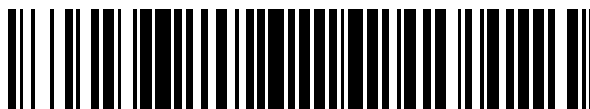


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 483**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/14** (2006.01)

**A61K 9/70** (2006.01)

**C08L 67/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012** **E 16178875 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018** **EP 3108881**

54 Título: **Membrana no tejida como sistema de liberación de fármacos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
(50.0%)  
C/ Jordi Girona 31  
08034 Barcelona, ES y  
HOSPITAL SANT JOAN DE DEU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TORNERO GARCIA, JOSE ANTONIO;  
MONTERO CARCABOSO, ANGEL y  
BERTRAN LLAVINA, JOAN**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 690 483 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

Membrana no tejida como sistema de liberación de fármacos

## 5 Campo de la invención

La invención se relaciona con el campo de los sistemas de liberación de fármacos (*drug delivery systems*, DDS). En particular, la invención se relaciona con una membrana no tejida para la liberación controlada y sostenida de un agente activo en el área del organismo para tratar. Esta membrana no tejida comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de un agente activo puro que están enmarañadas (*entangled*) entre las nanofibras, teniendo el agente activo una hidrosolubilidad limitada.

Antecedentes de la invención

15 Los sistemas de liberación de fármacos para agentes terapéuticos para el cáncer han sido usados actualmente por millones de pacientes y han resultado en la creación de nuevas terapias y en la mejora de las existentes. Los fármacos para el cáncer pueden causar una enorme toxicidad a las concentraciones sistémicas necesarias para conseguir actividad antitumoral; por lo tanto, su liberación local crea la posibilidad de mejorar tanto su seguridad como su eficacia.

20 Por consiguiente, los dispositivos poliméricos implantados localmente han ido ganando interés clínico durante las últimas décadas. Un ejemplo lo proporcionan las obleas cargadas de carmustina para el tratamiento de gliomas. Dicha formulación consiste en discos sólidos del fármaco carmustina (BCNU) cargado en el polímero del ácido poli-[bis(p-carboxifenoxi)propansebácico polianhídrido]. Las obleas cargadas con BCNU están aprobadas para el tratamiento de tumores cerebrales (gliomas) después de la cirugía (Attenello et al., Use of Gliadel (BCNU) Wafer in the Surgical Treatment of Malignant Glioma: A 10-Year Institutional Experience. Ann. Surg. Oncol., 2008 15(10):2887-93).

30 Las nanofibras poliméricas se han propuesto como plataformas maleables para la ingeniería de tejidos y como vehículos para liberar agentes terapéuticos localmente en sitios específicos de aplicación. Dichos sistemas a base de nanofibras combinan varios aspectos importantes, tales como gran área superficial y alta porosidad, las cuales facilitan la permeabilidad al agua y la difusión de los agentes activos incorporados dentro de las nanofibras. Se ha demostrado que han tenido éxito tres técnicas en la creación de forma rutinaria estructuras de nanofibras: (i) autoensamblaje, (ii) separación de fase y (iii) electrohilado.

35 El autoensamblaje, usado de por sí para sintetizar nanofibras a partir de péptidos anfífilos, es atractivo debido a las mínimas condiciones de procesado de su fabricación y el pequeño tamaño obtenible. La solicitud de patente WO 2008/067145 proporciona un método para la formación de nanofibra a partir de péptidos autoensamblantes. Sin embargo, esta técnica sólo es asequible para un repertorio limitado de polímeros y dificulta el proceso dentro de una estructura macroscópica. También es difícil encontrar una cinética de liberación sostenida a partir de estas pequeñas fibras.

45 La técnica de separación de fase necesita la gelificación del polímero y la extracción de disolvente y tiene el inconveniente de una pérdida de control sobre la disposición de la fibra. La etapa necesaria de extracción del disolvente también drenaría prematuramente cualquier fármaco atrapado en las fibras. Además, sólo unos cuantos polímeros son apropiados para este método y es estrictamente una técnica escala de laboratorio ((Liu et al., The nanofibrous architecture of poly(L-lactic acid)-based functional copolymers, Biomaterials 31 (2010) 259-269).

50 La técnica de electrohilado mejora los métodos mencionados anteriormente para obtener nanofibras porque facilita la graduación de la técnica y evita la etapa de extracción de disolvente. Las nanofibras electrohiladas para aplicaciones biomédicas han atraído una gran atención en los últimos varios años. Por ejemplo, las nanofibras electrohiladas se han usado en ingeniería de tejidos, enzimas y catalizadores inmovilizados, vendaje de heridas y vasos sanguíneos artificiales. También se han usado como barreras a la prevención de adherencias inducidas posquirúrgicamente y como vehículos para sistemas de liberación controlada de fármacos.

55 Se ha publicado que las fibras electrohiladas tanto monoaxiales como coaxiales incorporan y liberan antibióticos, fármacos y proteínas de una manera sostenida. Los fármacos y agentes bioactivos se encapsulan, incluyen o incorporan dentro de la fase de la masa de las fibras, de modo que su cinética de liberación depende de su difusión hacia afuera de la fibra y a la degradación/erosión de la fibra. Por ejemplo, en Xie et al., (Xie et al., Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma *in vitro*, Pharm. Res. 23 (2006), 1817-1826) se electrohiló directamente una solución de polímero biodegradable que contenía fármacos anticancerosos hidrófobos tales como paclitaxel para producir una red nanofibrosa liberadora de fármacos. Asimismo, Xu et al. (Xu et al., BCNU-loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their *in vitro* antitumor activity against Glioma C6 cells, Journal of Controlled Release 114 (2006) 307-316) desarrollaron fibras de polímero cargado con BCNU bioimplantables para la liberación controlada de BCNU. Este agente antineoplásico se incorporó bien y se dispersó uniformemente en fibras de copolímero de poli(etilenglicol)-poli(ácido láctico) usando el método de electrohilado. En la solicitud de patente WO

2009/064767 se forma una nanofibra antimicrobiana a partir de una mezcla electroprocesada de acetato de celulosa como material polimérico, clorhexidina (CHX) como agente antimicrobiano y un titanato orgánico como reticulante de forma que la CHX se unió de forma covalente a la nanofibra. La solicitud de patente WO 2009/133059 describe matrices de nanofibra formadas electrohilando una solución de un poliéster hiper ramificado y monohidrato de creatinina para la liberación controlada de creatinina.

Sin embargo, muchos agentes bioactivos interesantes son de naturaleza proteica o de ácido nucleico que no se disuelve en disolvente orgánico y pueden sufrir pérdida de bioactividad al dispersarlos en la solución polimérica. El electrohilado coaxial, en el cual el fármaco se disuelve en una solución del núcleo acuosa y el polímero en una solución de la cubierta orgánica, es una estrategia para superar este inconveniente extruyendo las soluciones del núcleo y la cubierta de forma individual a través de dos boquillas concéntricas. En la solicitud de patente WO 2008/013713 se describen nanofibras electrohiladas coaxiales que tienen un núcleo y una cubierta polimérica que rodea al núcleo, en las cuales se encapsula dentro del núcleo un factor de crecimiento o un adenovirus.

En algunos casos, las superficies de nanofibras electrohiladas pueden funcionalizarse químicamente para conseguir liberación sostenida a través de la adsorción física de diversas moléculas bioactivas tales como proteínas, enzimas, factores de crecimiento o fármacos. Por ejemplo, se inmovilizaron proteínas terapéuticas y ácido nucleico para su liberación controlada (Patel et al., *Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance*, *Nano Lett.* 7 (2007) 2122-8), y se inmovilizaron físicamente agentes antibacterianos para su liberación inmediata desde la superficie de la nanofibra (Bolgen et al., *In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions*, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 81B (2007) 530-543).

Recientemente, Cai et al. (Cai et al., *International Journal of Pharmaceutics* 419 (2011) 240-246) han propuesto la liberación sostenida de 5-fluorouracilo (5-FU) incorporándolo dentro de fibras submicrónicas de carboximetilcelulosa sódica preparadas mediante deshidratación por pulverización como una alternativa a las nanofibras electrohiladas. La liberación del fármaco desde esta matriz hinchable se basa principalmente en la difusión hacia afuera de las fibras.

Como la liberación desde fibras de polímero cargadas con agente activo es altamente dependiente de la composición de las fibras, la proporción de agente activo con respecto al polímero, la carga simultánea de otras sustancias y el espesor de las fibras, se han desarrollado estrategias más nuevas que cargan el agente activo en microesferas de polímero que controlan su liberación desde la red de fibra. La patente WO 2010/096254 desarrolló formulaciones en las cuales se cargan seroalbúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) o sulfato de condroitina en microesferas de poliestireno (PS o PLGA) y después se cargan en nanofibras fabricadas con policaprolactona (PCL) electrohilada y poli(óxido de etileno) (POE). Las microesferas de PS pueden residir dentro de una fibra o estar adyacentes a una fibra de primer tipo, una fibra de segundo tipo o ambas. La cinética de liberación de la BSA depende de su difusión hacia afuera de la fibra correspondiente, la degradación de esta fibra, así como la degradación de la cubierta polimérica de la microesfera.

Recientemente, Wang et al. (Wang et al., *Fabrication and Characterization of Prosurvival Growth Factor Releasing, Anisotropic Scaffolds for Enhanced Mesenchymal Stem Cell Survival/Growth and Orientation*, *Biomacromolecules* 2009, 10, 2609-2618) han desarrollado armazones de nanofibras para ingeniería tisular que liberan un factor de crecimiento de insulina (IGF-1) para inducir crecimiento y supervivencia celular. Dichos armazones se forman electrohilando nanofibras de poliuretano y microesferas cargadas con IGF-1 ensambladas dentro del armazón. La encapsulación de factores de crecimiento los protege de la proteólisis y permite su liberación sostenida; las cinéticas de liberación son dependientes de la concentración de polímero, el peso molecular y el factor de crecimiento que se carga en las microesferas.

Sin embargo, el proceso de manufactura de nanofibras cargadas con microesferas de polímero que contienen agentes activos es difícil debido a los complejos procesos técnicos necesarios para la producción, aislamiento esterilización y carga de las microesferas dentro de la red de nanofibras. Además, la eficacia de encapsulación del agente activo dentro de las microesferas suele ser subóptima. La estabilidad del principio activo también puede verse afectada por los disolventes usados durante el proceso de microencapsulación. De modo que sigue habiendo una necesidad en el estado de la técnica de proporcionar sistemas alternativos de liberación local de fármacos para la liberación controlada y sostenida de agentes terapéuticos.

El documento US2005/158362 A1 describe un sistema de liberación de compuestos bioactivos que comprende un compuesto bioactivo incorporado entre una matriz de fibra polimérica no tejida o un ensamblaje lineal. La matriz de fibra polimérica está compuesta de fibras electrohiladas que comprenden, p. ej., ácido poliláctico. El agente bioactivo puede ser un medicamento contra el cáncer. El compuesto bioactivo puede estar dentro de la fibra y también estar disperso entre las fibras. La matriz o ensamblaje lineal de compuesto bioactivo que contiene las fibras se puede intercalar entre capas de polímero que no contienen ningún compuesto activo para disminuir cualquier efecto de liberación inicial rápida (*burst release*) y/o para obtener una liberación retardada.

Los presentes inventores han descubierto que cuando se formulan principios activos como micropartículas del principio activo puro y se enredan dentro de una membrana no tejida de nanofibras electrohiladas biocompatibles, pueden liberarse localmente de forma sostenida. Esto es, las micropartículas preparadas se retienen físicamente en la membrana entre las nanofibras y no pueden liberarse al medio externo más que en su forma solubilizada. Dicha estrategia es especialmente apropiada para principios activos de solubilidad en agua limitada. La liberación se produce cuando los líquidos fisiológicos llenan la membrana y solubilizan las micropartículas una vez situadas en el área del organismo que se va a tratar. Aun cuando las partículas del agente activo no estén protegidas por una cubierta polimérica al igual que la microesfera cargada con fármaco del estado de la técnica, pueden liberarse de una manera sostenida, eficaz y orientada.

#### Objeto de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas (*entangled*) entre las nanofibras, **caracterizada por que** las micropartículas están retenidas físicamente en la membrana de tal manera que sólo son capaces de ser liberadas en su forma solubilizada de manera sostenida, y en las que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml.

Otro objeto de la invención es proporcionar un producto a medida (*taylor-made suit*) que comprende la membrana no tejida.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para obtener la membrana no tejida.

#### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema del proceso de electrohilado para obtener la membrana no tejida de la invención.

La figura 2 muestra una imagen de microscopía óptica de la suspensión de microcristales de SN-38 para usar para obtener la membrana no tejida de la invención.

La figura 3 muestra una microfotografía electrónica de barrido de la membrana no tejida de la invención que tiene nanofibras de PLA electrohilado regulares antes de cargarla con microcristales de SN-38.

La figura 4 muestra una microfotografía electrónica de barrido de un corte transversal de una membrana no tejida de la invención que comprende nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA (x1180).

La figura 5 muestra una microfotografía electrónica de barrido de un corte transversal de una membrana no tejida de la invención que comprende nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA (x4700).

La figura 6 muestra el perfil de liberación *in vitro* de membranas no tejidas de 5 mm de diámetro de la invención que comprenden nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA.

La figura 7 muestra la liberación acumulada de SN-38 desde membranas no tejidas de 5 mm de diámetro de la invención que comprenden nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA.

La figura 8 muestra la actividad *in vitro* de una solución de SN-38 soluble (no cargada en la membrana no tejida de la invención) en varias líneas celulares de neuroblastoma, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con pocillos de control sin tratar.

La figura 9 muestra la actividad *in vitro* de los microcristales de SN-38 cargados en la membrana no tejida de la invención en varias líneas celulares de neuroblastoma, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células de control sin tratar.

La figura 10 muestra la actividad de las membranas no tejidas preliberadas y membranas no tejidas intactas (de control) de acuerdo con la invención, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células sin tratar.

La figura 11 muestra la actividad de membranas no tejidas coincubadas (cargadas y vacías) y membranas no tejidas de control (cargadas y vacías, no coincubadas) de acuerdo con la invención, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células sin tratar.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, caracterizada por que las micropartículas están retenidas físicamente en la membrana de tal manera que sólo son capaces de ser liberadas en su forma solubilizada de manera sostenida, y en las que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml (de ahora en adelante "la membrana no tejida de la invención").

En el contexto de la invención, la expresión "membrana no tejida" se relaciona con una o más nanofibras electrohiladas poliméricas depositadas arbitrariamente sobre una superficie sólida (colector) y enmarañadas opcionalmente mediante uno o más de los siguientes métodos: métodos físicos tales como adhesión con pegamento biocompatible, fusión o disolución del exceso y métodos mecánicos tales como punción con aguja, hidroenmarañado o y enmarañado neumático.

Tal como conoce el experto, el electrohilado es una técnica altamente versátil que combina el uso de dos técnicas, a saber, electropulverización e hilado. En el proceso de electrohilado, una solución de polímero sujeta mediante su tensión superficial al extremo de un tubo capilar se somete a un campo eléctrico y se induce una carga eléctrica sobre la superficie del líquido debida a este campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan a las fuerzas de tensión superficial. En última instancia, se expulsa desde la punta del cono de Taylor un chorro cargado de la solución y se produce un latigazo rápido e inestable del chorro en el espacio entre la punta del capilar y el colector que conduce a la evaporación del disolvente, dejando un polímero detrás y conduciendo a una maraña de nanofibras depositadas sobre un colector. El proceso de electrohilado está controlado por una serie de parámetros, clasificados habitualmente como: parámetros de la solución, parámetros del proceso y parámetros ambientales. Los parámetros de la solución incluyen viscosidad, conductividad, masa molecular y tensión superficial. Los parámetros del proceso incluyen el campo eléctrico aplicado, distancia entre el tubo capilar y el colector y velocidad de flujo de la solución. Cada uno de estos parámetros tiene una influencia significativa sobre la morfología de las fibras obtenidas mediante el proceso de electrohilado y a través de manipulaciones correctas de estos parámetros sería posible producir nanofibras con morfología y diámetros deseables. Además, los parámetros ambientales incluyen humedad relativa y temperatura ambiente, las cuales tienen también un papel importante en la morfología y diámetros de las fibras electrohiladas.

En el contexto de la invención, la expresión "al menos un agente activo" significa que las micropartículas pueden ser micropartículas de uno o más agentes activos.

Asimismo, en el contexto de la invención, la expresión "micropartículas de al menos un agente activo en forma pura" se refiere al hecho de que el agente activo no tiene impurezas o son mínimas y al hecho de que las micropartículas no tienen otro componente más que el agente activo, que no tiene impurezas o son mínimas. Por lo tanto, en el contexto de la invención, el núcleo de micropartículas no contiene ningún compuesto polimérico.

En el contexto de la presente invención, la expresión "agente activo" se refiere, por ejemplo, a un agente terapéutico tal como un agente quimioterápico, un antibiótico, un antifúngico o un nutracéutico, o se refiere a una proteína activa tal como un factor de crecimiento. En cualquier caso, debe tener una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml.

En el contexto de la invención, la expresión "enmarañadas entre las nanofibras" se relaciona con el hecho de que las micropartículas están atrapadas, esto es, retenidas físicamente de tal manera que no pueden liberarse más que en su forma solubilizada.

En el contexto de la presente invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, esto es, el agente activo es prácticamente insoluble, muy poco soluble, poco soluble o bastante soluble en agua de acuerdo con los patrones de la técnica. Estos patrones pueden ser, por ejemplo, los de Sigma Aldrich, que son los siguientes:

| Descripción             | Volumen aproximado (ml) de disolvente necesario para disolver 1 g de soluto | Solubilidad en mg/ml |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Muy soluble             | Menor que 1                                                                 | Mayor que 1000,      |
| Fácilmente soluble      | De 1 a 10.                                                                  | 100-1000             |
| Soluble                 | de 10 a 30                                                                  | 33-10                |
| Bastante soluble        | de 30 a 100                                                                 | 10-33                |
| Poco soluble            | de 100 a 1000                                                               | 1-10                 |
| Muy poco soluble        | de 1000 a 10.000                                                            | 0,1-1                |
| Prácticamente insoluble | Mayor que 10.000,                                                           | Menor que 0,1        |

En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 0,001-33 mg/ml.

- 5 En una realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 10-33 mg/ml. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 1-10 mg/ml. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 0,1-1 mg/ml. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 0,1 mg/ml. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 0,1-0,01 mg/ml. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo tiene una solubilidad en agua de 0,01-0,001 mg/ml.

- 15 En una realización particular, la membrana no tejida consiste en nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml.

- 20 En otra realización particular de la membrana no tejida de la invención, comprende al menos una primera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles, una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre las nanofibras; y una tercera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

- 25 En una realización preferida de membrana no tejida de la invención, comprende una primera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles, una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre las nanofibras; y una tercera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

- 30 En una realización lo más preferida, la membrana no tejida de la invención consiste en una primera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles, una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre las nanofibras; y una tercera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

- 35 Las al menos primera capa, segunda capa y tercera capa de la membrana no tejida de la invención pueden tener diámetros de nanofibra equivalentes o diferentes, espesores equivalentes o diferentes y/o pueden comprender nanofibras fabricadas con polímeros biocompatibles equivalentes o diferentes. Asimismo, cuando la membrana no tejida comprende más de una segunda capa, las posibles segundas capas pueden comprender micropartículas de agentes activos diferentes.

- 40 Por lo tanto, en una realización particular de la membrana no tejida de la invención, comprende una primera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles, una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un primer agente activo enmarañadas entre las nanofibras; una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un segundo agente activo enmarañadas entre las nanofibras; y una tercera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

- 45 Opcionalmente, la membrana no tejida de la invención, tal como se ha definido previamente, puede recubrirse por un lado a fin de conseguir una liberación unidireccional hacia una cara de la membrana. En una realización particular, la membrana no tejida de la invención se recubre por un lado. El recubrimiento de un lado de la membrana se realizará mediante uno de los siguientes métodos: adhesión con pegamento biocompatible, contacto con disolvente del polímero (por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo, acetato de etilo, acetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), perforación mecánica, o parámetros de electrohilado que favorecen la adhesión de la fibra.

- 50 En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, las micropartículas de al menos un agente activo en forma pura son microcristales.

- 55 Los microcristales de agente activo pueden realizarse construyendo partículas a partir del estado molecular, como en la precipitación, o rompiendo partículas mayores, como en la trituración. En la presente invención los microcristales se preparan preferentemente mediante el método de precipitación, bien mediante incompatibilidad con el disolvente, o bien mediante cristalización dependiente del pH. Sin embargo, hay otras técnicas que pueden usarse para obtener las micropartículas de acuerdo con la invención. Por ejemplo, pueden obtenerse micropartículas de proteína activa mediante liofilización. Esta última estrategia puede ser útil para obtener micropartículas de factor de crecimiento que tienen una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml. En cualquier caso, las micropartículas o formas sólidas de tamaño micrónico de la invención pueden estar en estado cristalino, en estado amorfo o en una combinación de los mismos, dependiendo de la velocidad de crecimiento de ellas, la cual depende a su vez de las condiciones de temperatura y supersaturación. Estas micropartículas se emplean después en forma de una suspensión para preparar la membrana

no tejida de la invención, tal como se indica a continuación.

Las suspensiones de micropartículas para ser usadas en la preparación de la membrana no tejida de la invención tienen una distribución del tamaño de partícula, oscilando el tamaño de partícula medio de 0,1 µm a 20 µm. Por lo tanto, en una realización particular de la membrana no tejida de la invención, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20 µm. En una realización preferida de la membrana no tejida de la invención, las micropartículas tienen un diámetro medio de 3-10 µm. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, las micropartículas tienen un diámetro medio de 0,5-5 µm.

- 10 Tal como se ha definido previamente, el agente activo para incluir en la membrana no tejida de la invención puede ser un agente terapéutico o una proteína activa que tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml. Más particularmente, el agente activo puede ser un agente terapéutico tal como, por ejemplo, un agente quimioterápico, un nutracéutico, un antibiótico o un antifúngico. Como alternativa, el agente activo puede ser una proteína activa tal como, por ejemplo, un factor de crecimiento. Como agentes quimioterápicos pueden citarse los siguientes:
- 15 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38), paclitaxel, cisplatino, carboplatino, etopósido, carmustina, melfalán, camptotecina, 5-fluorouracilo, metotrexato, erlotinib, gefitinib, sunitinib, vandetanib, dasatinib, lapatinib, nutlina, gemcitabina, docetaxel, bortezomib, ácido valproico, vismodegib, cinacalcet, trabectedina, topotecán, MLN4924, olaparib, iniparib, trióxido de arsénico, crizotinib, celecoxib, perifosina, rapamicina, temsirolimus y everolimus. Como nutracéuticos pueden citarse los siguientes: curcumina, resveratrol, genisteína y quercetina. Asimismo, como
- 20 antibióticos o antifúngicos pueden citarse los siguientes: cloranfenicol, penicilina G, procaína, ácido fusídico, mebendazol y albendazol. Como factores de crecimiento pueden citarse los siguientes: PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, IGF-I, bFGF y HGF.

- En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, el agente activo es un agente terapéutico seleccionado de un agente quimioterápico y un nutracéutico. En una realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo es un agente quimioterápico, preferentemente SN-38, paclitaxel, vandetanib, nutlina o bortezomib. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo es un nutracéutico, preferentemente quercetina, resveratrol, curcumina o genisteína. En otra realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el agente activo es un factor de crecimiento, preferentemente PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, IGF-I,
- 30 bFGF o HGF.

En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende dos agentes activos.

- En la membrana no tejida de la invención, las nanofibras electrohiladas biocompatibles pueden fabricarse de cualquier polímero biocompatible y biodegradable adecuado de la técnica. Éste puede ser un poliéster, un polianhídrido, un polifosfaceno, un poliéter, etc.
- 35

- En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, las nanofibras electrohiladas biocompatibles están compuestas de un polímero biocompatible y biodegradable seleccionado de entre ácido poliglicólico, ácido poli-D,L-láctico, ácido poli-D,L-láctico-co-glicólico, policaprolactona, polidioxanona y una combinación de los mismos. En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, las nanofibras electrohiladas biocompatibles están compuestas de ácido poli-D,L-láctico (PLA).
- 40

- En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38.
- 45
- 50

- En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, el al menos un agente activo se carga en un porcentaje de 0,001-20 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En una realización preferida de la membrana no tejida de la invención, el al menos un agente activo se carga en un porcentaje de 0,5-5 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En una realización lo más preferida de la membrana no tejida de la invención, el al menos un agente activo se carga en un porcentaje de 0,75 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida.
- 55

- En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml y se carga en un porcentaje de 0,001-20 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es
- 60
- 65

5 peso total de la membrana no tejida.

10 de 0,5-5 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y se carga en un porcentaje de 0,5-5 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y

15 micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y se carga en un porcentaje de 0,5-5 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida.

20 biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml y se carga en un porcentaje de 0,75 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y se carga en un porcentaje de 0,75 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida.

25 un porcentaje de 0,75 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y se carga en un porcentaje de 0,75 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida.

En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$ . En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$ .

45 menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$ . En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$ .

55 las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$ . En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$ . En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que uno de los agentes activos es SN-38 y las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$ .

Las fibras electrohiladas de la invención tienen un diámetro en el orden de magnitud de algunos nanómetros formando una membrana con gran área específica. En una realización particular de la membrana no tejida de la invención, las





En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 200-600 nm. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 200-600 nm. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 200-600 nm.

En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm.

En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 3-10  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm.

En una realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En otra realización particular, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm. En una realización preferida, la membrana no tejida de la invención comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles fabricadas con PLA y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, en la que el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml, las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,5-5  $\mu\text{m}$  y las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 400-1000 nm.

Las propiedades de las membranas no tejidas de la invención (blandura, ligereza, maleabilidad y resistencia) las hacen apropiadas para personalizar productos a medida para cubrir áreas específicas de un tejido sólido (un tumor, por ejemplo) que se va a tratar. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un producto a medida que comprende la membrana no tejida tal como se ha definido previamente para cubrir un área específica de un tejido sólido (en adelante, "el producto a medida de la invención").

El producto a medida de la invención que comprende la membrana no tejida de la invención puede obtenerse, por ejemplo, de acuerdo con el siguiente método: en primer lugar, se obtendrá una imagen tridimensional del tejido/órgano a través de técnicas de generación de imágenes convencionales (p. ej., mediante ultrasonido o mediante generación

de imágenes por resonancia magnética). Después, la membrana no tejida de la invención se cortará en consecuencia para envolver la superficie del tejido/órgano tratado.

Además, en otro aspecto la invención proporciona un método para obtener la membrana no tejida definida  
5 previamente (en adelante "el método de la invención") que comprende las etapas de:

- (a) electrohilar una solución de un polímero biocompatible; y
- (b) verter simultáneamente sobre el colector una suspensión de micropartículas de al menos un agente activo para  
10 obtener una membrana no tejida electrohilada que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras.

La solución del polímero biocompatible de la etapa (a) puede ser una solución del polímero disuelto en un disolvente correcto o, como alternativa, el polímero fundido y puede prepararse mediante cualquier método apropiado de la técnica.

15 La elección de un disolvente correcto para el proceso fue un parámetro estudiado muy importante, porque determina si las fibras son capaces de formarse, además de influir en la porosidad de la fibra. A fin de que se produzca suficiente evaporación de disolvente entre la punta del capilar y el colector, ha de usarse un disolvente volátil. A medida que el chorro de fibra viaja a través de la atmósfera hacia el colector, se produce una separación de fase antes de que se  
20 depositen las fibras de polímero sólido, un proceso que está sumamente influido por la volatilidad del disolvente.

Los disolventes más adecuados para disolver por ejemplo PLA, encontrados durante la investigación fueron diclorometano y cloroformo, porque son disolventes muy potentes y permitieron el proceso de electrohilado. Sin embargo, el uso de cloroformo como disolvente se descartó debido a su toxicidad y complejidad relacionada con su  
25 manipulación durante el proceso de electrohilado. Otros posibles disolventes para usar en el método de la invención pueden ser acetato de etilo, acetona, dimetilformamida y dimetilsulfóxido (DMSO). En cualquier caso, el experto seleccionará el disolvente de acuerdo con la naturaleza del polímero que se va a disolver.

El disolvente elegido para llevar a cabo la investigación fue diclorometano, porque se considera el menos tóxico de los  
30 compuestos organoclorados simples. Sin embargo, este disolvente presenta algunos riesgos para la salud ya que su alta volatilidad hace que sea un riesgo grave por inhalación. A fin de evitar el riesgo por inhalación del disolvente, el dispositivo de electrohilado debería estar provisto de un extractor de aire.

En una realización particular del método de la invención, la solución del polímero biocompatible de la etapa (a) es una  
35 solución de PLA en diclorometano.

Después de seleccionar un disolvente adecuado, fue necesario establecer la mejor concentración de polímero, ya que determina la capacidad de hilado de una solución, a saber, si se forma o no una fibra. La concentración de polímero influye tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de la solución, las cuales son ambas parámetros muy  
40 importantes en el proceso de electrohilado.

En el método de la invención, las mejores condiciones las proporcionó una concentración de polímero del 10 % del peso de la solución. Las soluciones de alta concentración, de más del 10 %, aumentaron enormemente la viscosidad de la solución, lo cual hizo difícil controlar la velocidad de flujo de la solución a través del capilar y, por consiguiente, el  
45 proceso de electrohilado. También se notó en algunos experimentos que el diámetro de fibra de las membranas obtenidas podía aumentar con concentración de solución creciente. Si la solución está demasiado diluida, debido a los efectos decrecientes sobre la tensión superficial y la viscosidad, se produce un proceso secundario y simultáneo, a saber, electropulverización, en la cual, la fibra se rompe en gotitas antes de alcanzar el colector.

50 En una realización particular del método de la invención, la concentración de polímero oscila del 8 al 15 % del peso de la solución. En una realización preferida del método de la invención, la concentración de polímero es del 10 % del peso de la solución.

Una vez preparada la solución de polímero biocompatible, ésta se somete a un proceso de electrohilado (**figura 1**) en  
55 un dispositivo de electrohilado que puede ser cualquiera de la técnica. Para este fin, la solución de polímero se sujeta mediante su tensión superficial al extremo de un tubo capilar se somete a un campo eléctrico. Cuando el campo eléctrico aplicado alcanza un valor crítico, las fuerzas eléctricas repulsivas superan a las fuerzas de tensión superficial. En última instancia, se expulsa desde la punta del cono de Taylor un chorro cargado de la solución y se produce un latigazo rápido e inestable del chorro en el espacio entre la punta del capilar y el colector que conduce a la evaporación  
60 del disolvente, dejando un polímero detrás y conduciendo a una maraña de nanofibras depositadas sobre el colector.

La tensión de alto voltaje aplicada al chorro fue un valor crítico que osciló de 8 kV a 20 kV y se encontró que el voltaje mejor aplicado que mejoró el proceso fue 10 kV. A este voltaje, el proceso de electrohilado se lleva a cabo de manera uniforme, con formación del cono de Taylor, sin defectos de perla y producción de fibras poliméricas con diámetros a  
65 nanoescala. Se encontró una configuración óptima adicional para la velocidad de flujo del electrohilado, distancia del

hilador al colector, tamaño, forma y naturaleza del colector, temperatura y humedad ambientales y geometría de la cámara de hilado.

El electrohilado se llevó a cabo durante un tiempo de 15-40 min, preferentemente a un tiempo de 20 min con un flujo de solución de polímero de 0,4-0,6 ml/h, preferentemente de 0,5 ml/h, dependiendo del diámetro de la aguja usada.

El experto valorará la forma y dimensiones de la membrana no tejida así obtenida de acuerdo con el fin último de ésta.

En una realización particular del método de la invención, el espesor de la membrana no tejida oscila de 0,05 a 0,5 mm.

10 En una realización preferida del método de la invención, el espesor de la membrana no tejida es de 0,2 mm.

Durante el electrohilado de la solución de polímero, la suspensión de micropartículas se carga simultáneamente dentro de la membrana. El proceso de carga puede llevarse a cabo mediante cualquier método que permita la captura de micropartículas entre las nanofibras. Por ejemplo, puede cargarse una dosis particular de micropartículas en suspensión en una jeringa conectada a una bomba de infusión y verterse encima del colector a intervalos regulares de tiempo durante el proceso de electrohilado.

La suspensión de micropartículas del al menos un agente activo de la etapa (b) puede prepararse mediante diferentes métodos de la técnica, tal como se ha indicado previamente.

20 Puede prepararse una suspensión de microcristales de agente terapéutico mediante el método de precipitación, bien mediante incompatibilidad con el disolvente, o bien mediante cristalización dependiente del pH, preferentemente mediante cristalización dependiente del pH. Además, puede obtenerse una suspensión de micropartículas de proteína activa mediante liofilización y posterior adición de un disolvente apropiado.

25 En una realización particular del método de la invención, la suspensión de micropartículas se prepara mediante liofilización de una solución de al menos un agente activo seguida por la adición de un disolvente en el cual es soluble el agente a una concentración menor de 33 mg/ml.

30 En una realización particular del método de la invención, la suspensión de micropartículas se prepara mediante precipitación. En una realización particular del método de la invención, la suspensión de micropartículas se prepara añadiendo a la solución de al menos un agente activo un disolvente en el cual es insoluble el agente activo. En una realización preferida del método de la invención, la suspensión de micropartículas se prepara añadiendo a la solución de al menos un agente activo una solución que tiene un pH al cual es insoluble el agente activo.

35 Opcionalmente, se usa un tensioactivo para estabilizar la suspensión de micropartículas. El tensioactivo puede añadirse a la solución de al menos un agente activo antes de añadir el disolvente o la disolución en la cual es insoluble el agente activo. Como alternativa, el tensioactivo puede añadirse al disolvente o la solución en la cual es insoluble el agente activo y después se añade esta mezcla a la solución de al menos un agente activo. Como alternativa, el tensioactivo puede añadirse, tanto a la solución de al menos un agente activo, como al disolvente o la disolución en la cual es insoluble el agente activo.

Este tensioactivo puede ser un tensioactivo no iónico aprobado por la FDA u otra agencia reguladora, tal como un tensioactivo Pluronic (F68, F127 F108, L101, L121, P85, P105 o P123), un tensioactivo Tetronic (T1307, T1107 o T904), fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lecitina, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, o Tween 80, por ejemplo. El tensioactivo puede usarse a una concentración del 0,01-10 %, preferentemente del 2% en peso del volumen total de solución. En cualquier caso, podrían quedar cantidades mínimas del agente tensioactivo en las micropartículas de agente activo y podrían ayudar a disolverlo una vez que la membrana no tejida se colocase en el área que se va a tratar.

50 En una realización particular del método de la invención, la suspensión de micropartículas se prepara mezclando una solución de al menos un agente activo con una solución que comprende un tensioactivo y que tiene un pH al cual es insoluble el agente activo.

55 Opcionalmente, el método de la invención puede incluir una etapa adicional de deshidratación de la membrana no tejida así obtenida. En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (b) se deshidrata a temperatura ambiente y al vacío.

Opcionalmente, la membrana no tejida así obtenida puede recubrirse adicionalmente por un lado mediante uno de los siguientes métodos: adhesión con pegamento biocompatible, contacto con disolvente del polímero, perforación mecánica, o parámetros de electrohilado que favorecen la adhesión de la fibra. En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (b) se recubre por un lado. En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (b) se deshidrata y después se recubre por un lado.

65

En una realización particular del método de la invención, comprende las etapas de:

- (i) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger una primera capa de una membrana no tejida que comprenden nanofibras electrohiladas biocompatibles;
- 5 (ii) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible y verter simultáneamente una suspensión de micropartículas de al menos un agente activo para recoger sobre la primera capa una segunda capa de una red no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras; y
- 10 (iii) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger sobre la segunda capa una tercera capa de una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

Los parámetros y condiciones son similares a los descritos previamente.

El experto valorará la forma y dimensiones cada capa de la membrana no tejida así obtenida de acuerdo con el fin  
15 último de ésta.

En una realización particular del método de la invención, el espesor de cada capa de la membrana no tejida oscila de 0.05 a 0,5 mm. En una realización preferida del método de la invención, el espesor de cada capa de la membrana no tejida es de 0,2 mm.

20 En una realización preferida del método de la invención, comprende las etapas de:

- (i) electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger una primera capa de una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles;
- 25 (ii) electrohilar una solución de un polímero biocompatible y verter simultáneamente una suspensión de micropartículas de al menos un agente activo para recoger sobre la primera capa una segunda capa de una red no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras; y
- (iii) electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger sobre la segunda capa una tercera capa de una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

30 En otra realización preferida del método de la invención, comprende las etapas de:

- (i) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger una primera capa de una membrana no tejida que comprenden nanofibras electrohiladas biocompatibles;
- 35 (ii) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible y verter simultáneamente una suspensión de micropartículas de al menos un primer agente activo para recoger sobre la primera capa una segunda capa previa de una red no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un primer agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras;
- 40 (ii') al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible y verter simultáneamente una suspensión de micropartículas de al menos un segundo agente activo para recoger sobre la segunda capa previa una segunda capa posterior de una red no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un segundo agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras y
- (iii) al menos electrohilar una solución de un polímero biocompatible para recoger sobre la segunda capa posterior una tercera capa de una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.

45 En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se deshidrata a temperatura ambiente y al vacío.

Opcionalmente, la membrana no tejida así obtenida puede recubrirse adicionalmente por un lado mediante uno de los  
50 siguientes métodos: adhesión con pegamento biocompatible, contacto con disolvente del polímero, perforación mecánica, o parámetros de electrohilado que favorecen la adhesión de la fibra. En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se recubre por un lado. En una realización particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se deshidrata y después se recubre por un lado. En una realización más particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en  
55 la etapa (iii) se recubre por un lado. En otra realización más particular del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se recubre por el lado de la tercera capa. En una realización preferida del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se deshidrata y después se recubre por el lado de la primera capa. En otra realización preferida del método de la invención, la membrana no tejida obtenida en la etapa (iii) se deshidrata y después se recubre por el lado de la tercera capa.

60 En otro aspecto, la invención proporciona la membrana no tejida definida previamente para uso en la liberación local de un principio activo de una manera sostenida y controlada a un área del organismo que se va a tratar.

En otro aspecto, la invención proporciona el producto a medida definido previamente para cubrir un área específica de  
65 un tejido sólido seleccionado de entre piel, mucosas, huesos, músculos, órganos internos y tumores sólidos.

En oncología, por ejemplo, la membrana no tejida y/o el producto a medida de la invención son útiles para tratar tumores que incluyen áreas no resecables con vasos vitales, para tratar bordes quirúrgicos en los que quedan restos tumorales, o para tratar tejidos óseos con infiltración tumoral o gammagrafía ósea positiva. También son útiles para la regeneración ósea mediante el tratamiento de tejidos dañados sobre los cuales se están liberando los factores de regeneración o para liberar antibióticos a un área posquirúrgica.

La membrana no tejida de la invención puede aplicarse superponiéndola a la superficie que se va a tratar y después suturando los bordes de la membrana al tejido circundante.

El producto a medida que comprende la membrana no tejida de la invención puede aplicarse envolviendo la superficie del tejido u órgano que se va a tratar.

La liberación local de fármacos cargados en la membrana no tejida de la invención da lugar a altas concentraciones de fármacos dentro de la masa tumoral, reduce la exposición farmacológica sistémica y es segura para los tejidos sanos circundantes.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben considerarse como limitantes del alcance de la solicitud.

## 20 Ejemplo 1

### **Preparación de una membrana no tejida que comprende nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38**

#### 25 1.1 Preparación de una suspensión de microcristales de SN-38

A 50 ml de tampón acetato a pH 5,0 se añadió un 2 % de Pluronic F68. Después la SN-38 se disolvió (4 mg/ml) en NaOH 0,1 N, proporción 9:1. El tampón acetato (450 µl) se vertió sobre la solución de SN-38 (50 µl, en un eppendorf) con agitación a temperatura ambiente. No se observó turbidez alguna durante la primera hora a temperatura ambiente. Después de 1 hora, aparecieron pequeños cristales. Las muestras se almacenaron a 4 °C durante 24 h con agitación cada hora. Después de eso, no se observaron agregados, ya que la suspensión era muy estable. El diámetro medio de los microcristales en la suspensión se determinó mediante microscopía óptica, siendo de 0,5-5 µm. La **figura 2** muestra una imagen de microscopía óptica de la suspensión de microcristales SN-38 así preparados.

#### 35 1.2 Preparación de una membrana no tejida que comprende nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA

Se preparó una membrana no tejida que tenía una capa de nanofibras de PLA electrohilado, una segunda capa de nanofibras de PLA electrohilado y microcristales de SN-38 enmarañados entre las nanofibras de PLA y una tercera capa de nanofibras de PLA electrohilado.

Brevemente, El PLA se disolvió en cloruro de metileno en una concentración del 10 % en peso, se cargó en una jeringa y se introdujo en una bomba de velocidad constante conectada a la máquina de electrohilado.

Se hilaron 17 mg de PLA (20 min con un flujo de 0,5 ml/hora de solución de PLA y a un voltaje de 10 kV) para formar una primera capa de una membrana no tejida de PLA sin fármaco sobre un sustrato de papel vegetal, teniendo 50 mm de diámetro y 0,2 mm de espesor. Esta membrana no tejida tenía nanofibras de PLA regulares tal como se muestra en la **figura 3**. Esta primera capa sirvió como soporte para la capa cargada de fármaco siguiente.

Después, la suspensión de partículas preparada en 1.1 (1 ml que contenía 400 µg de SN-38 cristalizada) se dividió en 20 fracciones y cada fracción se vertió a intervalos de tiempo de 1 minuto durante el proceso de electrohilado de 20 mg adicionales de PLA. Se formó una segunda capa de una membrana no tejida de PLA cargada con fármaco y que tenía 50 mm de diámetro y 0,2 mm de espesor.

Después de cargar la suspensión completa de las micropartículas de fármaco, se hilaron 17 mg de PLA (20 min con un flujo de 0,5 ml/hora de solución de PLA y a un voltaje de 10 kV) para formar una tercera capa de una membrana no tejida de PLA sin fármaco y que tenía 50 mm de diámetro y 0,2 mm de espesor.

Por último, la membrana no tejida así preparada se secó a temperatura ambiente y al vacío durante 24 h. La **figura 4** y la **figura 5** son microfotografías electrónicas de barrido de la membrana no tejida obtenida a diferentes aumentos (x1180 y x4700, respectivamente).

En la membrana no tejida preparada, las nanofibras de PLA tuvieron un diámetro medio de 400-1000 nm, determinado mediante microscopía electrónica de barrido, los microcristales de SN-38 tuvieron un diámetro medio de 0,5-5 µm y la cantidad teórica de SN-38 cargada fue de 0,75 % en peso (es decir, 0,4 mg de SN-38 cargados en una membrana de

54 mg).

## Ejemplo 2

### 5 Caracterización *in vitro* de la membrana no tejida obtenida en el ejemplo 1

Se llevaron a cabo ensayos a fin de caracterizar el patrón de liberación *in vitro* y la actividad *in vitro* de la membrana preparada.

#### 10 Patrón de liberación *in vitro*

Para estudiar el perfil de liberación del fármaco atrapado en la membrana no tejida de la invención, se realizaron experimentos *in vitro* usando membranas de 5 mm que contenían 5 µg de cristales de SN-38. Las membranas se introdujeron en placas de 24 pocillos que contenían 400 µl de medio de cultivo (RPMI) cada uno, a 37 °C. El volumen  
15 completo se eliminó en puntos temporales establecidos (8, 24, 48 y 96 horas) y se renovó con medio reciente. El fármaco liberado se cuantificó con un cromatógrafo de líquido de alta resolución (Shimadzu) con un detector de fluorescencia. El fármaco liberado en cada punto temporal se representa en la **figura 6**, y la liberación acumulada se representa en la **figura 7**.

20 La **figura 6** muestra el perfil de liberación *in vitro* de las membranas preparadas de 5 mm de diámetro. Los puntos individuales representan fármaco liberado por membranas individuales y la línea representa el modelo que se ajusta al patrón de liberación.

La **figura 7** la liberación acumulada de SN-38 desde las membranas preparadas de 5 mm de diámetro. Los puntos  
25 representan medias y la línea la mejor curva de ajuste.

#### Actividad *in vitro*

#### 30 Experimento A - Conservación de la actividad antitumoral del agente activo después de fabricar la membrana no tejida de la invención

Para determinar si la actividad antitumoral del fármaco se conservaba después del proceso de fabricación de las membranas, los presentes inventores coincubaron las membranas con líneas celulares de neuroblastoma. En un experimento previo, los presentes inventores determinaron la medida hasta la cual SN-38 inhibe el neuroblastoma.  
35 Dicho experimento se realizó exponiendo líneas celulares LAN-1, SK-N-BE(2)c y SK-N-AS a una solución recién hecha de SN-38 en RPMI, preparada a partir de una solución de reserva de SN-38, de 1 mg/ml en DMSO. Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, a 3000 células por pocillo, en medio RPMI. A las 24 horas, las células se expusieron a SN-38 (intervalo de concentración 10-0,000001 µM). Después de 4 horas, el fármaco se retiró y se añadió medio reciente. La viabilidad del cultivo celular se cuantificó 4 días más tarde, usando el ensayo de  
40 viabilidad celular MTS (Promega). Los valores establecidos de CI50 estuvieron en el rango nanomolar: 10 nM, 46 nM y 190 nM para células LAN-1, SK-N-BE(2)c y SK-N-AS, respectivamente (**figura 8**).

La **figura 8** muestra la actividad *in vitro* de una solución reciente de SN-38 soluble contra varias líneas celulares de neuroblastoma, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con pocillos de control sin tratar.  
45 Cada punto representa la media (± DT) de 3-5 pocillos.

Para estudiar la actividad antitumoral de la membrana fabricada, se coincubaron membranas de 5 mm de diámetro cargadas con 5 µg de microcristales de SN-38 con células en placas de 24 pocillos. Brevemente, las células se sembraron, a 12000 células por pocillo, y se dejaron 24 horas en el incubador. Después, se añadió una membrana a  
50 cada pocillo y se retiró en puntos temporales predeterminados (8, 24, 48 y 96 horas). En cada punto temporal, se eliminó el medio de cultivo de todos los pocillos (incluyendo tratados y de control no tratados) y se añadió medio reciente. Después de 96 horas, La viabilidad del cultivo celular se evaluó con el ensayo MTS. Los presentes inventores observaron que las membranas inhibían significativamente el crecimiento de las células tumorales, como signo de la actividad conservada del fármaco (**figura 9**). Los presentes inventores también observaron que exposiciones más  
55 largas a las membranas inducían una actividad antitumoral más potente, lo cual sugería liberación farmacológica sostenida desde las formulaciones.

La **figura 9** muestra la actividad *in vitro* de las membranas no tejidas cargadas con SN-38 sobre varias líneas celulares de neuroblastoma, expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células de control sin tratar.  
60 Se representaron las medias (± DT) de 3 pocillos.

#### Experimento B - Liberación sostenida de fármaco activo de la membrana no tejida de la invención

Para verificar la liberación sostenida de fármaco activo desde las membranas, los presentes inventores diseñaron un  
65 experimento en el cual las membranas se preliberaron en medio, previamente a ser transferidas a cultivos celulares.

Brevemente, las células se sembraron como en el experimento A y, en paralelo, las membranas se preliberaron durante 24 o 48 en 400 µl de medio reciente sin células a 37 °C. Después, las membranas se transfirieron a los cultivos celulares, como en el experimento A. Después de 3 días de incubación, las membranas se eliminaron y la viabilidad de las células se cuantificó con el ensayo MTS. Los presentes inventores observaron que las membranas preliberadas conservaban una fracción significativa de la actividad en comparación con las membranas intactas (de control), sugiriendo que la formulación es activa durante periodos de tiempo prolongados, al menos 8 horas, y que puede portarse dentro de la membrana (**figura 10**).

La **figura 10** muestra la actividad de las membranas preliberadas y membranas de control (intactas), expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células sin tratar. Se representan las medias ( $\pm$  DT) de 3 pocillos.

#### Experimento C - Evidencia de que la actividad citotóxica de las membranas preliberadas se debe al agente activo capturado no liberado capturado

Para verificar adicionalmente que la actividad citotóxica de las membranas preliberadas observada en el experimento B se debe al fármaco capturado no liberado, y no a la absorción de fármaco soluble liberado previamente, o a la propia matriz, los presentes inventores cocultivaron membranas vacías (de control) con membranas cargadas con SN-38 durante 24 horas en placas de 24 pocillos. En cada pocillo, los presentes inventores coincubaron una membrana cargada y una membrana vacía, en 400 µl de medio RPMI. Ambas membranas coincubadas se lavaron en 5 ml de PBS reciente y después se transfirieron, una a una, a cultivos celulares de neuroblastoma (sembrados como en los experimentos A y B). Las células se cultivaron 3 días con las membranas y después se realizó el ensayo MTS. Los resultados mostraron que las membranas vacías no eran citotóxicas, incluso después de coincubación con las cargadas, lo que garantizaba que el fármaco soluble no se transporta absorbido por la membrana vacía. Por el contrario, las membranas cargadas, bien intactas o bien preliberadas durante 24 horas durante la coincubación con las vacías, conservaron su actividad esperada, como ya se demostró en los experimentos A y B.

La **figura 11** muestra la actividad de las membranas no tejidas coincubadas (cargadas y vacías) y membranas no tejidas de control (cargadas y vacías no coincubadas), expresada como porcentaje de viabilidad celular en comparación con células sin tratar. Se representan las medias ( $\pm$  DT) de 3 pocillos.

#### **Ejemplo 3**

##### **Caracterización *in vivo* de la membrana no tejida obtenida en el ejemplo 1**

Las membranas se cortaron en trozos circulares de 12 mm de diámetro que contenían 100 µg de SN-38 cada uno. Una membrana se insertó por vía subcutánea en ratones desnudos CD1 ((n=5; Charles River); es decir, cada ratón (peso promedio, 25 g/ratón) recibió una dosis de 4 mg/kg de SN-38. Se obtuvieron muestras de sangre (100 µl) del plexo retroorbitario a las 6 horas (ratones 1 y 2) y 24 horas (ratones 3, 4 y 5) y se determinaron los niveles de SN-38 mediante cromatografía líquida de alta resolución. A las 6 horas, las concentraciones de SN-38 en plasma fueron de 2,4 y 4,0 nM para los ratones 1 y 2, respectivamente. A las 24 horas, las concentraciones de SN-38 en plasma fueron de 1,4, 0,33 y 1,11 nM, para los ratones 3, 4 y 5, respectivamente. Dichos resultados muestran que la exposición a SN-38 en plasma es baja y no tóxica durante la liberación local de SN-38 desde la membrana a los tejidos circundantes, como propusieron previamente los inventores. Después del experimento de farmacocinética, los efectos adversos en los ratones se observaron estrechamente durante los días-semanas siguientes. Durante los primeros días se observó una inflamación leve. Después de la resolución de la inflamación, la piel de alrededor de la membrana siguió sobresaliendo levemente hasta el final del experimento (al menos 12 semanas desde la inserción de la membrana); como resultado de una fracción de las nanofibras de PLA que permaneció sin degradar. Esta observación se esperaba debido al largo semiperiodo de degradación del PLA. No se observó pérdida de peso alguna en los ratones. En general, la membrana apareció como segura en las condiciones experimentales seleccionadas.

## REIVINDICACIONES

1. Una membrana no tejida que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo en forma pura enmarañadas entre las nanofibras, **caracterizada por que** las micropartículas están retenidas físicamente en la membrana de tal manera que sólo son capaces de ser liberadas en su forma solubilizada de manera sostenida, y también **caracterizada por que** el agente activo tiene una solubilidad en agua menor de 33 mg/ml.
2. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** comprende al menos una primera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles, una segunda capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre las nanofibras; y una tercera capa que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles.
3. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el al menos un agente activo tiene una solubilidad en agua de 0,001-33 mg/ml.
4. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las micropartículas del al menos un agente activo tienen son microcristales.
5. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las micropartículas del al menos un agente activo tienen un diámetro medio de 0,1-20 µm.
6. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el al menos un agente activo es un agente terapéutico.
7. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada por que** el agente terapéutico es un agente quimioterápico.
8. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el al menos un agente activo se carga en un porcentaje de 0,001-20 % en peso con respecto al peso total de la membrana no tejida.
9. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las nanofibras electrohiladas biocompatibles tienen un diámetro medio de 50-1000 nm.
10. La membrana no tejida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las nanofibras electrohiladas biocompatibles están compuestas de un polímero biocompatible y biodegradable seleccionado de entre ácido poliglicólico, ácido poli-D,L-láctico, ácido poli-D,L-láctico-co-glicólico, policaprolactona, polidioxanona y una combinación de los mismos.
11. Un producto a medida que comprende la membrana no tejida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para cubrir un área específica de un tejido sólido.
12. Un método para obtener la membrana no tejida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado por que** comprende las etapas de:
  - (a) electrohilar una solución de un polímero biocompatible; y
  - (b) verter simultáneamente una suspensión de micropartículas de al menos un agente activo para obtener una membrana no tejida electrohilada que comprende nanofibras electrohiladas biocompatibles y micropartículas de al menos un agente activo enmarañadas entre dichas nanofibras.
13. La membrana no tejida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en la liberación local de un principio activo de una manera sostenida y controlada a un área del organismo que se va a tratar.
14. Un producto a medida que comprende la membrana no tejida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento de un área específica de un tejido sólido seleccionado de entre piel, mucosas, huesos, músculos, órganos internos y tumores sólidos.
15. La membrana no tejida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o el producto a medida de acuerdo con la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de tumores que incluyen áreas no resecables con vasos vitales; en el tratamiento de bordes quirúrgicos en los que quedan restos tumorales; en el tratamiento de tejidos óseos con infiltración tumoral o gammagrafía ósea positiva; o en regeneración tisular, en la que el al menos un agente activo es un agente quimioterápico.

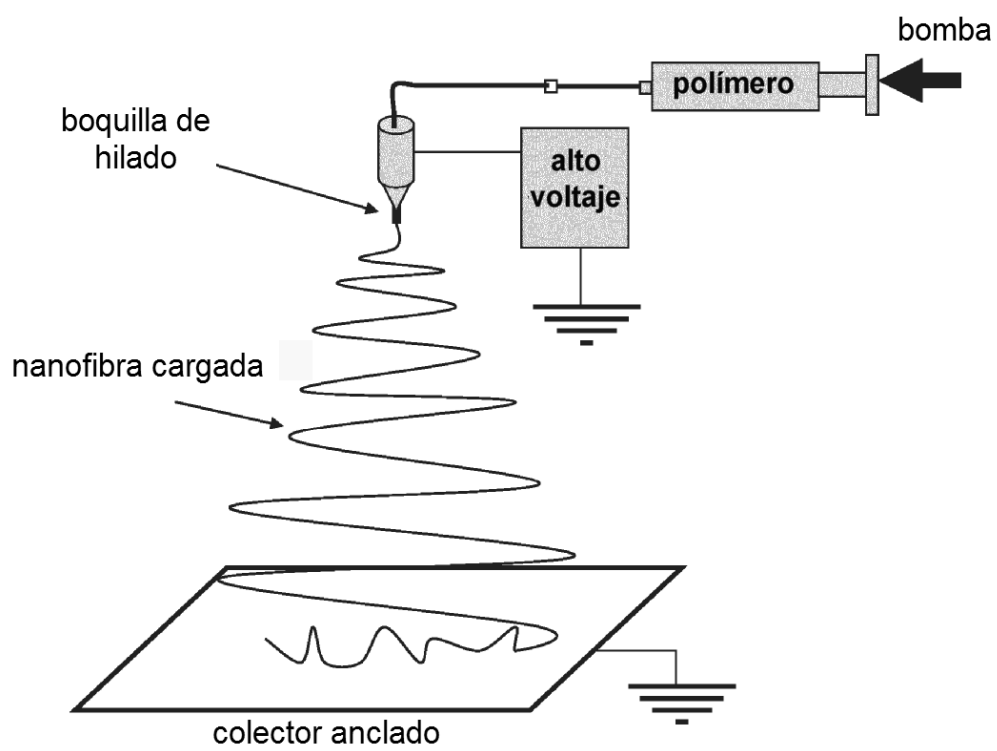
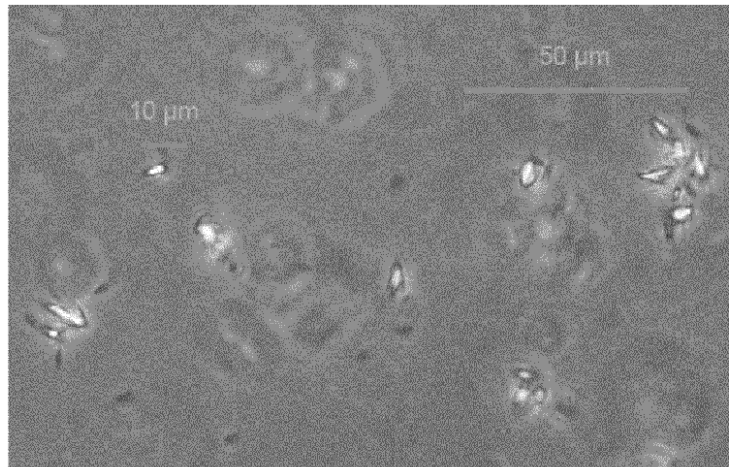
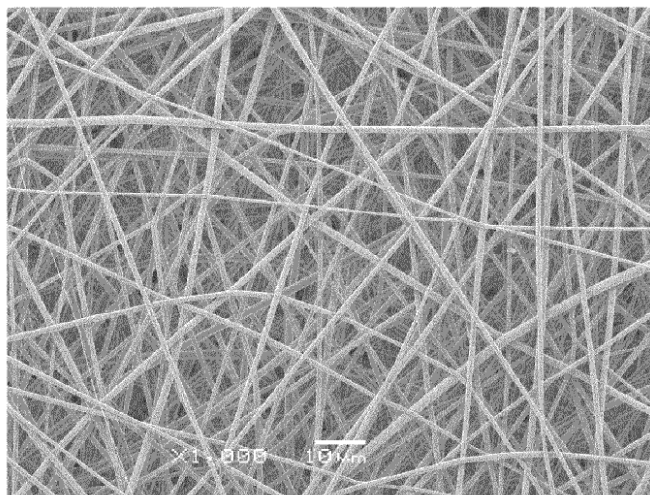


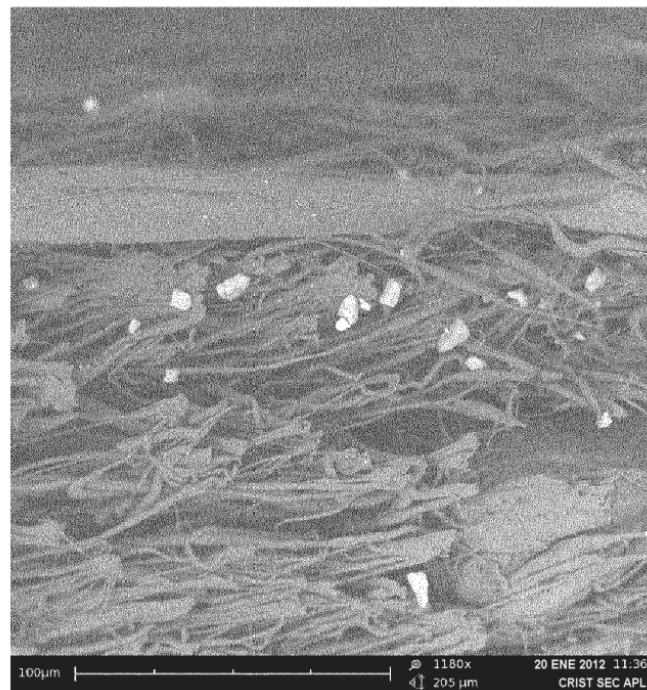
Fig. 1



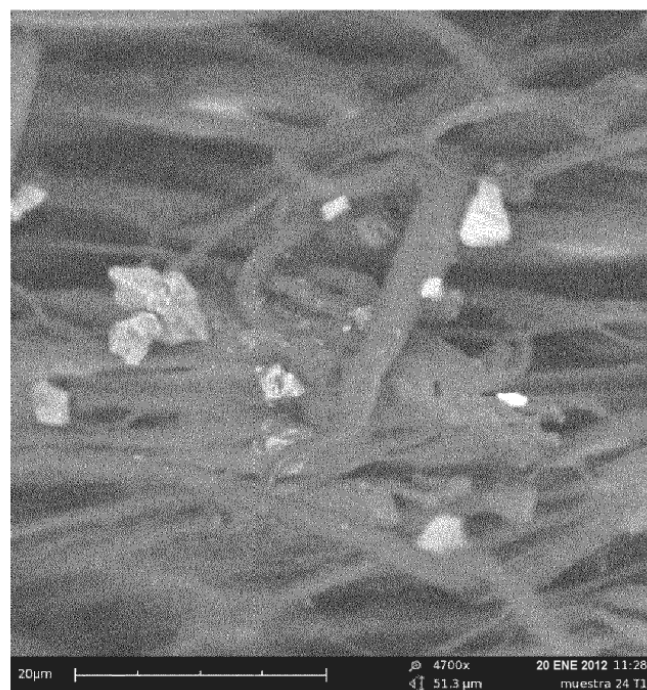
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

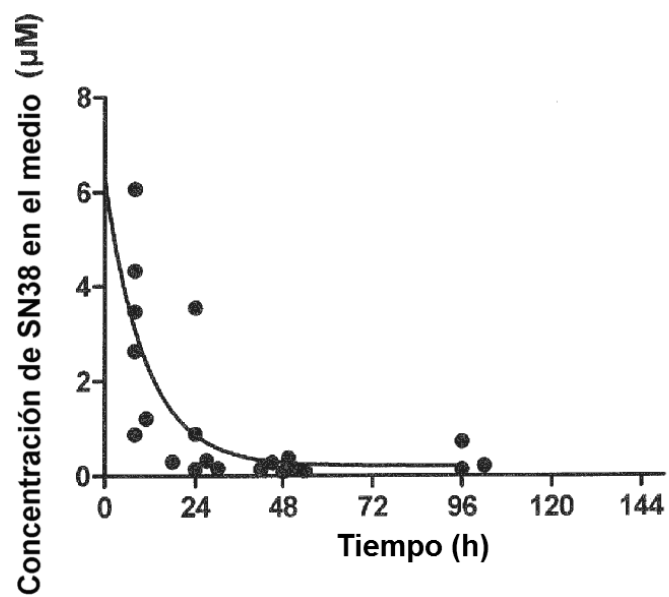


Fig. 6

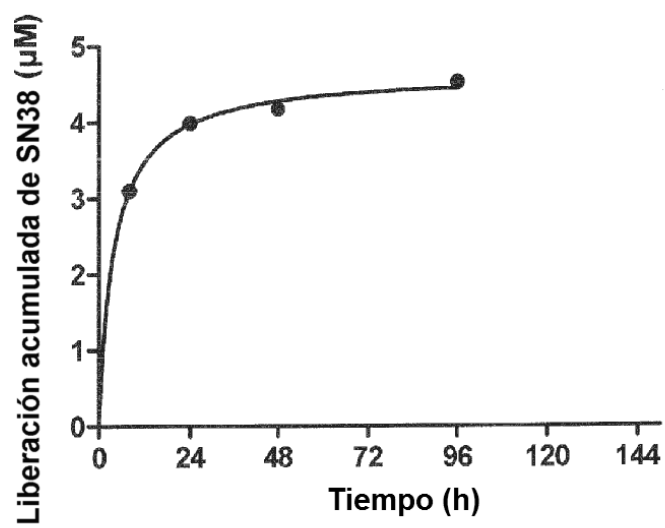


Fig. 7

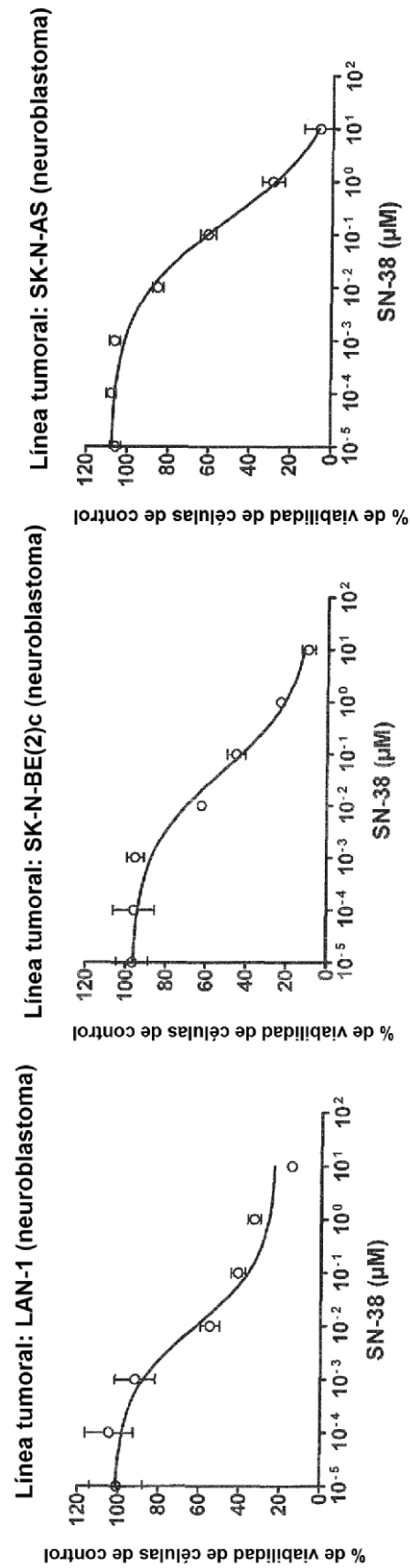
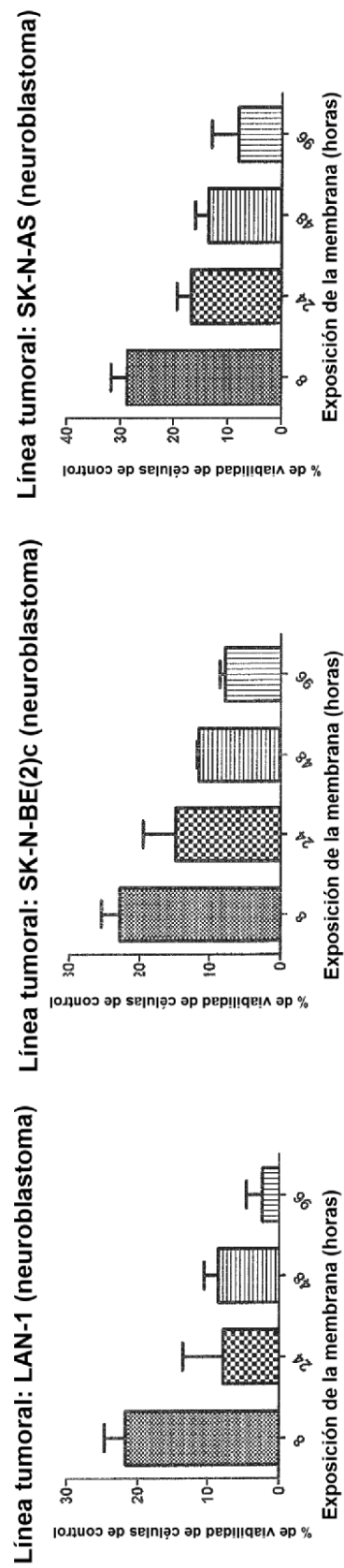
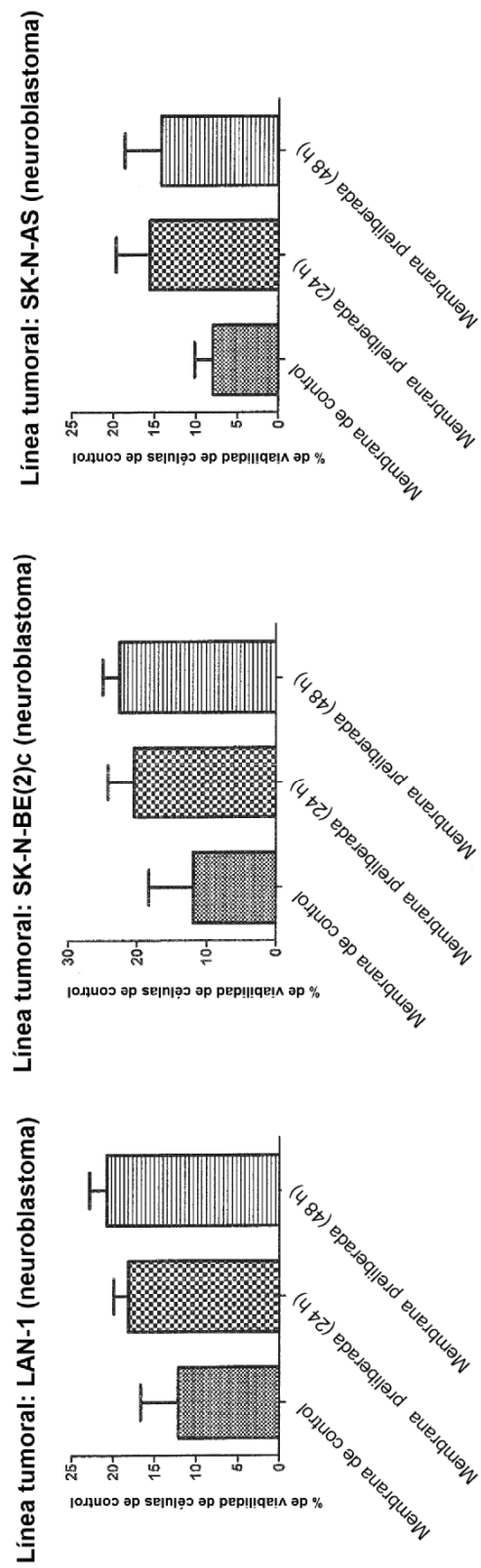


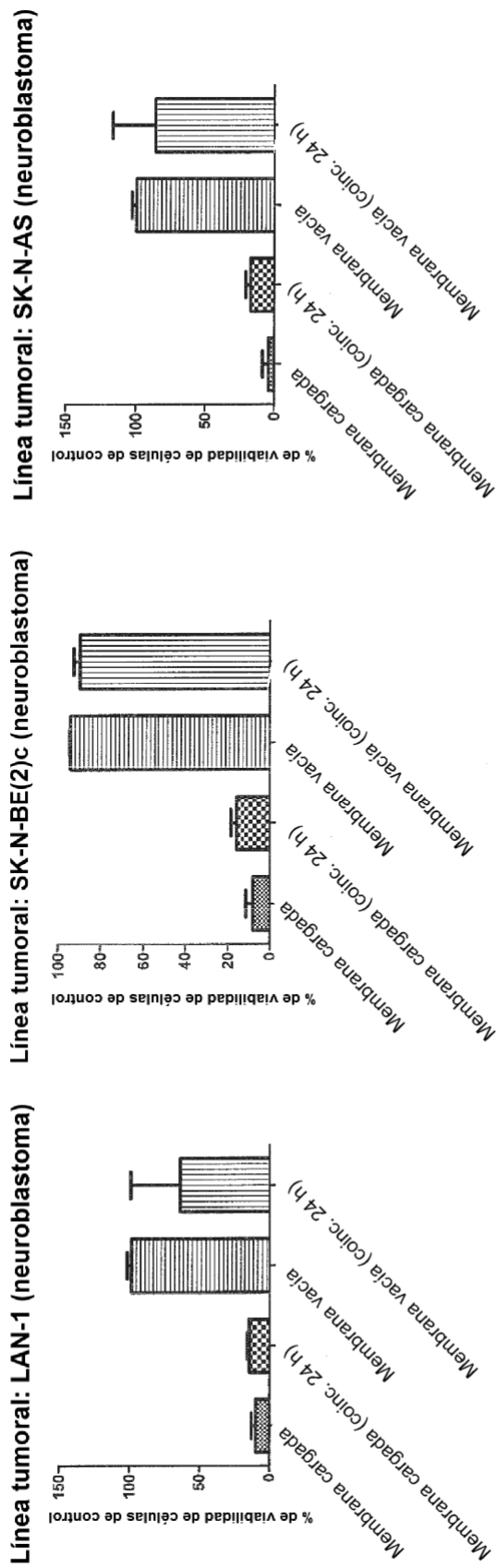
Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**