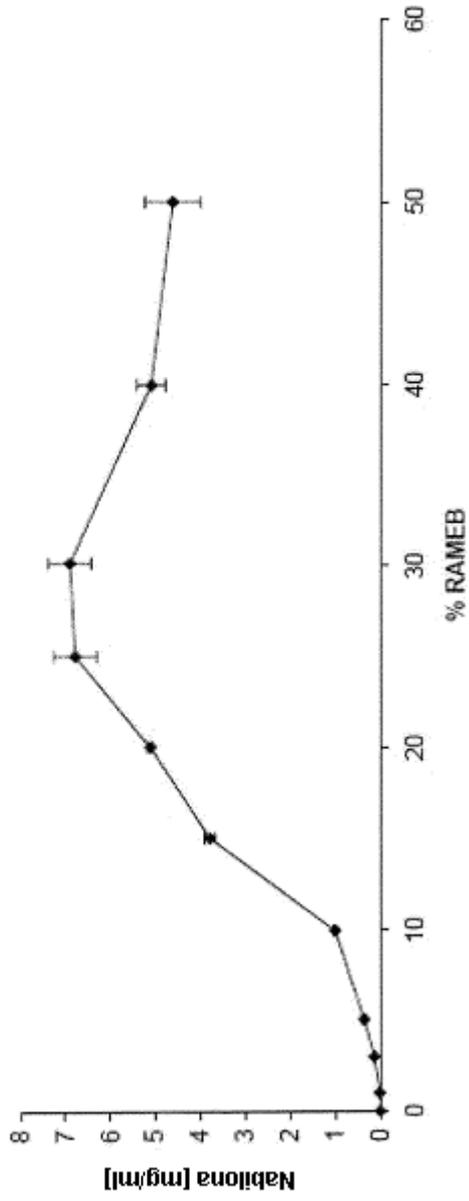


Fig. 7

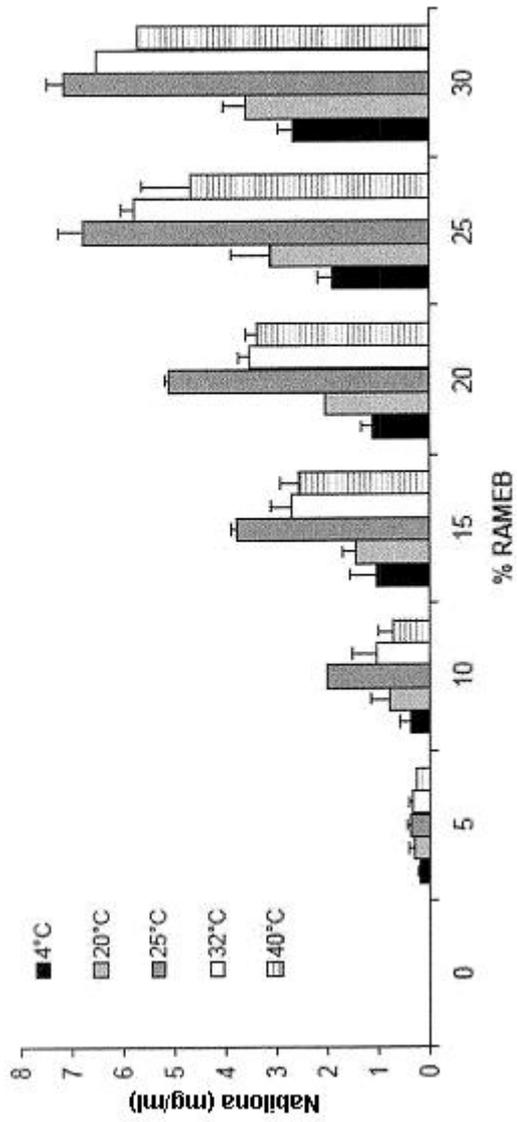


Fig. 8

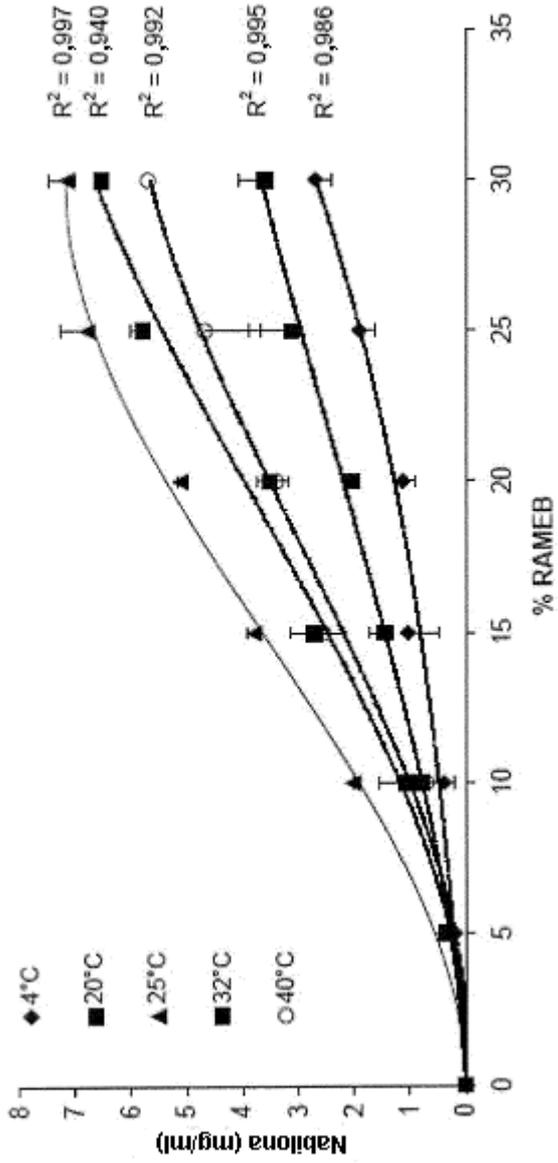


Fig. 9

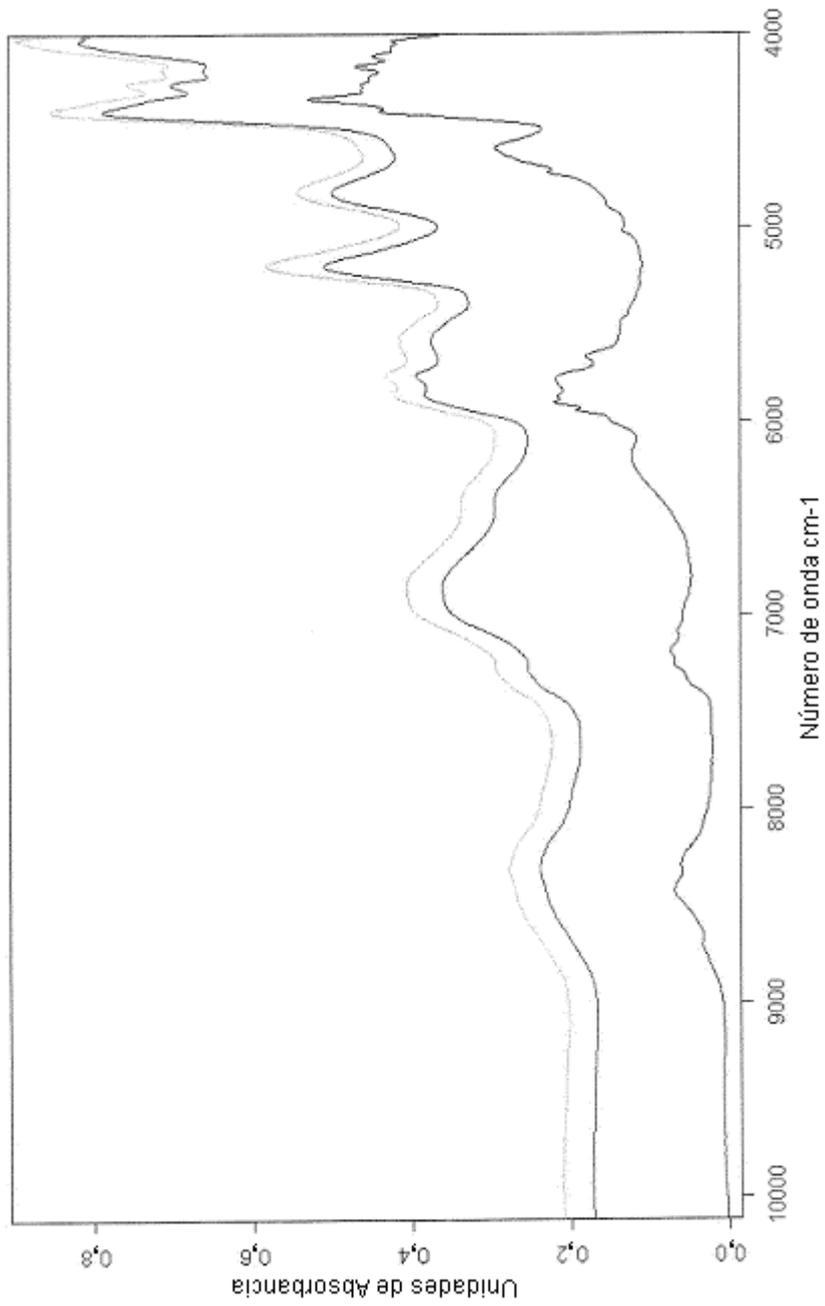


Fig. 10

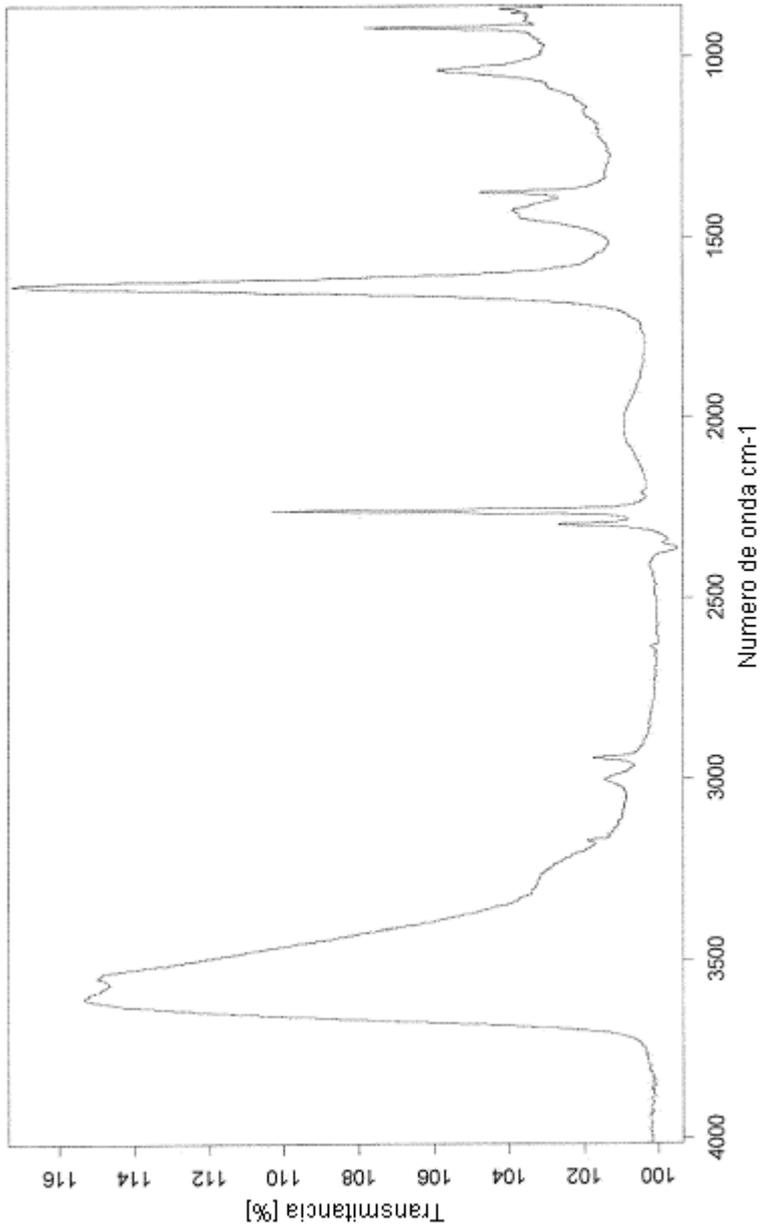


Fig. 11

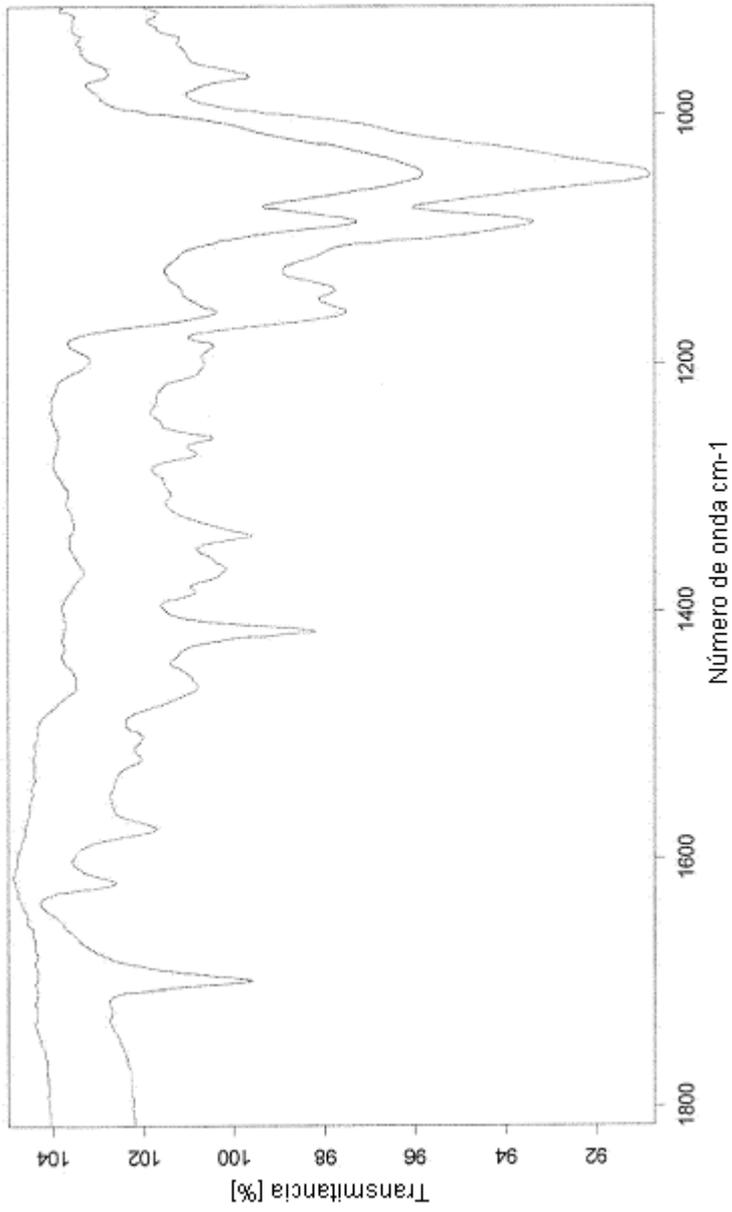


Fig. 12

