

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 942**

51 Int. Cl.:

A61K 31/485 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14764439 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2968577**

54 Título: **Microesferas de buprenorfina de alta carga de fármaco y método de producción de las mismas**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313837181

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

26.06.2019

73 Titular/es:

OAKWOOD LABORATORIES, LLC (33.3%)

7670 First Place Suite A

Oakwood Village, OH 44146, US;

RICHEY, TRACY (33.3%) y

THANOO, BAGAVATHIKANUN CHITHAMBARA (33.3%)

72 Inventor/es:

RICHEY, TRACY y

THANOO, BAGAVATHIKANUN, CHITHAMBARA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 717 942 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

Microesferas de buprenorfina de alta carga de fármaco y método de producción de las mismas

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a una formulación de microesferas de buprenorfina con una carga de fármaco mejorada o aumentada y una liberación rápida inicial baja, y un método de producir la misma. Específicamente, la divulgación se refiere a un método de fabricar de forma eficaz una microesfera de liberación sostenida con una alta carga de fármaco mejorando la solubilidad del agente activo, tal como buprenorfina, relativa a la fase dispersa del proceso de formación de la microesfera y preparar formulaciones de microesferas de buprenorfina con duraciones variables de liberación de fármaco.

15 Antecedentes

La buprenorfina es un tratamiento conocido para la adicción a narcóticos y se puede usar para tratar otras afecciones, tal como trastornos psiquiátricos, depresión, y esquizofrenia. En general, la buprenorfina se administra con un comprimido sublingual (comercialmente disponible como Suboxone) para tratar la adicción. Sin embargo, el tratamiento de mantenimiento a largo plazo a través de esta ruta es problemático ya que crea síndrome de abstinencia debido a la brusca subida y caída de las concentraciones del fármaco en plasma después de cada dosis. El cumplimiento del paciente y el potencial para abuso también son desventajas para este método de tratamiento.

Otros métodos de administración conocidos de buprenorfina incluyen un parche transdérmico, formulaciones basadas en aceite de sésamo, implantes biodegradables y no biodegradables – que pueden ser dolorosos de administrar ya que requieren anestesia local en el sitio de implante. Una formulación de microesferas inyectable de liberación sostenida mantendría una concentración en plasma constante, previniendo los síntomas de abstinencia.

Se han desarrollado soluciones de polímeros inyectables que contienen buprenorfina para proporcionar buprenorfina de liberación sostenida. Tras la inyección, el solvente difunde lejos del sitio de inyección, dejando que la matriz de polímero que contiene buprenorfina libere el fármaco a una velocidad controlada. Sin embargo, los solventes utilizados, tal como N-metil pirrolidona, en este sistema son tóxicos en vista de la Conferencia Internacional sobre la Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano (ICH) y la Convención de Farmacopea de los EE UU.

El documento US 7.041.320 describe un método de hacer micropartículas recubiertas que comprende mezclar un polímero biodegradable, buprenorfina, cloruro de metileno y dimetilsulfóxido para formar una fase orgánica, mezclar la fase orgánica con una fase acuosa para formar una emulsión, mantener la emulsión durante un periodo de tiempo suficiente para formar micropartículas endurecidas, recuperar las micropartículas, y recubrir las micropartículas con un polímero de recubrimiento para formar un recubrimiento polimérico en una cantidad entre el 0,1 al 0,85 por ciento en peso de las micropartículas en donde el polímero biodegradable es un miembro seleccionado del grupo que consiste en formas D o L ópticamente activas o formas DL ópticamente inactivas de polímeros de poli-lactida (PLA), poli-lactida-co-glicolida (PLA-PGA) y polímeros de poli-L-lactida-co-caprolactona (PLA-PCL).

Mientras que se han usado varios métodos para lograr una formulación inyectable de liberación sostenida, las microesferas o bien tenían una carga de fármaco que era demasiado baja para ser comercialmente viables – menos de aproximadamente el 2% - se produjeron con un recubrimiento de polímero adicional, creando dificultades de fabricación, incluían solventes tóxicos, o no proporcionaban la duración deseada de liberación sostenida. Sería deseable producir una formulación de microesferas de liberación sostenida inyectable comercialmente aceptable que tenga tanto una alta carga de fármaco como una liberación rápida inicial baja.

50 Compendio de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas 1 a 8.

Se proporciona un método para hacer una formulación de microesferas de liberación sostenida que tiene una alta carga de fármaco buprenorfina que incluye proporcionar una fase dispersa mezclando un polímero encapsulante, un solvente primario, una cantidad farmacéuticamente eficaz de buprenorfina que tiene una solubilidad relativa a la fase dispersa, y un cosolvente capaz de aumentar la solubilidad de la buprenorfina relativa a la fase dispersa; proporcionar una fase continua que comprende una solución acuosa; mezclar la fase dispersa con la fase continua; y preparar una formulación en suspensión de microesferas farmacéuticamente aceptable adecuada para ser administrada a un paciente.

Se divulga una formulación de microesferas de liberación sostenida para inyección a un paciente que se produce mediante las etapas que incluyen proporcionar una fase dispersa que comprende un polímero encapsulante, al menos un solvente, y una cantidad farmacéuticamente eficaz de buprenorfina; y proporcionar una fase continua que comprende una solución acuosa; mezclar la fase dispersa con la fase continua; y preparar una formulación de

microesferas farmacéuticamente aceptable adecuada para ser administrada a un paciente. La formulación de microesferas puede tener una carga de fármaco de aproximadamente el 35% hasta aproximadamente el 55% y una velocidad de liberación rápida inicial que produce concentraciones de buprenorfina en una fase de liberación inicial de no más de dos veces mayor que las concentraciones más altas de buprenorfina observadas durante una fase de liberación sostenida.

Además, la cantidad de buprenorfina se libera sustancialmente de la formulación de microesferas en aproximadamente un mes, pero menos de dos meses, después de que se inyecte en el paciente. Alternativamente, la cantidad de buprenorfina se libera sustancialmente de la formulación de microesferas en aproximadamente dos meses, pero menos de tres meses, después de que se inyecte en el paciente. Y, además alternativamente, la cantidad de buprenorfina se libera sustancialmente de la formulación de microesferas en aproximadamente tres meses, pero menos de nueve meses, después de que se inyecte en el paciente.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos acompañantes, se ilustran estructuras que, junto con la descripción detallada proporcionada posteriormente, describen formas de realización ejemplares de la invención reivindicada. Elementos similares se identifican con los mismos números de referencia. Se debe entender que los elementos mostrados como un único componente se pueden sustituir con múltiples componentes, y elementos mostrados como múltiples componentes se pueden sustituir con un único componente. Los dibujos no están a escala y la proporción de ciertos elementos puede estar exagerada para el fin de ilustración.

La figura 1 es un gráfico del perfil de liberación de buprenorfina in vitro a lo largo del tiempo para dos lotes de microesferas de buprenorfina formadas con y sin un cosolvente.

La figura 2 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 3,0 mg de buprenorfina/kg de buprenorfina HCL o 15,0 mg de buprenorfina/kg de buprenorfina base libre.

La figura 3 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 15,0 mg de buprenorfina/kg y una carga objetivo de fármaco del 25% y el 50%, respectivamente.

La figura 4 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 15,0 mg de buprenorfina/kg y un polímero encapsulante con una viscosidad inherente de 0,19 dl/g y 0,34 dl/g, respectivamente.

La figura 5 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 15,0 mg de buprenorfina/kg y un polímero que incluye un grupo final ácido o un polímero de extremo bloqueado, respectivamente.

La figura 6 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 100,0 mg de buprenorfina/kg y un polímero encapsulante que tiene una proporción de ácido láctico respecto a ácido glicólico de 85:15 con una viscosidad inherente de 0,54 dl/g, una proporción de ácido láctico respecto a ácido glicólico de 100:0 con una viscosidad inherente de 0,20 dl/g, y una proporción de ácido láctico respecto a ácido glicólico de 100:0 con una viscosidad inherente de 0,33 dl/g, respectivamente.

La figura 7 es un gráfico de las concentraciones en plasma de buprenorfina en ratas a las que se dio una única administración de microesferas que incluían 15,0 mg de buprenorfina/kg y un polímero encapsulante que tiene una proporción de comonomeros de 50:50 y 75:25, respectivamente.

Descripción detallada

Se divulga una formulación de microesferas de buprenorfina inyectable, de liberación sostenida, y se proporciona un método de producir la misma.

La formulación también puede tener una liberación rápida inicial baja o en estado estacionario. La formulación de microesferas se puede usar para tratar la adicción a agentes narcóticos, aunque se debe apreciar que la formulación de microesferas se puede usar para cualquier fin adecuado, tal como tratamiento del dolor. La formulación de microesferas se puede formar por un proceso de emulsión de aceite en agua (O/W) continuo que incluye proporcionar una fase dispersa orgánica que incluye al menos un polímero encapsulante, un solvente primario, un agente activo, tal como buprenorfina, o una sal del mismo, y un cosolvente capaz de mejorar la solubilidad del agente activo en la fase dispersa, y proporcionar una fase continua acuosa.

Además de tener una carga de fármaco de aproximadamente el 20%, y en algunos casos de hasta aproximadamente el 50%, las formulaciones de microesferas tienen una eficacia de encapsulación de fármacos mayor del 80%, y en algunos casos mayor de aproximadamente el 90%. El tamaño de partícula medio de las microesferas en las formulaciones es de aproximadamente 20 micrómetros hasta aproximadamente 60 micrómetros, lo que permite el uso de agujas más pequeñas para la inyección. Por ejemplo, la formulación de microesferas se puede inyectar en un paciente usando una jeringa con una aguja de calibre 25 o menor.

En una forma de realización, la fase dispersa puede incluir un polímero encapsulante biodegradable, tal como poli (D,L-lactida-co-glicolida) (de aquí en adelante "PLGA") o poli (L-lactida) (de aquí en adelante "PLA"). La fase dispersa incluye como un solvente primario diclorometano (DCM) y buprenorfina o una sal de la misma. El polímero encapsulante puede ser hidrofóbico o hidrofílico. En una forma de realización, el polímero encapsulante es hidrofóbico. En otra forma de realización, el polímero encapsulante tiene una viscosidad inherente de aproximadamente 0,16 η_{inh} dl/g hasta aproximadamente 0,54 η_{inh} dl/g.

La fase dispersa también incluye un cosolvente capaz de aumentar la solubilidad del agente activo en la fase dispersa. El cosolvente es alcohol bencílico (BzOH), que aumenta la solubilidad de buprenorfina en la fase dispersa que contiene diclorometano.

Ejemplo 1 – Solubilidad de buprenorfina

Se determinó la solubilidad de buprenorfina en varios solventes añadiendo 0,5 g de buprenorfina en un vial de vidrio de 20,0 ml y disolviéndola en volúmenes crecientes de solvente hasta que se alcanzó solubilidad por observación visual. Se usó DCM como el solvente principal y BzOH como el cosolvente. Se añadió después una cantidad igual de D,L-PLA a cada vial para confirmar que la solubilidad del fármaco en el sistema de solventes no estaba comprometida por la introducción del polímero. Como se muestra en la tabla 1, la adición de BzOH al DCM aumentó la solubilidad de buprenorfina en aproximadamente seis (6) veces.

Tabla 1

Sistema solvente	Cosolvente (% añadido en volumen)	Solubilidad de buprenorfina (g/g)	Solubilidad de buprenorfina (g/g) en presencia de igual cantidad de PLA
DCM	Ninguno	0,022	0,022
	Alcohol bencílico (33%)	0,125	0,125

Ejemplo 2 – Preparación de microesferas de buprenorfina

La formulación de microesferas de buprenorfina se puede preparar en general usando un procedimiento de emulsificación de W/O continua/extracción en solvente. En general, se proporciona una fase dispersa disolviendo un polímero en un solvente primario, tal como DCM, y un cosolvente capaz de aumentar la solubilidad de buprenorfina, tal como BzOH. Se añade después la buprenorfina a la solución de polímero y se mezcla hasta que se disuelve. La fase dispersa se filtra después usando un filtro de membrana de PTFE o PVDF esterilizante de 0,2 micrómetros (tal como EMFLON, comercialmente disponible de Pall) y se bombea en un homogenizador, tal como un homogenizador Silverson en línea (comercialmente disponible de Silverson Machines, Waterside RU), a una velocidad de flujo definida.

Simultáneamente, una fase continua que incluye una solución acuosa que contiene un tensioactivo, tal como alcohol polivinílico (PVA), también se bombea en el homogenizador a una velocidad de flujo definida. La velocidad del homogenizador en general se fija para alcanzar una distribución de tamaño de microesfera deseado. Este proceso continuo de microesferas se describe en la patente en EE UU No. 5.945.126.

Las microesferas formadas o en formación salen del homogenizador y entran en un recipiente de eliminación de solvente (SRV). Se añade agua al SRV durante la formación de las microesferas para minimizar el nivel de solvente en el medio acuoso. La suspensión resultante se mezcla en el SRV durante el periodo de formación de microesferas. Después de que la fase dispersa se haya consumido, las velocidades de flujo continuo y del agua se paran, y se inician las etapas de lavado. La eliminación del solvente se logra usando lavado con agua y un filtro de fibra hueca (comercialmente disponible como HFF de GE Healthcare). Este sistema se divulga previamente en la patente en EE UU No. 6.270.802.

Las etapas de lavado empiezan lavando la suspensión de microesferas con agua a temperatura ambiente, seguido por lavar la suspensión con agua caliente (aproximadamente 40°C) durante aproximadamente 60 minutos antes de enfriar la suspensión de nuevo a temperatura ambiente.

Las microesferas lavadas se recogen después y se liofilizan durante la noche en un liofilizador (Virtis) para eliminar toda la humedad. Las microesferas resultantes son un polvo a granel blanquecino de flujo libre.

En uso, las microesferas se pueden suspender en un diluyente para la administración (inyección). El diluyente puede en general contener un agente espesante, un agente de tonicidad, y un tensioactivo. El agente espesante puede incluir carboximetilcelulosa sódica (CMC-Na) u otros compuestos adecuados. Se pueden seleccionar un grado de viscosidad apropiado y una concentración adecuada de CMC-Na de modo que la viscosidad del diluyente sea 3 cps o mayor. En general, una viscosidad de aproximadamente 10 cps es adecuada, sin embargo, un diluyente de mayor viscosidad puede ser preferido para microesferas mayores para minimizar el asentamiento de microesferas en la suspensión.

Una suspensión de microesferas uniforme sin asentamiento de partículas producirá una dosis administrada consistente durante la administración de fármaco por inyección. Para tener una tonicidad del diluyente más cercana al sistema biológico, aproximadamente 290 miliosmol (mOsm), se pueden usar solutos tal como manitol, cloruro de sodio, o cualquier otra sal aceptable. El diluyente también puede contener una sal tampón para mantener el pH de la composición. Típicamente, el pH se mantiene aproximadamente neutro (pH 7). Si la formulación de microesferas es hidrofóbica, se pueden usar tensioactivos tal como polisorbato-80 o Span para proporcionar humectabilidad de la formulación de microesferas. En una forma de realización, se pueden usar pequeñas cantidades del tensioactivo, aproximadamente 1 mg/ml, para proporcionar suficiente humectabilidad de las microesferas.

En una realización, el diluyente se puede proporcionar en un vial separado si el vial de la formulación de microesferas contiene solo microesferas. En aún otra forma de realización, los componentes del diluyente se pueden proporcionar junto con la microesfera. Para este tipo de configuración de embalaje, se puede usar agua estéril para inyección como el líquido de reconstitución.

Ejemplo 3 – Efecto de cosolventes

En general, el solvente en la fase dispersa se tiene que extraer para formar microesferas. Sin el uso del cosolvente, la cantidad de DCM requerida para mantener la buprenorfina solubilizada es muy alta, especialmente para alcanzar microesferas de alta carga objetivo. Por tanto, la cantidad de fase continua requerida será muy alta, comparada con una formación de microesferas hecha con un cosolvente. Por ejemplo, como se ha discutido anteriormente, la solubilidad de buprenorfina en diclorometano es 0,022 g/g. Usando una mezcla 2:1 de DCM:BzOH, la solubilidad de buprenorfina aumentó aproximadamente 6 veces a 0,125 g/g. Por tanto, la incorporación de un cosolvente reduce la cantidad de fase continua necesaria en aproximadamente 6 veces y permite que se produzcan tamaños de lote mayores al tiempo que se mantienen los volúmenes de las fases continua y dispersa más bajos.

En este ejemplo se prepararon dos lotes de microesferas. Para el primer lote, se preparó una solución de polímero al 9,1% en peso disolviendo 2,5 g de un polímero de PLGA 50:50 (comercialmente disponible como RG503H de Evonik, con una viscosidad inherente de 0,34 dl/g) en 25,0 g de una mezcla 2:1 de DCM (comercialmente disponible de Spectrum Chemicals) y BzOH (comercialmente disponible de J.T. Baker). A continuación, se añadieron 2,5 g de buprenorfina (forma base del alcaloide comercialmente disponible de Johnson Matthey Deptford, Nueva Jersey) a la solución de polímero y se disolvió para obtener la fase dispersa.

Para el segundo lote, se preparó una solución de polímero al 2,0% en peso disolviendo 2,5 g de PLGA 50:50 (comercialmente disponible como RG503H de Evonik, con una viscosidad inherente de 0,34 dl/g) en 120,0 g de DCM. A continuación, 2,5 g de buprenorfina se disolvieron en la solución de polímero para obtener la fase dispersa.

Para cada lote, se preparó una solución de alcohol polivinílico (PVA) al 0,35% en peso para la fase continua, añadiendo PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la fase continua por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore, comercialmente disponible de Millipore).

Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. La velocidad del homogenizador se ajustó a 2000 rpm para el primer lote, mientras que se usó 1500 rpm para el segundo lote. El cambio en las velocidades del homogenizador era necesario debido a la diferencia en las viscosidades de las dos fases dispersas. Para lograr solubilidad, se requirió mucho más solvente para el segundo lote, aproximadamente 120,0 g de DCM, comparado con el primer lote, aproximadamente 25,0 g de DCM/BzOH, haciendo de esta manera la viscosidad del segundo lote menor que la del primero. Puesto que la viscosidad de la fase dispersa afectará al tamaño final y distribución de tamaño de la microesfera, se utilizó una mayor velocidad del homogenizador para el primer lote en un intento para mantener tamaños similares de partículas.

Las microesferas formadas o en formación de ambos lotes salieron del homogenizador y entraron en un vaso de vidrio a una velocidad de 2,0 litros por minuto. Además, se añadió agua al vaso de vidrio a una velocidad de 2,0 litros por minuto durante la formación de las microesferas. Los lotes se mezclaron en el vaso durante el periodo de formación de las microesferas. Después de que las fases dispersas de cada lote se agotaran, las velocidades de flujo de la fase continua y el agua se pararon.

Para el primer lote, el vaso de vidrio también fue el recipiente de eliminación del solvente, y las etapas de lavado se iniciaron. Para el segundo lote, se fabricó un gran volumen de suspensión; por tanto, fue necesario concentrar la suspensión en un recipiente de eliminación de solvente menor antes de que se iniciaran las etapas de lavado. Esto se

logró usando un filtro de fibra hueca (comercialmente disponible como HFF de GE Healthcare). Se redujeron 15 litros de suspensión a 4 litros mediante este procedimiento.

5 Los parámetros de preparación de las microesferas de buprenorfina, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

Parámetros	Número de lote		
	1	2	
Buprenorfina	Base libre	Base libre	
Solvente 1 de fase dispersa	DCM	DCM	
Solvente 2 de fase dispersa	BzOH	Ninguno	
Proporción de cosolvente (DCM:BzOH)	2:1	N/A	
Velocidad de mezclador (rpm)	2000	1500	
Carga objetivo de fármaco (% en peso)	50	50	
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)	25	25	
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)	2000	2000	
Velocidad de dilución de agua (ml/min)	2000	2000	
Carga de fármaco (% en peso)	46,9	48,6	
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)	94	97	
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	13,0	21,1
	25% CVF	23,2	32,1
	50% CVF	33,4	45,9
	75% CVF	44,3	62,6
	90% CVF	56,7	83,1

10 El uso de un único solvente o cosolvente tuvo poco efecto sobre la carga de fármaco de las microesferas preparadas, con ambos lotes alcanzando una alta eficacia de encapsulación. El lote preparado con DCM solo tuvo un tamaño de partícula medio ligeramente mayor debido a la menor velocidad de mezclado de 1500 rpm. Notablemente, la principal diferencia entre usar un cosolvente tal como alcohol bencílico fue la mejora en fabricación y escalabilidad. El primer lote requirió bastante menos solventes en la fase dispersa y por consiguiente mucha menos solución de fase continua y menos tiempo para la fabricación. Además, las microesferas producidas con DCM solo mostraron una velocidad de liberación in vitro menor comparadas con las microesferas preparadas con el sistema de cosolvente DCM/BzOH, como se muestra en la **figura 1**.

Ejemplo 4 – Buprenorfina base libre frente a buprenorfina HCL

20 La buprenorfina puede existir en una forma de base libre (es decir, alcaloide) o como forma de sal (ejemplo, sal clorhidrato). La selección del fármaco buprenorfina como forma de base libre o como forma de sal afecta la encapsulación del fármaco y la duración de liberación del fármaco. El clorhidrato de buprenorfina es más soluble en agua, por tanto, la encapsulación por emulsificación de O/W podría ser desafiante especialmente con carga objetivo de fármaco alta. Al seleccionar un sistema solvente apropiado, se produjeron microesferas de clorhidrato de buprenorfina con carga de fármaco del 19% y eficacia de encapsulación del 76% como se muestra en este ejemplo. La buprenorfina base libre tiene menos solubilidad en agua y se lograron microesferas con carga de fármaco tan alta como el 47% con eficacia de encapsulación de fármaco del 94%.

30 En este ejemplo, se encapsuló buprenorfina en microesferas de PLGA tanto en la forma de base libre como de sal. En el primer y segundo lotes, se preparó una solución de polímero al 20% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG502H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,19 dl/g) en 15,0 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. Para el primer lote, se disolvieron 1,25 g de la forma sal de buprenorfina en la solución de polímero para formar la fase dispersa. Para el segundo lote, se disolvieron 1,25 g de la forma libre de buprenorfina en la solución de polímero para formar la fase dispersa.

40 Para cada lote, se preparó una fase continua de alcohol polivinílico (PVA) al 0,35% en peso añadiendo PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la mezcla por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore, comercialmente disponible de Millipore). Los lotes de microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para estos dos lotes se dan en la tabla 3, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 3

Número de lote		1	2
Buprenorfina		Forma sal (HCL)	Base libre
Velocidad de mezclador (rpm)		2000	2000
Carga objetivo de fármaco (% en peso)		25	25
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)		25	25
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)		2000	2000
Velocidad de dilución de agua (ml/min)		2000	2000
Carga de fármaco (% en peso)		19	23
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)		76	92
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	19,1	9,5
	25% CVF	34,0	26,7
	50% CVF	55,5	47,4
	75% CVF	77,7	63,4
	90% CVF	102,3	78,3

5 Como se muestra en la tabla 3, la carga de fármaco final para el lote preparado con la forma sal era ligeramente menor que el preparado a partir de la base libre. Además, su tamaño de partícula era ligeramente mayor.

10 La farmacocinética de una única administración en ratas (3 mg de buprenorfina/kg para buprenorfina-HCL y 15 mg de buprenorfina/kg para buprenorfina base libre) se midió usando las microesferas en el ejemplo 3. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS). Como se muestra en la **figura 2**, los niveles en plasma para el lote preparado con la forma de base libre tuvieron una duración mucho más larga que el preparado con la forma sal, usando la misma matriz de polímero, y cargas de fármaco similares. La liberación rápida para ambos lotes fue similar.

15 Ejemplo 5: Efecto de la carga objetivo

15 Se encapsuló buprenorfina (forma de base libre) en microesferas de PLGA usando cargas objetivo de fármaco variables. Para el primer lote con carga objetivo de fármaco del 25% en peso, se preparó una solución de polímero al 17,6% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG503H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,34 dl/g) en 17,5 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

20 Para el segundo lote con carga objetivo de fármaco del 50% en peso, se preparó una solución de polímero al 9,1% en peso disolviendo 2,5 g de PLGA 50:50 (RG503H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,34 dl/g) en 25,0 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 2,5 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para obtener la fase dispersa.

25 Para cada lote, se prepara una fase continua (FC) de PVA al 0,35% añadiendo PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la fase continua por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore de Millipore). Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para los dos lotes se dan en la tabla 4, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 4

Número de lote		1	2
Buprenorfina		Base libre	Base libre
Velocidad de mezclador (rpm)		2500	2000
Carga objetivo de fármaco (% en peso)		25	50
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)		25	25
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)		2000	2000
Velocidad de dilución de agua (ml/min)		2000	2000
Carga de fármaco (% en peso)		23,8	46,9
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)		95	94
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	16,7	13,0
	25% CVF	34,4	23,2
	50% CVF	56,3	33,4
	75% CVF	82,4	44,3
	90% CVF	143,3	56,7

Las cargas de fármacos finales de los dos lotes (23,8% en peso para la carga objetivo del 25% en peso y 46,9% para la carga objetivo del 50% en peso) mostraron una alta tasa de eficacia de encapsulación (es decir, > 94%). El tamaño y la distribución de tamaño del lote preparado con una alta carga objetivo fueron menores que el formulado con la carga objetivo menor. Esto es debido a la menor viscosidad de la fase dispersa cuando se usa una concentración de polímero menor. Para disolver la mayor cantidad de buprenorfina en la formulación de mayor carga objetivo, fue necesario aumentar la cantidad de solventes usados.

La farmacocinética de una única administración de ambas formulaciones en ratas (15 mg de buprenorfina/kg) se midió usando las microesferas preparadas. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por LC-MS. Como se muestra en la **figura 3**, ambas formulaciones de microesferas mostraron duraciones de liberación similares de 50 a 60 días. Las microesferas con una carga de fármaco mayor, número de lote 2, mostraron liberación continua después de una liberación rápida moderada, mientras que las microesferas con la menor carga de fármaco, número de lote 1, mostraron una liberación rápida inicial seguida por una liberación de fase de degradación del polímero distinta con liberación máxima a aproximadamente 35 días. Además, los niveles de plasma para el lote 2 liberaron sustancialmente toda la buprenorfina durante un periodo de más de un mes, pero menos de dos meses. Se considera que la buprenorfina está "sustancialmente liberada" cuando la formulación ya no es capaz de producir niveles terapéuticos de fármaco en el paciente.

Ejemplo 6: Efecto del peso molecular del polímero (viscosidad inherente)

Se encapsuló buprenorfina (forma de base libre) en microesferas de PLGA usando polímeros con pesos moleculares variables. El peso molecular del polímero se puede describir mediante su viscosidad inherente (η_{inh} dl/g). Para preparar un primer lote con un menor peso molecular de polímero, se preparó una solución de polímero al 20% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG502H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,19 dl/g) en 15 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

Para preparar el segundo lote con un mayor peso molecular de polímero, se preparó una solución de polímero al 17,6% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG503H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,34 dl/g) en 17,5 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para obtener la fase dispersa.

Para cada lote, se preparó una fase continua de PVA al 0,35% añadiendo el PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la solución por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 μ m (tal como una membrana Durapore de Millipore). Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para estos dos lotes se dan en la tabla 5, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 5

Número de lote		1	2
Buprenorfina		Base libre	Base libre
η_{inh} del polímero (dl/g)		0,19	0,34
Velocidad de mezclador (rpm)		2000	2500
Carga objetivo de fármaco (% en peso)		25	25
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)		25	25
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)		2000	2000
Velocidad de dilución de agua (ml/min)		2000	2000
Carga de fármaco (% en peso)		23,1	23,8
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)		92,4	95,2
Tamaño de partícula (μ m)	10% CVF	9,5	16,7
	25% CVF	26,7	34,4
	50% CVF	47,4	56,3
	75% CVF	63,4	82,4
	90% CVF	78,3	143,3

Las cargas de fármaco finales de los dos lotes fueron similares y mostraron una alta tasa de eficacia de encapsulación (es decir, > 92%). El tamaño de partícula del lote preparado con una mayor viscosidad inherente de polímero fue mayor que la formulada con la menor viscosidad inherente de polímero, incluso con una velocidad de emulsificación ligeramente más rápida. Esto puede ser porque la fase dispersa del lote preparado con el mayor peso molecular de polímero tuvo una mayor viscosidad que el lote preparado con el polímero de menor peso molecular.

La farmacocinética de una única administración de ambas formulaciones en ratas (15 mg de buprenorfina/kg) se midió usando las microesferas preparadas. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por LC-MS. La **figura 4** muestra los niveles de buprenorfina en plasma de dos lotes diferentes de microesferas preparadas.

5 Como se muestra en la **figura 4**, el peso molecular del polímero influyó en la velocidad de liberación rápida inicial y duración de liberación. La liberación rápida inicial del lote preparado con el PLGA de menor peso molecular fue mayor, lote 1, aproximadamente 21 ng/ml comparado con 11 ng/ml para el lote 2, y la duración de la liberación de buprenorfina aumentó desde aproximadamente 30 días hasta aproximadamente 50 días cuando se utilizó el polímero de mayor peso molecular.

10 Ejemplo 7: PLGA 50:50 con grupo ácido final frente a extremo protegido

15 Se encapsuló buprenorfina (forma de base libre) en dos lotes de microesferas usando polímeros con variaciones en la protección del extremo de las cadenas de polímero. Los polímeros PLGA pueden estar no protegidos en el extremo con un grupo terminal ácido carboxílico libre, o tener el extremo protegido, por esterificación. Para pesos moleculares de polímero similares, los polímeros con extremo no protegido con ácido carboxílico son más hidrofílicos y por tanto permiten la penetración de agua y que se produzca la hidrólisis y degradación final más rápido comparado con los polímeros más hidrofóbicos.

20 Usando polímeros PLGA 50:50 con pesos moleculares similares, se prepararon microesferas usando polímeros tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Para el primer lote, usando el polímero hidrofílico, se preparó una solución de polímero al 20% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG502H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente = 0,19 dl/g) en 15,0 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

25 A continuación, para el segundo lote que incluye el polímero hidrofóbico, se preparó una solución de polímero al 13% en peso disolviendo 3,0 g de PLGA 50:50 (RG502S, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,20 dl/g) en 20,0 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 2,0 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para obtener la fase dispersa.

30 Para cada lote, se preparó una fase continua de PVA al 0,35% añadiendo PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la solución por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore de Millipore). Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para estos dos lotes se dan en la tabla 5, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 6

Número de lote	1	2	
Buprenorfina	Base libre	Base libre	
Protección del extremo del polímero	Grupo final ácido (hidrofílico)	Extremo bloqueado (hidrofóbico)	
Velocidad de mezclador (rpm)	2000	2000	
Carga objetivo de fármaco (% en peso)	25	40	
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)	25	25	
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)	2000	2000	
Velocidad de dilución de agua (ml/min)	2000	2000	
Carga de fármaco (% en peso)	23,1	37,8	
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)	92,4	94,5	
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	9,5	14,2
	25% CVF	26,7	25,8
	50% CVF	47,4	37,6
	75% CVF	63,4	49,5
	90% CVF	78,3	62,9

40 Aunque la carga objetivo era diferente para los lotes, ambas formulaciones mostraron un alto nivel de eficacia de encapsulación de buprenorfina (es decir, > 92%). Además, el tamaño y la distribución de tamaño de los lotes eran similares.

45 La farmacocinética de una única administración de ambas formulaciones en ratas (15 mg de buprenorfina/kg) se midió usando las microesferas preparadas. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por LC-MS. La **figura 5** muestra los niveles de buprenorfina en plasma de los dos lotes diferentes de microesferas preparadas.

5 Como se muestra en la **figura 5**, es evidente que el lote de microesferas preparado con el polímero hidrofílico mostró una liberación rápida mucho mayor, aproximadamente 21 ng/ml, comparado con el preparado con el polímero hidrofóbico, aproximadamente 8 ng/ml. Esto se produjo incluso aunque la carga de fármaco del lote de polímero hidrofóbico era mucho mayor (37,8% en peso) comparado con el lote de polímero hidrofílico (23,1% en peso). Además, la buprenorfina se liberaba sustancialmente del lote preparado con el polímero hidrofílico, lote 1, en menos de un mes, comparado con más de dos meses, pero menos de tres meses, para el polímero hidrofóbico, lote 2.

Ejemplo 8: Formulaciones de microesferas de liberación de larga duración

10 Se puede desear la liberación extendida de buprenorfina durante seis meses a un año para ciertas indicaciones. La duración de la liberación de buprenorfina se puede controlar principalmente mediante el polímero de encapsulación. Para la familia de polímero de PGLA, los hechos con una mayor proporción de ácido láctico comparado con ácido glicólico proporcionarán liberación más larga (para el mismo peso molecular). Además, los polímeros sintetizados de ácido poliláctico solo (PLA) proporcionan las duraciones de liberación más largas. Se prepararon microesferas de buprenorfina con PLGA que tenía un alto nivel de contenido de ácido poliláctico (es decir, el 85 y 100%).

20 Para el primer lote, se preparó una solución de polímero al 8,3% en peso disolviendo 2,5 g de PLGA 85:15 (RG85:15S, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,54 dl/g) en 27,5 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 2,5 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

25 Para el segundo lote, se preparó una solución de polímero al 7,7% en peso disolviendo 2,5 g de PLA 100:0 (R202H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,20 dl/g) en 30 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 2,5 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para completar la fase dispersa.

30 Para el tercer lote, se preparó una solución de polímero al 7,7% en peso disolviendo 2,5 g de PLA 100:0 (R203H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,33 dl/g) en 30 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 2,5 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para completar la fase dispersa.

35 Para cada lote, se preparó una fase continua de PVA al 0,35% añadiendo el PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la solución por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore de Millipore). Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para estos lotes se dan en la tabla 7, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 7

Número de lote	1	2	3	
Buprenorfina	Base libre	Base libre	Base libre	
Proporción de comonomeros	85:15	100:0	100:0	
Protección del extremo del polímero	Extremo bloqueado (hidrofóbico)	Extremo ácido (hidrofílico)	Extremo ácido (hidrofílico)	
η_{inh} del polímero (dl/g)	0,54	0,20	0,33	
Velocidad de mezclador (rpm)	2500	2500	2000	
Carga objetivo de fármaco (% en peso)	50	50	50	
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)	25	25	25	
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)	2000	2000	2000	
Velocidad de dilución de agua (l/min)	2	2	2	
Carga de fármaco (% en peso)	45,4	46,8	46,0	
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)	90,8	93,0	92,0	
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	9,8	6,5	12,4
	25% CVF	19,4	13,1	21,5
	50% CVF	29,9	20,3	31,3
	75% CVF	46,2	27,1	41,9
	90% CVF	108,1	33,5	53,2

40 Las eficacias de encapsulación para todos los lotes fueron mayores del 91%. El tamaño de partícula del primer lote preparado con el polímero PGLA 85:15 fue mayor debido al mayor peso molecular del polímero resultante de la fase dispersa de alta viscosidad.

La farmacocinética de una única administración de ambas formulaciones en ratas (100 mg de buprenorfina/kg) se midió usando las microesferas preparadas. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por LC-MS. La **figura 6** muestra los niveles de buprenorfina en plasma de los tres lotes diferentes de microesferas preparadas. En estos lotes, la buprenorfina se liberó sustancialmente durante un periodo de más de tres meses, pero menos de nueve meses. Además, después del periodo de liberación rápida, el nivel de buprenorfina fue constante durante el perfil de liberación.

Ejemplo 9: Efecto de la proporción de comonómeros

La proporción de comonómeros también afecta a la velocidad de liberación para buprenorfina encapsulada. Para la familia de polímeros PLGA, esos con una mayor proporción de ácido láctico comparados con ácido glicólico proporcionaron liberación más larga (para el mismo peso molecular).

Se prepararon dos lotes de microesferas usando PLGA con proporciones de comonómeros de 50:50 y 75:25, pero que tienen pesos moleculares similares. Para el primer lote usando una proporción de comonómeros de PLGA 50:50, se preparó una solución de polímero al 20% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 50:50 (RG502H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,19 dl/g) en 15,0 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

Para el segundo lote usando una proporción de comonómeros de PLGA 75:25, se preparó una solución de polímero al 13% en peso disolviendo 3,75 g de PLGA 75:25 (RG752H, comercialmente disponible de Evonik con una viscosidad inherente de 0,18 dl/g) en 25 g de una mezcla 2:1 de DCM y BzOH. A continuación, se añadieron 1,25 g de buprenorfina a la solución de polímero y se disolvieron para formar la fase dispersa.

Para cada lote, se preparó una fase continua de PVA al 0,35% añadiendo PVA a agua a temperatura ambiente y calentando y mezclando la solución por encima de 70°C durante una hora. Después de enfriar la fase continua, se filtró usando un filtro de PVDF hidrofílico de 0,2 µm (tal como una membrana Durapore de Millipore). Las microesferas se prepararon usando el método general previamente descrito en el ejemplo 2. Los parámetros de proceso para estos dos lotes se dan en la tabla 8, así como la carga de fármaco medida y la distribución de tamaño de las microesferas secas.

Tabla 8

Número de lote	1	2
Buprenorfina	Base libre	Base libre
Proporción de comonómeros del polímero	50:50	75:25
Viscosidad inherente, dl/g	0,17	0,18
Velocidad de mezclador (rpm)	2000	2400
Carga objetivo de fármaco (% en peso)	25	25
Velocidad de flujo de la fase dispersa (ml/min)	25	25
Velocidad de flujo de la fase continua (ml/min)	2000	2000
Velocidad de dilución de agua (ml/min)	2000	2000
Carga de fármaco (% en peso)	23,1	23,5
Eficacia de encapsulación de fármaco (%)	92,4	94,0
Tamaño de partícula (µm)	10% CVF	9,5
	25% CVF	26,7
	50% CVF	47,4
	75% CVF	63,4
	90% CVF	78,3

Ambos lotes mostraron cargas de fármaco similares, con un alto nivel de eficacia de encapsulación (es decir, > 92%). La formulación de PLGA 50:50 produjo un tamaño de partícula mayor debido a la mayor concentración de polímero, que produce una fase dispersa de mayor viscosidad.

La farmacocinética de una única administración de ambas formulaciones en ratas (15 mg de buprenorfina/kg para el PLGA 50:50 y 50 mg de buprenorfina/kg para el PLGA 75:25) se midió usando las microesferas preparadas. Las concentraciones de buprenorfina en plasma se midieron por LC-MS. La **figura 7** muestra los niveles de buprenorfina en plasma de los dos lotes diferentes de microesferas preparadas.

Como se muestra en la **figura 7**, aunque el lote preparado con el polímero PLGA 75:25, lote 2, produjo una liberación rápida mayor (principalmente debido a la mayor dosis administrada), la duración de la liberación de buprenorfina fue mucho mayor y no estaba completa el día 42 y todavía se mantuvo a un nivel alto. Por otra parte, la formulación de PLGA 50:50, lote 1, se agotó el día 30.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un método de hacer una formulación de microesferas de liberación sostenida que tiene una alta carga de fármaco buprenorfina, que comprende:
- 10
- (a) proporcionar una fase dispersa mezclando un polímero de encapsulación, un solvente primario, una cantidad farmacéuticamente eficaz de buprenorfina que tiene una solubilidad relativa a la fase dispersa, y un cosolvente capaz de aumentar la solubilidad de la buprenorfina relativa a la fase dispersa; en donde el solvente primario y el cosolvente en la fase dispersa están presentes en una proporción de 2:1 y en donde el solvente primario es diclorometano y el cosolvente es alcohol bencílico;
- (b) proporcionar una fase continua que comprende una solución acuosa;
- (c) mezclar la fase dispersa con la fase continua; y
- (d) preparar una formulación de microesferas farmacéuticamente aceptable adecuada para administrar a un paciente.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, en donde el polímero de encapsulación se selecciona del grupo que consiste en poli (D,L-lactida-co-glicolida) y poli (L-lactida) y la fase continua comprende una solución acuosa de agua y alcohol polivinílico.
- 20
3. El método de la reivindicación 1, en donde la buprenorfina puede comprender una forma de base libre de buprenorfina, una forma de sal de buprenorfina, o una mezcla farmacéuticamente aceptable de las mismas.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la carga de fármaco de buprenorfina de la formulación de microesferas es del 15% en peso de las microesferas hasta el 55% en peso de las microesferas.
- 25
5. El método de la reivindicación 1, en donde la solubilidad aumentada de la buprenorfina relativa a la fase dispersa es de 0,02 g/g a 0,3 g/g.
- 30
6. El método de la reivindicación 2, en donde el polímero de encapsulación es poli (D,L-lactida-co-glicolida) y tiene un viscosidad inherente de 0,16 a 0,54 η_{inh} dl/g.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de microesferas tiene un tamaño medio de partícula de 20 μm a 60 μm .
- 35
8. El método de la reivindicación 1, en donde el alcohol bencílico presente en la fase dispersa aumenta la solubilidad de buprenorfina en seis veces.

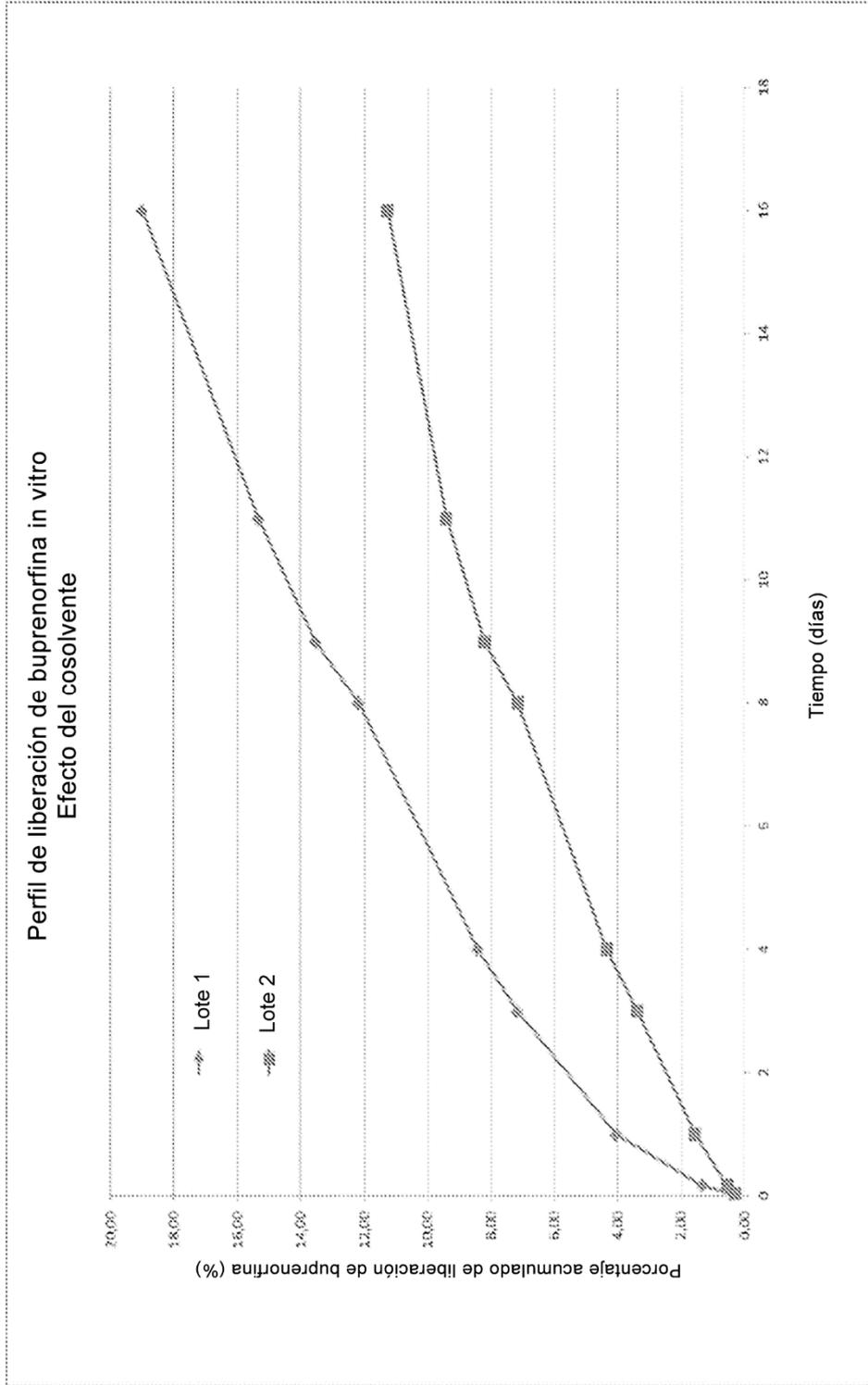


Figura 1

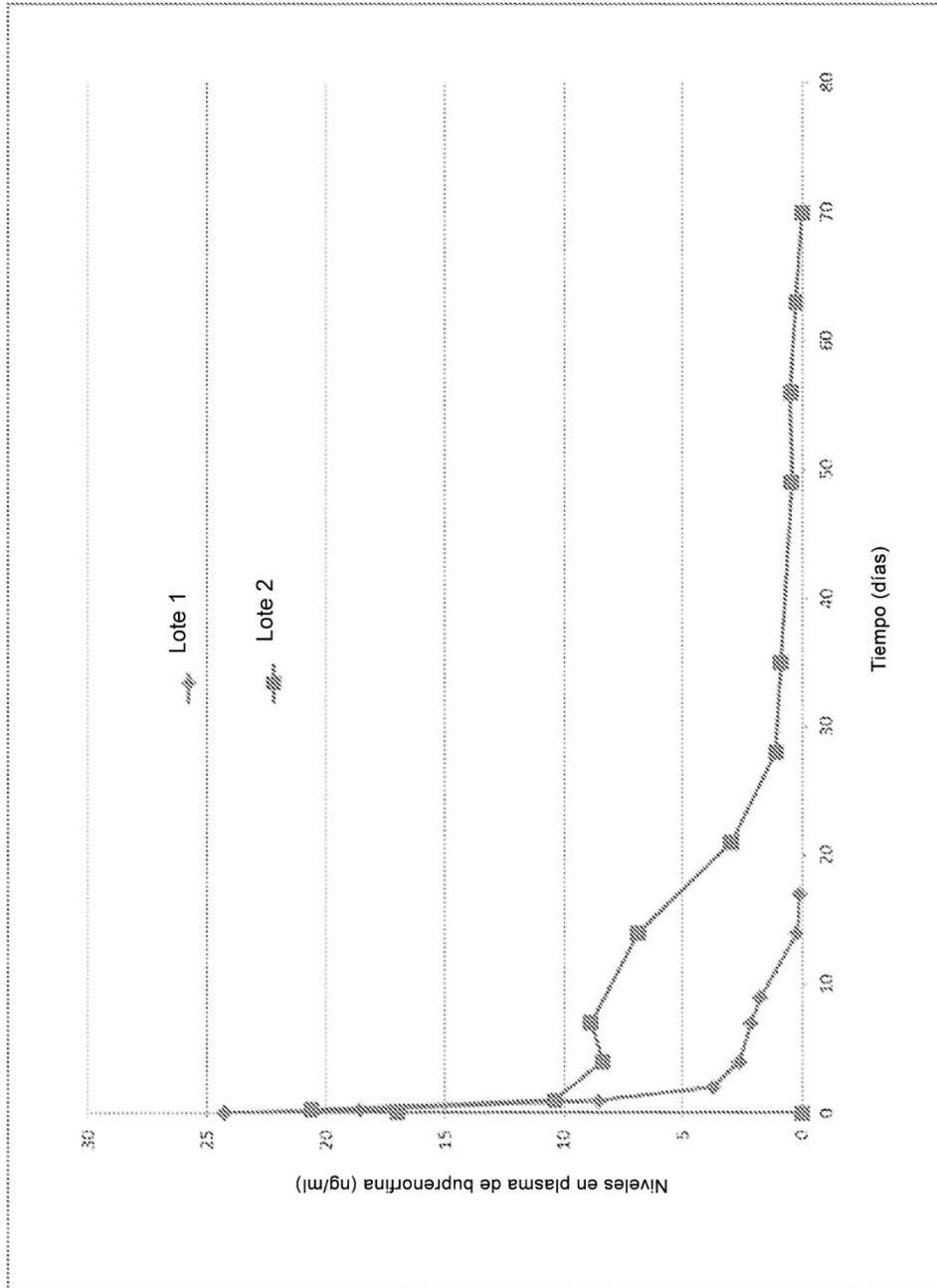


Figura 2

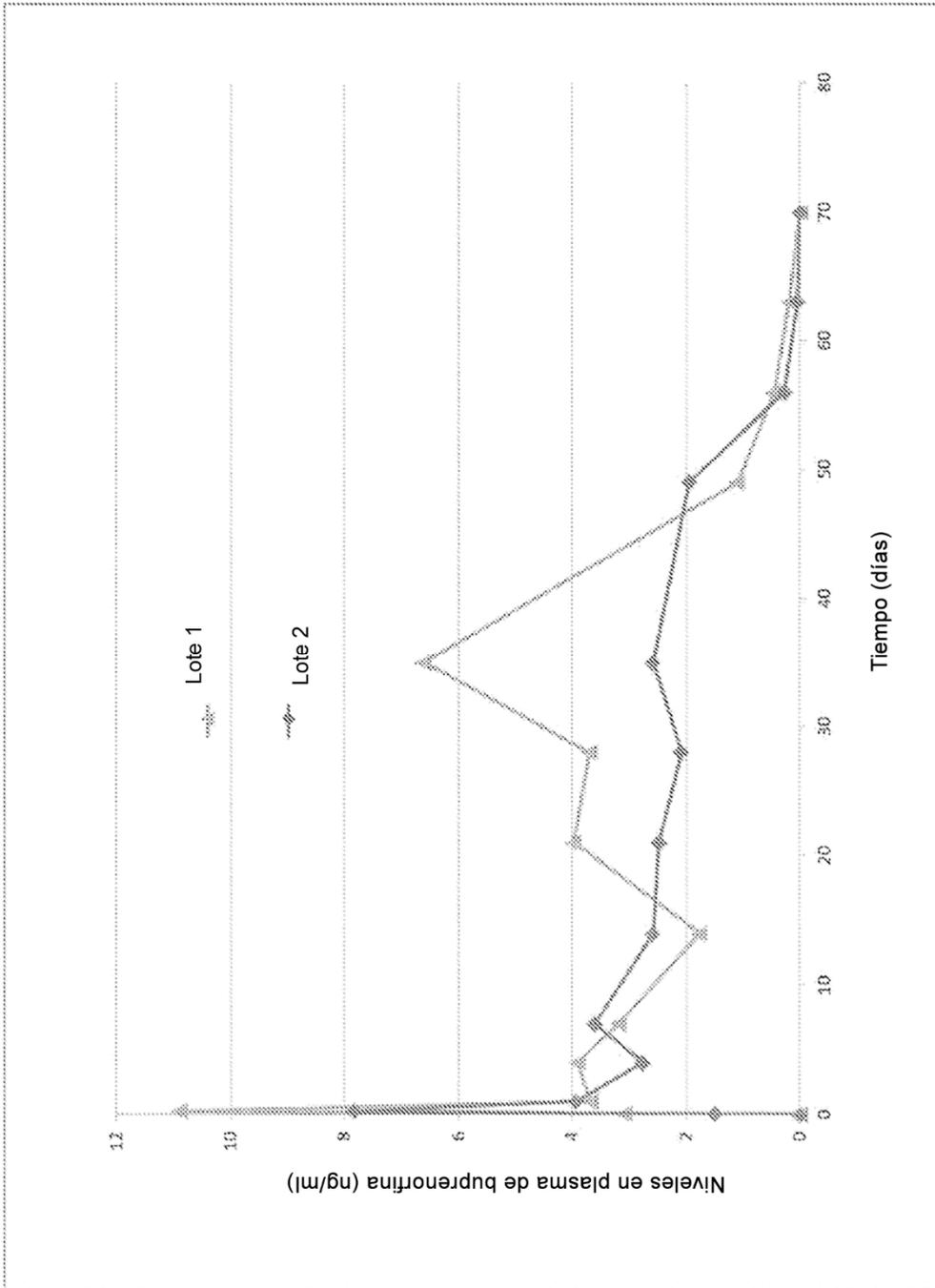


Figura 3

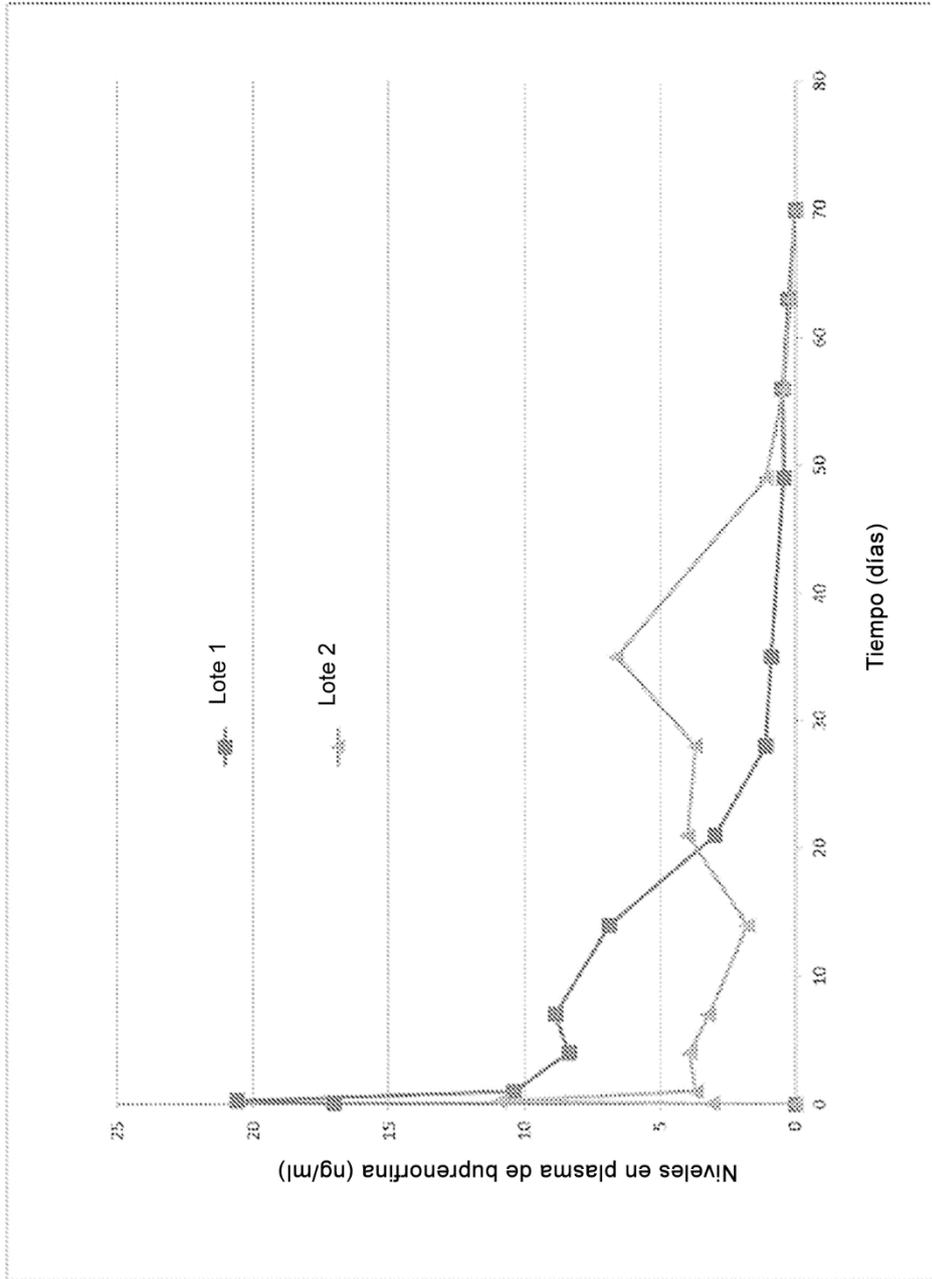


Figura 4

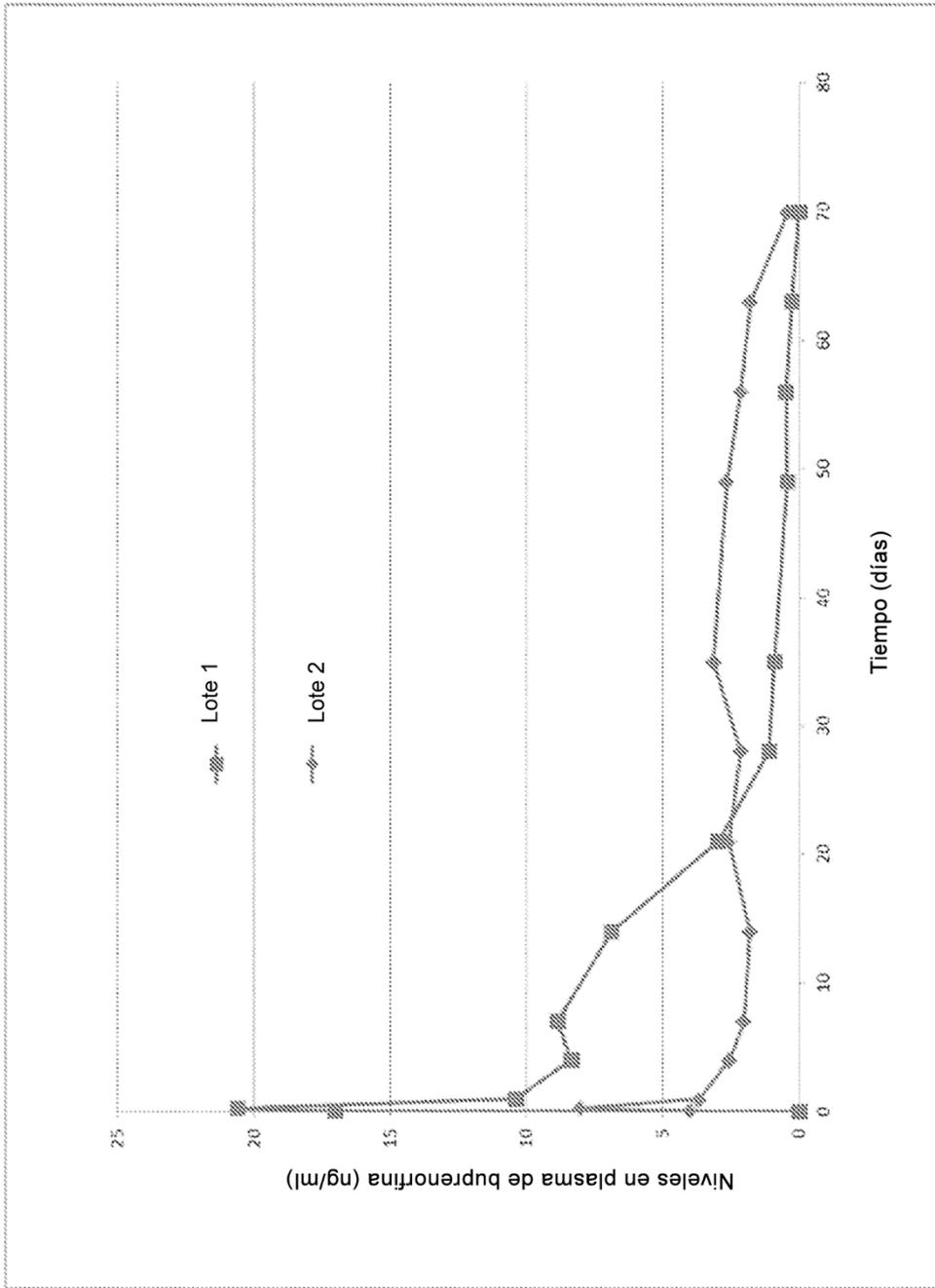


Figura 5

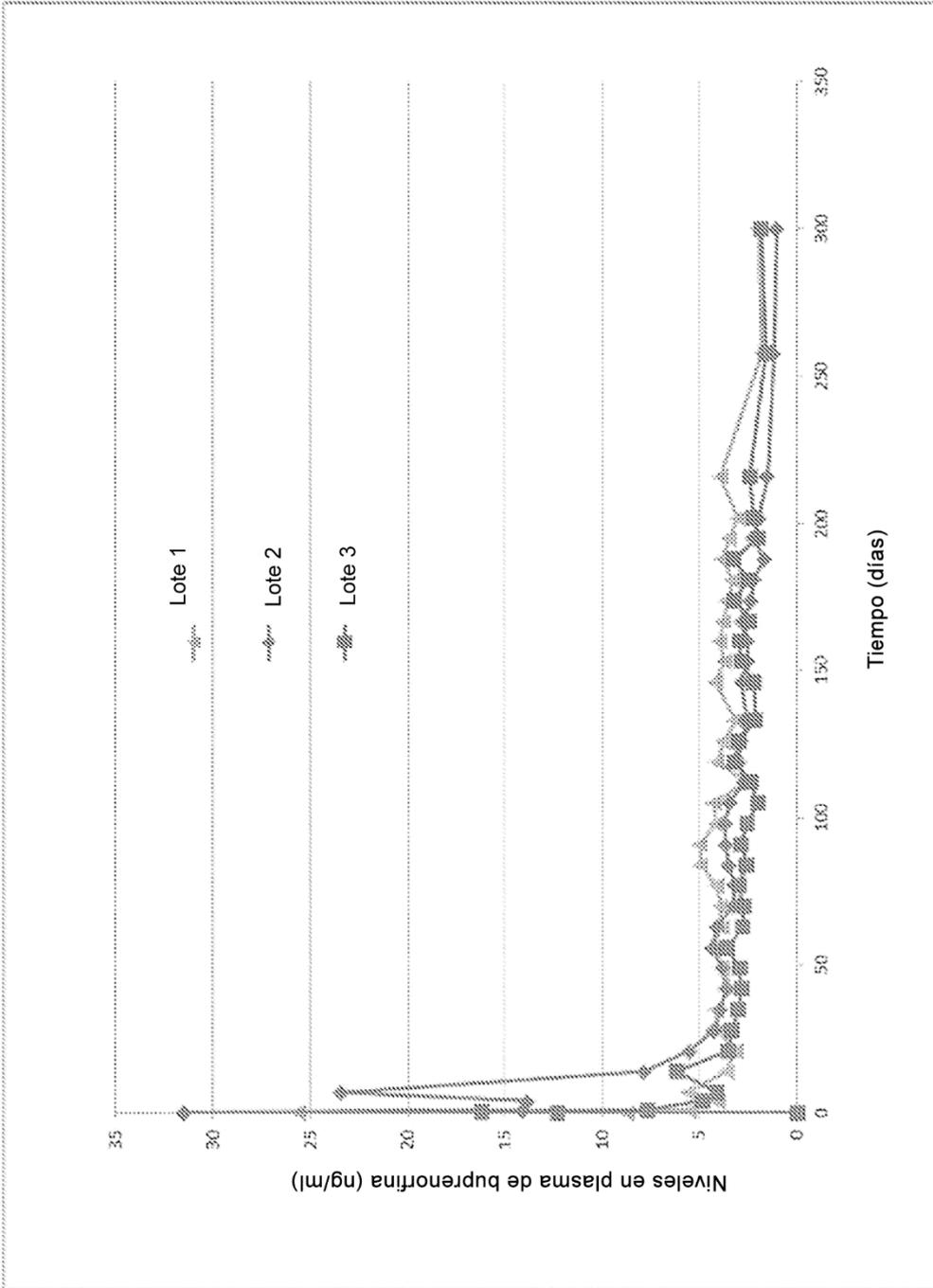


Figura 6

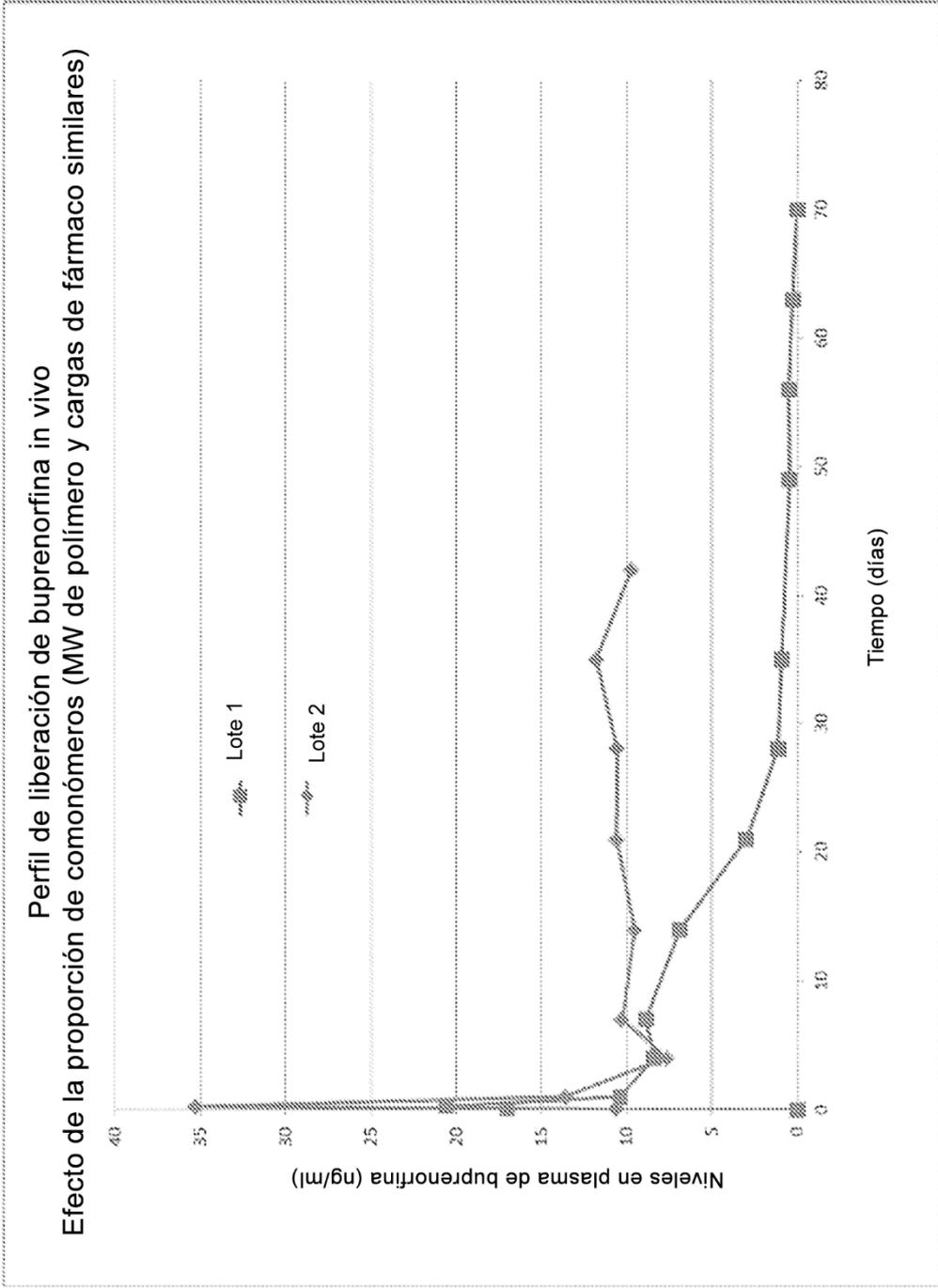


Figura 7