

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 402**

51 Int. Cl.:

**B01J 13/06** (2006.01)

**B01J 20/24** (2006.01)

**B01J 20/30** (2006.01)

**B01D 15/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2010 PCT/SE2010/050152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10090594**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2010 E 10738824 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2393585**

54 Título: **Cubiertas de polímero**

30 Prioridad:

**09.02.2009 SE 0950061**  
**09.02.2009 US 150805 P**  
**09.02.2009 US 150806 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.10.2019**

73 Titular/es:

**CELLUTECH AB (100.0%)**  
**Teknikringen 38A**  
**114 28 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**CARRICK, CHRISTOPHER;**  
**PETTERSSON, BERT;**  
**VÅGBERG, LARS y**  
**RUDA, MARCUS**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 727 402 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

Cubiertas de polímero

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para la preparación de cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares, con propiedades permeables, sensibles, a las cubiertas de polímero como tal, así como a diversas aplicaciones que comprenden tales cubiertas de polímero dentro de los campos de administración de fármacos, técnicas de separación y material de relleno entre otros.

**Técnica anterior**

Numerosos biopolímeros presentan características atractivas para muchas aplicaciones industriales, por ejemplo, dentro de las industrias del papel y textiles, pero también dentro de las ciencias farmacéuticas y dentro de diversos tipos de procesos de separación. La celulosa y la hemicelulosa son biopolímeros ampliamente caracterizados de gran importancia, no solo como base para la fabricación de papel y textiles, sino cada vez más como vehículos de administración de fármacos, con fines biomédicos y biotecnológicos, así como componentes en fase sólida para diversas técnicas de separación cromatográfica. La celulosa hidrófila de cadena lineal posee varias propiedades interesantes para aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, ausencia de propiedades inmunoestimulantes e insusceptibilidad a la descomposición enzimática en el cuerpo humano. Además, su alta rigidez mecánica ha dado lugar al uso de celulosa como fase estacionaria para numerosas aplicaciones de separación.

Concomitante con la aparición de productos farmacéuticos desarrollados biotecnológicamente, tales como proteínas, péptidos, ARNmc, ARNmc y oligonucleótidos antisentido, para el tratamiento de diversas enfermedades, la necesidad de vehículos de administración eficaces es mayor que nunca. Además, mejorar la administración de productos farmacéuticos convencionales es en muchos casos crítico para poder aumentar la dosis, disminuir los efectos secundarios y mejorar las propiedades farmacocinéticas. La encapsulación de un fármaco de interés en una cubierta de polímero es una forma de mejorar su farmacocinética y posiblemente también sus propiedades farmacodinámicas, proporcionando por ejemplo liberación sostenida durante largos períodos de tiempo, formulaciones para administración local o protegiendo el fármaco del entorno gastrointestinal hostil o la descomposición enzimática tras por administración por vía oral.

Los procesos de separación eficaces son de vital importancia en muchas industrias, tanto con fines analíticos como preparativos. La industria química, la industria de pasta y papel, la industria petroquímica, así como las industrias médicas y farmacéuticas, entre otras, dependen en gran medida de numerosas metodologías de procesos de separación para diversos objetivos. La separación se basa a menudo en principios cromatográficos, es decir, hacer pasar la muestra que contiene analito a través de una fase sólida, estacionaria, con el fin de separar los componentes de la muestra. La fase estacionaria se compone a menudo de un material polimérico que presenta determinadas propiedades que forman la base de la separación, por ejemplo hidrofobicidad, tamaño o carga iónica. La fase sólida estacionaria necesita además presentar excelentes características en cuanto a, por ejemplo, resistencia mecánica, inercia química y tamaño uniforme, con el fin de hacer la separación fiable y reproducible. Las cubiertas de polímero se usan cada vez más como materiales de fase sólida, ya que presentan muchas de las características mencionadas anteriormente, así como la propiedad muy deseada de ser capaces de funcionar como membrana con permeabilidad selectiva para liberación y captación de diversas moléculas.

Las fibras de polímero para diversos fines se han producido durante mucho tiempo usando numerosas técnicas, pero la preparación de cubiertas, partículas sustancialmente esféricas huecas, es todavía un procedimiento complicado. Las fibras de celulosa en forma de viscosa se han hilado, por ejemplo, durante casi una década pero una producción de cubiertas similar de modo rápido y fiable presenta de manera natural problemas significativamente más complejos. La hilatura de fibras se basa normalmente en aplicar una presión sobre un material polimérico disuelto y por consiguiente, forzarlo fuera de una boquilla y al interior de un baño donde se forman las fibras, como resultado de diversas interacciones químicas. Este enfoque aún no es posible para la producción de cubiertas de polímero, dado que esto requeriría que la luz de las fibras se dividiese sistemáticamente. En la actualidad, las cubiertas de polímero basadas en celulosa se preparan normalmente en emulsiones usando métodos que se basan en la evaporación y difusión de disolvente, un proceso ineficaz y hasta cierto punto, lento, que requiere la presencia de coexcipientes adicionales, tales como polietilenglicol, ftalato de dibutilo y policaprolactona. También se producen perlas huecas compuestas de celulosa modificada basadas en adición gota a gota a baños de precipitación que contienen iones metálicos, lo que da como resultado posterior precipitación de sales metálicas de polímero. Este método, sin embargo, requiere que las perlas se curen en un baño de curado que contiene iones metálicos adicionales. Desde una perspectiva de administración de fármacos, la presencia notable de iones metálicos puede ser un aspecto limitativo, lo que da como resultado posiblemente reacciones alérgicas e interacciones *in vivo* no deseadas. Además, utilizar tales cubiertas para fines cromatográficos puede limitar la aplicabilidad sólo a determinados tipos de separación, por ejemplo basándose en propiedades de carga iónica.

Las cubiertas de polímero basadas en celulosa descritas en la técnica anterior se refieren a cubiertas no sensibles

que presentan esencialmente características idénticas independientemente de las condiciones circundantes. Con el fin de preparar componentes de fase estacionaria o vehículos para la administración de fármacos eficaces de sistemas cromatográficos, es deseable utilizar cubiertas con propiedades sensibles dinámicas. La capacidad para modular, por ejemplo, la permeabilidad, el diámetro y el volumen de cubiertas de polímero, proporcionaría ventajas adicionales, por ejemplo, aumentar la liberación de una composición farmacéutica tras la exposición a determinadas condiciones externas, o modular las propiedades de una columna de cromatografía según las características de la muestra. Las cubiertas de polímero que presentan tales características faltan hasta ahora en la técnica anterior.

Por tanto, existe la necesidad en la técnica de un método de fabricación rápido, simple, versátil y robusto sin el uso de cantidades excesivas de productos químicos agresivos para la preparación de cubiertas de polímero con propiedades modificables sensibles, por ejemplo para fines de administración de fármacos o de cromatografía. Además, las cubiertas de polímero de hidrato de carbono que comprenden esencialmente sólo el hidrato de carbono en cuestión, que dan como resultado propiedades inmunoestimuladoras minimizadas y versatilidad aumentada dentro del campo de cromatografía, faltan en la técnica anterior.

La técnica anterior, documento SE 358 908, enseña la fabricación de fibras de celulosa huecas, a través de hilatura de viscosa. La invención da a conocer un baño de hilatura que contiene una alta concentración de iones de magnesio, ejerciendo un efecto reductor sobre las propiedades de hinchamiento del polímero cuando se hilan fibras de viscosa a través de boquillas en dicho baño de hilatura.

El documento US 2.773.027 da a conocer un método para preparar perlas huecas que consiste en una sal metálica de carboximetilcelulosa, para su uso como medio de diálisis. Se transfiere gota a gota una disolución acuosa de carboximetilcelulosa en un baño de precipitación que consiste en una sal metálica en una disolución acuosa, en el que las perlas de sal metálica-carboximetilcelulosa se precipitan.

Soppimath y colaboradores (Soppimath *et al.*, 2006, Journal of Applied Polymer Science, 100, 486-494) describen un método basado en la técnica de evaporación de disolvente para la preparación de microesferas huecas flotantes usando celulosa modificada. Se utilizan excipientes tales como polietilenglicol, ftalato de dibutilo y policaprolactona para la formación de las microesferas, actuando acetato de etilo como disolvente de dispersión.

Como ejemplo de una modificación eficaz de la técnica de evaporación de disolvente, Utada y colaboradores (Utada *et al.*, 2005, Science, 308, 537-541) dan a conocer un dispositivo microcapilar para generar emulsiones dobles monodispersas que contienen una única gotita interna en una geometría de cubierta del núcleo, con un alto grado de control y flexibilidad. El sistema microcapilar se emplea además para la generación de vesículas poliméricas usando una emulsión de agua en aceite en agua que comprende el copolímero de dibloque poli(acrilato de butilo)-b-poli(ácido acrílico) (PBA-PAA).

Los documentos US 4.859.711 A y US 4.782.097 A dan a conocer procesos para la preparación de microesferas huecas.

## Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es superar dichos inconvenientes y satisfacer las necesidades existentes, así como proporcionar un método simplificado para la preparación de cubiertas de polímero. La presente invención se refiere a un método para preparar cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares y que comprenden esencialmente sólo celulosa/hemicelulosa. También se dan a conocer diversas aplicaciones de tales cubiertas para fines de administración de fármacos, para una variedad de técnicas de separación analíticas y preparativas, y para varias aplicaciones tales como material de relleno y/o de acondicionamiento.

Más específicamente, el método comprende las etapas de disolver el componente de polímero en un primer disolvente, preferiblemente un disolvente orgánico y precipitar el componente de polímero poniendo en contacto la primera disolución con un segundo disolvente, segundo disolvente que tiene carácter polar, y segundo disolvente en el que el componente de polímero es esencialmente insoluble, obteniendo de ese modo cubiertas de polímero. El método permite la formación de cubiertas de polímero rápida, ampliable a escala y robusta, que comprende esencialmente sólo el polímero en cuestión, con propiedades modificables sensibles sin el uso de excipientes adicionales o baños de curado.

## Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una medición inicial del diámetro total de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de pH que oscila entre 1,5 y 13. Eje X: pH, eje Y: Diámetro total [mm], G = Grycksbo, HD = Alto Ds, LD = Bajo Ds

La figura 2 muestra una medición posterior del diámetro total de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de pH que oscila entre 1,5 y 13. Eje X: pH, eje Y: Diámetro total [mm], G = Grycksbo, HD = Alto Ds, LD = Bajo Ds

La figura 3 muestra una medición inicial del grosor de la pared de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo

de pH que oscila entre 1,5 y 13. Eje X: pH, eje Y: Grosor de la pared [mm], G = Grycksbo, HD = Alto Ds, LD = Bajo Ds

5 La figura 4 muestra una medición posterior del grosor de la pared de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de pH que oscila entre 1,5 y 13. Eje X: pH, eje Y: Grosor de la pared [mm]

La figura 5 muestra una medición inicial del diámetro total de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de concentración de sal que oscila entre 0 y 0,1 mol/l. Eje X: Conc. de sal [mol/l], eje Y: diámetro total [mm]

10 La figura 6 muestra una medición posterior del diámetro total de las cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de concentración de sal que oscila entre 0 y 0,1 mol/l. Eje X: Conc. de sal [mol/l], eje Y: diámetro total [mm]

15 La figura 7 muestra una medición inicial del grosor total de la pared en una dimensión de cubiertas de polímero a lo largo de un intervalo de concentración de sal que oscila entre 0 y 0,1 mol/l. Eje X: Conc. de sal [mol/l], eje Y: grosor de la pared [mm]

20 La figura 8 muestra un experimento de liberación de fármaco simulado, que representa la liberación de colorante a lo largo del tiempo a pH 2 en agua desionizada (concentración fuera de las perlas). Eje X: Tiempo en minutos Eje Y: concentración normalizada  $U = \text{No tratado}$ ,  $C = \text{CaCO}_3$

La figura 9 representa cámaras de reacción microfluídicas que pueden utilizarse para la presente invención; por ejemplo con los siguientes artículos presentes:

n.º	Artículo
(5)	Cámara de reacción
(10)	Tubo de inyección
(15)	Tubo colector
(20)	Fluido 1
(25)	Fluido 2
(30)	Fluido 3
T.V.	Vista superior

25 La figura 10 muestra la relación entre el grosor de la pared y el espacio dentro de las cubiertas de polímero cuando se alimenta dióxido de carbono a la disolución durante 30 minutos. Eje X: % de pasta para disolver en la disolución de celulosa. Eje Y: Constituyente de la cubierta. La barra blanca corresponde al grosor de la pared. La barra negra corresponde al espacio hueco.

30 La figura 11 representa la relación entre el grosor de la pared y el espacio dentro de las cubiertas de polímero cuando se alimenta dióxido de carbono a la disolución durante 5 minutos. Eje X: % de pasta para disolver en la disolución de celulosa. Eje Y: Constituyente de la cubierta. La barra blanca corresponde al grosor de la pared. La barra negra corresponde al espacio hueco.

35 La figura 12 muestra la relación entre la densidad ( $\text{kg/dm}^3$ ) y la concentración de polímero (% en peso) de las cubiertas de polímero. Eje X: Concentración de celulosa (% en peso) Eje Y: Densidad ( $\text{kg/dm}^3$ )

40 Las figuras 13 y 16 muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de cubiertas de celulosa al 1%, así como vistas ampliadas de las paredes de la cubierta.

Las figuras 14, 15 y 17 muestran imágenes de SEM de cubiertas de celulosa al 1,5%, así como vistas ampliadas de las paredes de la cubierta.

45 La figura 18 muestra imágenes de SEM de una cubierta de celulosa al 2%, así como vistas ampliadas de las paredes de la cubierta.

La figura 19 muestra imágenes de SEM de cubiertas secadas en microondas.

50 La figura 20 representa cámaras de reacción microfluídicas que pueden utilizarse para la presente invención, con una vista ampliada de las cubiertas de polímero; por ejemplo con los siguientes artículos presentes:

n.º	Artículo

(5)	Cámara de reacción
(10)	Tubo de inyección
(15)	Tubo colector
(35)	Flecha que indica el flujo de aceite de PDMS
(40)	Flecha que indica el flujo de agua
(45)	Flecha que indica el flujo de fluido de polímero
(50)	Agua
(55)	Polímero
(60)	Aceite de PDMS

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para preparar cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares y que comprenden esencialmente sólo preferiblemente celulosa/hemicelulosa. También se dan a conocer diversas aplicaciones de tales cubiertas de polímero para fines de administración de fármacos y para una variedad de técnicas de separación analíticas y preparativas.

10 Tal como será evidente a partir de la descripción y los ejemplos, el término “cubiertas” se refiere a cualquier estructura, con dimensiones de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 10 mm, que encierra sustancialmente cualquier espacio, que contiene o bien material gaseoso, líquido y/o sólido, y que comprende al menos un material polimérico que comprende por ejemplo un material de hidrato de carbono de unidades repetidas de polisacáridos, por ejemplo celulosa o hemicelulosa o cualquier otro polisacárido con propiedades que puede esperarse que sean similares a las propiedades de la celulosa y hemicelulosa, o quitosano, galactoglucomanano, y/o cualquier derivado de los mismos.

15 El término “espacio” se refiere a cualquier volumen definido por cualquier forma geométrica regular o irregular, que surge tras encerrarla dicha cubierta, que comprende o bien un gas y/o un líquido y/o un sólido.

20 Cuando se describen características, realizaciones o aspectos de la presente invención en cuanto a grupos de Markush, un experto en la técnica reconocerá que la invención también se describe de ese modo en cuanto a cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush. El experto en la técnica reconocerá además que la invención también se describe de ese modo en cuanto a cualquier combinación de miembros individuales o subgrupos de miembros de grupos de Markush.

25 Un aspecto del método de la invención comprende las etapas de proporcionar un componente de polímero adecuado y disolverlo en un primer disolvente, preferiblemente un disolvente apolar, mezclar una sustancia formadora de núcleo en la disolución que comprende el componente de polímero, tal como disolviendo gas en la primera disolución o presurizando la primera disolución, para que la sustancia formadora de núcleo forme núcleos, en los que el componente de polímero es esencialmente inmiscible. Por consiguiente, el componente de polímero se precipita mediante la puesta en contacto de la primera disolución con un segundo disolvente, teniendo dicho

30 segundo disolvente carácter polar en el que el componente de polímero es esencialmente insoluble, obteniendo de ese modo cubiertas de polímero, formadas alrededor de dichos núcleos.

35 El componente de polímero puede ser cualquier polímero, o bien natural o bien sintético, sustancialmente inerte o biológicamente activo, por ejemplo un polisacárido tal como celulosa o hemicelulosa o cualquier otro polisacárido con propiedades que puede esperarse que sean similares a las propiedades de la celulosa y hemicelulosa, o quitosano, galactoglucomanano, glicosaminoglicano, sulfato de heparina, hialuronano, sulfato de condroitina, o un proteoglicano, un poliéster, un poliéter, un polivinilo, o similares o cualquier derivado de los mismos.

40 El primer disolvente puede ser cualquier disolvente en el que el polímero se disuelve, tal como un disolvente orgánico, por ejemplo dimetilacetamida (DMAc) u óxido de N-metilomorfolina (NMMO).

45 El segundo disolvente tiene preferiblemente carácter polar de modo que el polímero es insoluble en el mismo, por ejemplo agua, metanol, etanol, isopropanol, 1,2-dicloroetano y/o tolueno, o similares. Utilizar agua (índice polar 9), etanol (índice polar 5,2), 1,2-dicloroetano (índice polar 3,5) o tolueno (índice polar 2,4), o cualquier combinación de estos disolventes da como resultado precipitación casi inmediata y formación de cubiertas de celulosa, mientras que el uso de ciclohexano (índice polar 0,2) parece dar como resultado una formación de cubierta más lenta, lo que implica que la rápida precipitación de las cubiertas de polímero, al menos cuando se utiliza celulosa, se detiene en algún punto en el intervalo entre 0,2 y 2,4.

50 Por “mezclar una sustancia formadora de núcleo” quiere decirse que una sustancia o elemento que tiene la capacidad de formar un núcleo, por ejemplo en forma de burbujas, tales como dióxido de carbono, aire, argón, nitrógeno, hidrógeno, y/o gas licuado de petróleo (GLP; el 40% de butano y el 60% de propano), o similares, se

introduce en la disolución de polímero, por ejemplo alimentando gas a la disolución, o presurizando la disolución, y solubilizando de ese modo el gas en la disolución. Otras sustancias formadoras de núcleo dadas a conocer pero no reivindicadas están relacionadas con líquidos y/o sólidos y/o emulsiones que pueden formar núcleos. Además, las sustancias formadoras de núcleo pueden comprender adicionalmente diversas sustancias activas.

5 Una realización del método de la presente invención comprende las etapas de proporcionar un material de polisacárido adecuado, por ejemplo celulosa o hemicelulosa, o cualquier otro polisacárido con propiedades que pueda esperarse que sean similares a las propiedades de la celulosa y hemicelulosa, o quitosano, galactoglucomanano, o cualquier derivado de los mismos, lavando opcionalmente el componente de polímero repetidamente en agua, metanol y dimetilacetamida (DMAc) o cualquier otro disolvente orgánico antes de disolverlo en una primera disolución que comprende al menos un disolvente orgánico, preferiblemente DMAc, y al menos un tipo de ión metálico, preferiblemente un ión de metal alcalino. Otro disolvente orgánico dentro del alcance de la invención es el óxido de N-metilmorfolina (NMMO), pero el uso de este disolvente requiere una ausencia absoluta de iones metálicos. La cantidad de polímero disuelto en la disolución oscila generalmente entre aproximadamente el 0 y el 25% p/p, pero preferiblemente entre el 0 y el 5% p/p, según las características del polímero seleccionado, especialmente el peso molecular, el grado de sustitución y la naturaleza de los sustituyentes. El ión metálico en el disolvente orgánico (por ejemplo, DMAc) altera el enlace de hidrógeno intra e intermolecular entre el/los polímero(s), lo que aumenta su solubilidad. Se prefieren los iones de litio, pero también pueden emplearse otros iones de metales alcalinos y metálicos, por ejemplo, Mg, Na, Fe, Al y Cu. El intervalo de concentración está preferiblemente entre el 0,1 y el 25% p/p, e incluso más preferiblemente entre el 5 y el 10% p/p. Una sustancia formadora de núcleo se mezcla en la disolución para ayudar a la formación de núcleos para la generación mejorada de cubiertas de polímero, tal como por ejemplo mediante la adición de un gas, por ejemplo, alimentando un gas adecuado a la primera disolución o presurizando la primera solución con un gas adecuado, por ejemplo, dióxido de carbono, aire, argón, nitrógeno, hidrógeno y/o GLP, para facilitar adicionalmente la formación de núcleos, y finalmente la disolución de polímero se transfiere a una segunda disolución que comprende un disolvente de carácter polar en el que el componente de polímero es insoluble y, por consiguiente, donde las cubiertas de polímero, insolubles en dicho segundo disolvente, se precipitan y se forman.

En otra realización, el método para preparar cubiertas de polímero comprende disolver el componente de polímero en un primer disolvente y posteriormente mezclar un gas formador de núcleo en dicha disolución que contiene polímero. La sustancia formadora de núcleo puede seleccionarse del grupo que comprende al menos un gas, entre otros CO<sub>2</sub>, aire, argón, nitrógeno, hidrógeno, GLP y/o hidrocarburo. Finalmente, las cubiertas de polímero se forman precipitando el componente de polímero poniendo en contacto la primera disolución con un segundo disolvente, segundo disolvente que tiene carácter polar, y segundo disolvente en el que el componente de polímero es esencialmente insoluble, obteniendo de ese modo cubiertas de polímero, formadas alrededor de dichos núcleos.

Se da a conocer además en el presente documento un método para preparar cubiertas de polímero transparentes, duras y elásticas, que comprende una etapa adicional de secado por microondas de las cubiertas de polímero después de la precipitación, obteniendo de ese modo cubiertas transparentes y elásticas, preferiblemente que comprenden celulosa y/o hemicelulosa, u otros polímeros con propiedades similares. El secado por microondas puede llevarse a cabo en un horno microondas doméstico, por ejemplo a entre 50 y 1500 W, preferiblemente aproximadamente a 800 W. El secado puede llevarse a cabo durante cualquiera de entre 10 segundos y varias horas, según las condiciones de secado y las cubiertas *per se*. Las cubiertas de polímero que resultan del método anterior poseen propiedades físicas muy interesantes, por ejemplo elasticidad (es decir, tras la liberación de una presión física aplicada, las cubiertas vuelven a su forma original), rigidez y transparencia.

Otra realización de la presente invención da a conocer un método que comprende las etapas de proporcionar un material de polisacárido adecuado, por ejemplo celulosa o hemicelulosa, o cualquier polisacárido con propiedades que pueda esperarse que sean similares a las propiedades de la celulosa y hemicelulosa, o quitosano, galactoglucomanano, o cualquier derivado de los mismos, lavando el componente de polímero repetidamente en agua, metanol, y dimetilacetamida (DMAc) o cualquier otro disolvente antes de disolverlo en una primera disolución que comprende al menos un disolvente orgánico, preferiblemente DMAc, y al menos un tipo de ión metálico, preferiblemente un ión de metal alcalino. La cantidad de polímero disuelto en la disolución generalmente oscila entre aproximadamente el 0 y el 25% p/p, pero preferiblemente entre el 0 y el 5% p/p, según las características del polímero seleccionado, especialmente el peso molecular, el grado de sustitución y la naturaleza de los sustituyentes. El ión metálico en el disolvente orgánico (por ejemplo DMAc) altera el enlace de hidrógeno intra e intermolecular entre el/los polímero(s), lo que aumenta su solubilidad. Se prefieren los iones de litio, pero también pueden emplearse otros iones de metales alcalinos y metálicos, por ejemplo Mg, Na, Fe, Al, y Cu. El intervalo de concentración es preferiblemente de entre el 0,1 y el 25% p/p e incluso más preferiblemente entre el 5 y el 10% p/p. Una sustancia formadora de núcleo se mezcla en la disolución con el fin de ayudar a la formación de núcleos para generación mejorada de las cubiertas de polímero, tales como mediante adición de un gas, por ejemplo alimentando un gas adecuado a la primera disolución o presurizando la primera disolución con un gas adecuado, por ejemplo dióxido de carbono, aire, argón, nitrógeno, hidrógeno y/o GLP, para facilitar adicionalmente la formación de núcleos. Posteriormente, la primera disolución se calienta, con el fin de evaporar cualquier agua presente en la disolución, seguido por exposición a un gas, o bien mediante presión aumentada o bien mediante alimentación de un gas a la disolución y disolviéndolo de ese modo, provocando por tanto la formación de núcleos que comprenden un gas. La

5 exposición a presión aumentada se logra o bien presurizando la disolución con un gas adecuado, disolviendo de ese modo el gas en la disolución de polímero, o bien forzando dicha disolución a través de al menos un capilar o sistema capilar. Finalmente, la disolución de polímero se transfiere a una segunda disolución que comprende disolvente de carácter polar en el que el componente de polímero es esencialmente insoluble, y por consiguiente, donde las  
10 cubiertas de polímero, insolubles en dicho segundo disolvente, se precipitan y se forman, alrededor de dichos núcleos. Material polimérico adecuado para la presente invención puede, por ejemplo, comprender celulosa o hemicelulosa, o cualquier otro polisacárido con propiedades que puede esperarse que sean similares a las propiedades de la celulosa y hemicelulosa, o quitosano, galactoglucomanano, y/o cualquier derivado de los mismos. El material polimérico comprende preferiblemente unidades de repetición de uno o más sacáridos, pero otros  
15 materiales poliméricos de hidrato de carbono o de no hidrato de carbono están también dentro del alcance de la invención. El material polimérico está esencialmente en forma desordenada y amorfa, pero también puede producirse en forma cristalina, o una mezcla de las dos. En una realización de la presente invención, el material polimérico puede disolverse en la disolución de ión metálico/disolvente orgánico en una concentración que oscila entre el 0 y el 25% p/p, preferiblemente en un intervalo de concentración entre el 0 y el 5% p/p. Según la invención, pueden utilizarse varios tipos de pastas de madera en forma sustancialmente no modificada, proporcionando una clara ventaja con respecto a la mayoría de tecnologías existentes. El contenido polimérico de las cubiertas no parece afectar a su diámetro exterior, sino que aumentar la concentración polimérica en el disolvente conduce a densidad y grosor de pared aumentadas, si bien no de manera lineal. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se supone que una concentración polimérica aumentada en la disolución proporciona mayores cantidades de material de construcción accesible, dando como resultado cubiertas con paredes más gruesas y mayor densidad. Alternativamente, el mayor contenido polimérico en disolución puede aumentar la viscosidad y de ese modo prolongar el tiempo de disolución del gas. La relación entre densidad de pared y el espacio hueco dentro de las cubiertas de polímero, cuando se alimenta dióxido de carbono a una disolución de celulosa durante 30 minutos (figura 10), muestra que el grosor de pared aumenta ligeramente a lo largo de un intervalo de celulosa de entre el 1% y el 2%. Sin embargo, cuando se alimenta dióxido de carbono a la disolución durante sólo 5 minutos (figura 11), el grosor de pared aumenta significativamente a lo largo un intervalo de celulosa de entre el 0,5% y el 2%. En conjunto, el diferente grosor de pared y densidad de cubierta puede afectar a las características de cubierta, por ejemplo, propiedades mecánicas y velocidad de difusión.

20 En una realización de la presente invención, la concentración de ión metálico o de metal alcalino en el primer disolvente es de entre el 0,1 y el 25% p/p, preferiblemente entre el 5 y el 10% p/p. El ión de metal alcalino o el ión metálico comprende preferiblemente litio, pero también pueden utilizarse otros iones, conocidos para un experto en la técnica, por ejemplo, Mg, Na, Fe, Cu, Al, Ni, Zn, K, Be.

25 En otra realización de la invención, el gas para presurizar la primera disolución es dióxido de carbono, pero también pueden usarse otros gases adecuados conocidos para un experto en la técnica, por ejemplo aire, argón, nitrógeno, hidrógeno, y/o GLP, para facilitar la formación de las cubiertas de polímero. Según la invención, la disolución de ión metálico presurizada/disolvente orgánico que comprende el material polimérico ayuda a la formación de las cubiertas cuando entra en la segunda disolución de precipitación. Cuando se añade la primera disolución presurizada de polímero al no disolvente, es decir, el disolvente de carácter polar que comprende disolvente polar, el polímero, tras contacto con el disolvente polar, comienza a precipitar y se forma un núcleo de una burbuja de gas dentro de la gotita de polímero. La mayor presión dentro de la burbuja nucleada, dentro de la primera disolución de polímero, da como resultado una expansión hacia fuera del material polimérico cuando entra en contacto con la segunda disolución, lo que conduce a la formación de cubiertas de polímero. El uso de GLP aumentó el espacio dentro de las cubiertas de polímero sustancialmente en comparación con los otros gases. De nuevo, sin desear limitarse a ninguna teoría, una posible explicación podría referirse al grado aumentado de disolución de GLP en la disolución de polímero, lo que implica que variaciones en varias variables pueden dotar a las cubiertas de polímero con propiedades interesantes y sensibles.

30 Con el fin de aumentar la forma esférica de las cubiertas, puede reducirse la tensión superficial del no disolvente en el que se produce precipitación, en una realización por ejemplo con el uso de tensioactivos, tales como por ejemplo agentes de superficie anfóteros, agentes de superficie no iónicos y/o agentes de superficie aniónicos. De nuevo, sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se supone que la forma esférica aumentada de las cubiertas de polímero cuando se añaden tensioactivos a los baños de precipitación se deriva de la tensión superficial reducida del no disolvente, lo que da como resultado penetración superficial facilitada e impacto disminuido lo que implica que la forma de tipo gotita, esférica se conserva durante la precipitación.

35 En una realización adicional de la presente invención, la primera disolución se transfiere al segundo disolvente como resultado de un fenómeno físico, tal como una diferencia de presión entre el recipiente para disolución del polímero y el baño de precipitación, o nucleación de dióxido de carbono. El equipo utilizado en esta realización comprende un recipiente que contiene el polímero disuelto en la primera disolución presurizada que comprende ión metálico/disolvente orgánico, un componente para transferir la disolución, y un recipiente de precipitación receptor que contiene una disolución que comprende disolvente de carácter polar en el que las cubiertas de polímero, insolubles en dicho disolvente polar, se precipitan. En otra realización de la presente invención, se emplea un dispositivo de pulverización para transferir la primera disolución de polímero al segundo disolvente para precipitación. El dispositivo de pulverización se conecta con la disolución de polímero y dicha disolución se pulveriza

posteriormente sobre un disolvente de carácter polar en el que las cubiertas de polímero, insolubles en dicho disolvente polar, se forman. En una realización adicional de la invención, la primera disolución se transfiere manualmente al baño de precipitación que comprende el segundo disolvente, usando, por ejemplo, una pipeta o cualquier otro tipo de instrumento de laboratorio para transportar un líquido.

Los métodos descritos anteriormente pueden llevarse a cabo en un dispositivo microfluídico y/o en un sistema capilar. En una divulgación el dispositivo (véase por ejemplo la figura 9) comprende dos recipientes microfluídicos alineados de manera secuencial sustancialmente cilíndricos, un tubo de inyección que contiene una primera disolución interna y un tubo de recogida que contiene una segunda disolución externa de carácter polar, parcialmente encerrada en un envase exterior que comprende el segundo fluido externo y un fluido intermedio. El fluido intermedio ejerce una fuerza de direccionamiento en la disolución interna de polímero que deja el tubo de inyección, lo que da como resultado la transferencia del fluido de polímero interno al segundo fluido de precipitación, en el que el componente de polímero y, por tanto, las cubiertas de polímero son insolubles, en el tubo de recogida, en donde las cubiertas de polímero precipitan y se forman. También se da a conocer en el presente documento un sistema de al menos dos recipientes ensamblados de manera secuencial conectados mediante componentes de transferencia, en donde una disminución secuencial en la presión de un recipiente al siguiente da como resultado la transferencia de la disolución de polímero desde un recipiente hasta el siguiente, con precipitación de las cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares, en un recipiente de precipitación.

También se da a conocer en el presente documento un método para preparar cubiertas de polímero, que comprende las etapas de disolver el componente de polímero en un primer disolvente, y posteriormente mezclar la disolución obtenida con una sustancia formadora de núcleo, en la que la sustancia formadora de núcleo es una emulsión de agua en aceite. Finalmente, el componente de polímero se precipita poniendo en contacto la primera disolución con un segundo disolvente, en el que el segundo disolvente es por ejemplo agua, opcionalmente derivada del sistema de emulsión, obteniendo de ese modo cubiertas de polímero.

En una realización de la presente invención, el disolvente para disolver el polímero se recupera y recircula después de la precipitación de las cubiertas de polímero. En esta realización particular de la invención, el disolvente es NMMO, que es un disolvente de celulosa eficaz sólo cuando está concentrado. Esto implica que a medida que las cubiertas se precipitan, el NMMO se mezcla con agua y se separa de las cubiertas de celulosa, y puede por tanto reutilizarse como disolvente eliminando el agua. La ausencia de iones metálicos o de metales alcalinos es en este caso vital para evitar explosiones. En el uso de mezcla de DMAC/LiCl como disolvente de polímero, ambos productos químicos pueden reutilizarse tras eliminar el agua. El uso de esta mezcla de disolvente no provoca riesgo de explosión en presencia de iones de metales alcalinos.

Según una realización de la invención, se forman cubiertas de polímero en presencia de  $\text{CaCO}_3$ , lo que da como resultado cubiertas que comprenden dicho compuesto y que presentan de ese modo un espacio interior que está sellado sustancialmente de manera reversible. Tras la exposición a pH bajo, la solubilidad del  $\text{CaCO}_3$  aumenta, lo que conduce a una posterior formación de poros en las cubiertas de polímero, facilitando la difusión y liberación sostenida de un agente incorporado deseado durante al menos varias horas.

En aún otra realización de la presente invención, el fluido para la precipitación de las cubiertas de polímero comprende polímeros o compuestos, solubles en el fluido de precipitación, para recubrir la superficie de las cubiertas para obtener un efecto deseado, por ejemplo, en relación con el sellado de las cubiertas o funcionalización de la superficie. Tales compuestos pueden incluir pero no se limitan a, quitosano, galactoglucomanano, xiloglucano y/o  $\text{CaCO}_3$ .

También se dan a conocer en el presente documento cubiertas de polímero que comprenden sustancialmente polímeros de hidratos de carbono en donde la razón del diámetro interno con respecto al diámetro exterior de dichas cubiertas es variable tras exposición a concentración de sal variable y/o pH variable. Tanto el diámetro exterior como el grosor de las paredes de las cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares, disminuyen cuando se dejan en disolución a lo largo de un intervalo de pH de 1 a 13 a lo largo de un plazo de 2 a 3 horas, o hasta que se ha alcanzado el equilibrio.

Puede producirse un hinchamiento radial hacia el interior de la cubierta como resultado del pH variable y la concentración de sal, aumentado el volumen del espacio dentro de la cubierta del polímero en volumen al disminuir el pH y disminuyendo en volumen al aumentar la concentración de sal. La disminución en volumen del espacio dentro de la cubierta cuando se aumenta el pH es principalmente el resultado de aumentar el grosor de la pared de la cubierta con pH creciente, y la disminución en volumen del espacio dentro de la cubierta con concentración de sal creciente también se origina a partir de un aumento en el grosor de la pared de la cubierta cuando se aumenta la concentración de sal. Por consiguiente, el hinchamiento que se produce tras exposición a concentración de sal variable y pH variable da como resultado una expansión radial hacia el interior, con un diámetro exterior relativamente constante, y el volumen del espacio dentro de la cubierta es inversamente proporcional a la concentración de sal y el pH.

El grosor inicial de las paredes de las cubiertas de polímero puede aumentar entre 0,3 y 0,55 mm cuando se

aumenta el pH desde 1,5 hasta 10, según el material polimérico. De manera similar, el grosor de las paredes de las cubiertas puede aumentar, pero de manera más moderada, después de 2 a 3 horas en disolución, oscilando el aumento entre 0,2 y 0,25 mm a lo largo de dicho intervalo de pH. En aún otra divulgación, el grosor de las paredes de las cubiertas puede modularse según el grado de solubilización del gas (es decir, la cantidad de gas disuelto) en la disolución de polímero. También se dan a conocer en el presente documento métodos para proporcionar cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares, con propiedades modificables dinámicas, las cubiertas como tal, y sus aplicaciones. El hecho de que las propiedades químicas y físicas de las cubiertas pueden controlarse y modularse mediante tales factores no complicados como concentración de sal variable y pH variable, hace que tales cubiertas sean muy deseables para muchos fines, por ejemplo en la administración de fármacos y separación cromatográfica, incluso para otros usos, entre otros, como material de acondicionamiento, material de relleno, material de relleno de juntas, o como material de intemperie. Según una divulgación, una disminución en el pH da como resultado un aumento en el volumen del espacio dentro de la cubierta, dotando a la cubierta de las características de una bomba o una membrana. De manera similar, en una realización una disminución en la concentración de sal da como resultado un aumento en el volumen del espacio dentro de la cubierta. En otras realizaciones, la variación puede ser la contraria. Pueden encontrarse concentración de sal y pH variables dentro de muchos sistemas biológicos, químicos y físicos, proporcionando varios campos de uso para estas cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares. Un mayor pH puede inducir ionización de grupos funcionales en el polímero, dando como resultado hinchamiento del material polimérico, lo que conduce a un volumen disminuido del espacio dentro de la cubierta. Además, cuando se investigan polímeros de diferente densidad de carga, no se detectó disminución evidente en el volumen del espacio dentro de la célula cuando se aumenta el pH, lo que da como resultado la conclusión de que la solubilidad en agua del dióxido de carbono gaseoso influye en las propiedades de la cubierta. Tras entrar agua en la cubierta, a través de fuerzas capilares, a mayor pH, la solubilidad de dióxido de carbono aumenta, reduciendo la presión de gas hacia el exterior que conduce a un volumen disminuido del espacio dentro de la cubierta.

También se dan a conocer en el presente documento cubiertas de polímero, insolubles en disolventes polares, que se caracterizan adicionalmente en que presentan una capacidad para la liberación sostenida de compuestos a lo largo de un plazo que oscila entre aproximadamente 0,1 horas y aproximadamente 24 horas, preferiblemente entre 1 hora y 12 horas. Además según la invención, estas propiedades pueden modificarse tras variar la concentración de sal y/o el pH, y la presencia de polímeros adicionales, y/o compuestos unidos a o incorporados en la cubierta, también influye en las propiedades de liberación.

El material polimérico de la cubierta de polímero puede comprender celulosa, hemicelulosa, quitosano, galactoglucomanano, o cualquier derivado de los mismos. El material polimérico comprende preferiblemente unidades de repetición de uno o más sacáridos, pero también se contemplan otros materiales poliméricos de hidrato de carbono o de no hidrato de carbono. Por ejemplo, el material polimérico de la invención puede comprender uno o más polímeros que tienen sustancialmente carácter de hidrato de carbono y/o especialmente celulosa o hemicelulosa. Además, el material polimérico puede componerse de celulosa o hemicelulosa que se han modificado mediante sustitución o adición. Pueden usarse polímeros tanto naturales como sintéticos dentro del método dado a conocer en el presente documento. El material polimérico puede ser cristalino, o en forma desordenada y amorfa, o una mezcla de las dos.

En una divulgación, la razón del diámetro interno con respecto al diámetro exterior de las cubiertas de polímero es variable desde el 40 hasta el 90%, y preferiblemente desde el 50 hasta el 70%, como resultado de concentración de sal variable o pH variable o a lo largo del tiempo.

La cubierta producida según la invención presenta un diámetro exterior de entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 10 mm, pero los diámetros que oscilan entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , entre 10  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , entre 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , entre 100  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , entre 500  $\mu\text{m}$  y 1 mm, y entre 1 mm y 10 mm, están dentro del alcance del método, según el fin y el campo de aplicación de las cubiertas de polímero. El diámetro interno de la cubierta puede estar entre 0,5 mm y 6 mm, pero los diámetros internos también pueden oscilar entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , entre 10  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ , entre 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , entre 100  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , entre 500  $\mu\text{m}$  y 1 mm, y entre 1 mm y 10 mm, de nuevo según el fin y el campo de aplicación.

Tal como puede observarse a partir de las figuras 13 y 16, las cubiertas de polímero que comprenden el 1% de celulosa pueden presentar un grosor de pared de la cubierta que oscila entre aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ . Las cubiertas con un contenido de celulosa del 1,5% pueden presentar paredes de cubierta ligeramente más gruesas, que oscilan entre aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ , tal como puede observarse a partir de las figuras 14, 15 y 17. Las cubiertas con un contenido de celulosa del 2% pueden tener incluso paredes de cubierta más gruesas, mostrando la figura 18 una cubierta de polímero de celulosa que tiene un grosor de pared de la cubierta de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ . Determinadas cubiertas de celulosa, por ejemplo, cubiertas que se exponen a secado por microondas tras la formación, presentan paredes de cubierta significativamente menos gruesas, tal como puede observarse a partir de la figura 19, oscilando el grosor entre aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  y 30  $\mu\text{m}$ . Por tanto, se dan a conocer cubiertas de polímero que tienen un grosor de pared de la cubierta que oscila entre aproximadamente 100 nm y 2 mm. El grosor de pared de la cubierta puede estar preferiblemente en el intervalo entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ , pero también pueden ser deseables otros intervalos para aplicaciones específicas.

También se presentan en el presente documento cubiertas de polímero lavadas, insolubles en disolventes polares, que presentan diferentes características que las cubiertas no lavadas. La influencia de factores externos sobre las cubiertas está afectada por la sal de ión metálico o la sal de metal alcalino, por ejemplo LiCl, asociada con las cubiertas no lavadas. Además, el grado de sustitución del polímero que comprende las cubiertas lavadas influye en el grosor de las paredes y el hinchamiento de las cubiertas, con un mayor grado de sustitución lo que da como resultado paredes más gruesas y un diámetro exterior más pequeño, lo que indica hinchamiento aumentado del polímero. La razón de esto es que la carga creciente del polímero da como resultado una mayor diferencia en el potencial químico que se compensa mediante dilución (hinchamiento) del material. Por consiguiente, el material polimérico con el mayor grado de sustitución que comprende las cubiertas lavadas de polímero, insolubles en disolventes polares, presenta un mayor grado de hinchamiento cuando se aumenta la concentración de sal o se aumenta el pH. Sin embargo, en otra divulgación una concentración decreciente de sal da como resultado un mayor grado de hinchamiento.

En otra realización de la presente invención, la superficie de la cubierta de polímero se ha modificado para lograr determinadas propiedades deseadas. Modificar la superficie de la cubierta puede comprender unir grupos funcionales y/o activos, o bien de manera covalente o bien a través de fuerzas electroestáticas o hidrófobas o a través de cualquier otro medio de unión conocido por un experto en la técnica. Las modificaciones pueden comprender átomos, moléculas, macromoléculas, polímeros, agregados, partículas, fibras, fibrillas y otros componentes conocidos por el experto. En aún otra realización, se unen polímeros adicionales con propiedades adecuadas para la administración de fármacos o aplicaciones de cromatografía a las cubiertas de polímero. Tales polímeros pueden, por ejemplo, incluir polímeros de no de hidratos de carbono y de hidratos de carbono tales como quitosano, pero también pueden unirse proteínas, polipéptidos y oligonucleótidos a las cubiertas de polímero. La unión puede basarse en enlaces o bien covalentes o bien no covalentes y además comprender más de un polímero u oligómero adicional.

En una realización preferida, el polímero adicional que se usa para modificar la superficie de la cubierta de polímero es un hidrato de carbono soluble en agua. Este hidrato de carbono soluble en agua puede modificarse antes o después de la modificación de la superficie de cubierta de polímero. El hidrato de carbono modificado soluble en agua puede ser xiloglucano. La modificación de xiloglucano puede hacerse según la invención de Brumer y colaboradores, documento EP1448840B1, en donde se usa un método quimioenzimático que utiliza la enzima xiloglucano endotransglicosilasa para la modificación de celulosa. Se da a conocer otro método para la modificación de xiloglucano por Slättegård y colaboradores (documento provisional estadounidense n.º 61/150021) en donde el xiloglucano se amina, mediante un procedimiento de aminación reductora. Puede usarse una molécula de xiloglucano aminada para unir anticuerpos, proteínas o péptidos tal como se da a conocer en el documento WO2008/104528 o añadir un compuesto químico que confiere las propiedades de sellado u otras compatibilidades.

En una realización, el xiloglucano modificado se une a las cubiertas de polímero con el fin de conferir propiedades adecuadas para la administración de fármacos o aplicaciones de cromatografía o cualquier otra propiedad deseable, tal como sellado reversible de la cubierta. Una realización adicional puede comprender sellado reversible de la cubierta usando o bien un polímero adecuado, por ejemplo quitosano, o bien un compuesto químico, que comprende por ejemplo  $\text{CaCO}_3$ , que presenta diferentes propiedades tras exposición a condiciones circundantes variables, tales como pH y concentración de sal. Puede obtenerse sellado reversible, por ejemplo, sumergiendo la cubierta de polímero en una disolución de un polímero o compuesto químico adecuados que confiere las propiedades de sellado. La gelatina se usa ampliamente en aplicaciones de administración de fármacos, puesto que la gelatina se digiere mediante enzimas en el sistema gastrointestinal, lo que conduce a la liberación del fármaco. Las propiedades de sellado reversible pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones de administración de fármacos, con el fin de controlar la liberación del contenido de la cubierta de polímero. La eliminación de las propiedades de sellado puede lograrse a través de exposición a pH, concentración de sal o temperatura alterados. Las cubiertas de polímero producidas con  $\text{CaCO}_3$  presentan una liberación significativamente más lenta de compuestos encerrados dentro de la cubierta, lo que implica que la incorporación del número de poros en la cubierta se ha reducido, o que el tamaño de poro se disminuye. Se supone que el  $\text{CaCO}_3$  no disuelto cubre los poros, reduciendo de ese modo la difusividad y permeabilidad de las cubiertas de polímero.

Una divulgación se refiere a cubiertas de polímero que comprenden sustancialmente polímeros de hidratos de carbono producidos mediante el método de la presente invención.

También se describe en el presente documento un dispositivo de administración de fármacos que comprende la cubierta de polímero. El dispositivo de administración de fármacos puede comprender un vehículo para, por ejemplo, administración oral (p. o.), intravenosa (i. v.), intraperitoneal (i. p.), intracerebroventricular (i. c. v.), intramuscular (i. m.), intranasal y/o intratecal de fármacos de moléculas pequeñas, macromoléculas y/o biofarmacéuticos, o un vehículo para una vacuna y/o un potenciador de respuesta inmunitaria inespecífica, u otros compuestos farmacéuticamente interesantes conocidos por un experto en la técnica. Además, el dispositivo de administración de fármacos podría utilizarse para la administración local de compuestos farmacéuticamente interesantes o para administración sostenida durante un periodo de tiempo más largo. El fármaco o la composición farmacéutica que va a incluirse en el vehículo actúa como sustancia formadora de núcleo que ayuda a la formación de la cubierta de

5 polímero y que se incorpora de ese modo en el vehículo de administración de fármacos. Alternativamente, el fármaco puede disolverse en la segunda disolución polar para la incorporación en el vehículo tras precipitación de la cubierta de polímero, por ejemplo, mediante coprecipitación preferencial junto con el polímero o mediante alguna otra forma de interacción química específica o inespecífica. En aún otra divulgación, la cubierta de polímero se carga con un fármaco de interés después de su formación, por ejemplo, explotando las propiedades sensibles de la cubierta de polímero.

10 En una divulgación adicional, la cubierta de polímero se emplea como medio para separación cromatográfica, en la que la cubierta actúa como componente en fase sólida, por ejemplo como fase estacionaria en una columna para cromatografía líquida (CL), que comprende por ejemplo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de exclusión molecular (SEC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC), o cromatografía de hidrofobicidad, cromatografía de fase inversa (RPC), cromatografía en capa fina (CCF) y/o cromatografía de gases, que comprende además técnicas conocidas por un experto en la técnica, tanto para fines preparativos como analíticos.

15 Además, las cubiertas de polímero pueden utilizarse como material de relleno para diversos fines, entre otros, aislamiento, material de acondicionamiento, material de relleno de juntas y/o material de intemperie.

20 **Ejemplos**

Materiales y métodos

a. Polímeros de celulosa

25 Los inventores investigaron tres tipos de celulosa en los presentes experimentos. Se utilizaron dos pastas para disolver con grado de sustitución variable (D. S.) (0,0065 y 0,015), así como una pasta de fibra larga de sulfato químico blanqueado conocida como Grycksbo.

30 b. Microscopía óptica

Los presentes inventores utilizaron microscopía óptica para evaluar las dimensiones de las cubiertas de polímero, insolubles en dicho disolvente polar. Usando un instrumento Carl Zeiss Stemi SV8, pudo determinarse la influencia de concentración de sal y pH en los diámetros externos e internos de las cubiertas de polímero, y también se detectó la presencia de un espacio dentro de la cubierta.

35 c. Microscopía confocal

Los inventores pretendieron utilizar microscopía confocal, pero como resultado del grosor de las paredes de las cubiertas las secciones ópticas no penetraron las cubiertas en un grado suficiente, haciendo difícil llevar a cabo cualquier otra medición.

d. Espectrofotometría

45 Con el fin de simular la liberación de fármacos de las cubiertas de polímero, se midió espectrofotométricamente la liberación de un colorante comúnmente utilizado incorporado en las cubiertas, mediante muestreo repetido de una disolución acuosa que contiene dichas cubiertas.

Ejemplo 1: Efectos mediados por pH variable a lo largo del tiempo

50 Tal como puede observarse de la tabla 1 a la tabla 3, y en la figura 1, el diámetro exterior inicial de las cubiertas aumentó ligeramente a mayor pH. Al comparar los diámetros exteriores en la figura 1 con los diámetros exteriores en la figura 2, así como los valores iniciales y los valores después de 2 a 3 horas, resulta evidente que los tres tipos de polímero disminuyeron en tamaño y que hubo un alto grado de similitud entre las dos pastas para disolver. Podría derivarse posiblemente una explicación a partir de una presión de gas disminuida dentro de la cubierta después de que difundiera agua en la misma, disminuyendo la presión radial hacia el exterior y disminuyendo de ese modo el tamaño de la cubierta.

Tabla 1.

Tipo de pasta: Grycksbo 400				
pH	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	en una dimensión			
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior

1,5	4,35	3,90	1,99	1,58
3,0	4,44	4,00	2,13	1,71
10,0	4,34	3,91	2,05	1,73
13,0	4,31	3,89	2,61	1,97

Tabla 2.

Tipo de pasta: alto Ds de disolución

pH	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior
1,5	4,27	3,55	1,50	1,12
3,0	4,28	3,61	1,68	1,29
10,0	4,22	3,67	1,85	1,55
13,0	4,32	3,49	2,37	1,64

Tabla 3.

Tipo de pasta: bajo Ds de disolución

pH	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior
1,5	4,31	3,52	1,46	1,17
3,0	4,45	3,63	1,70	1,26
10,0	4,34	3,65	2,01	1,42
13,0	4,35	3,50	2,57	1,69

5

A partir del grosor inicial de las paredes de las cubiertas presentado en la figura 3, es evidente que el grosor aumentó con pH creciente. El aumento a lo largo del intervalo de pH de 1,5 a 13 estaba entre 0,6 y 11 mm según la pasta de celulosa usada. El pH afectó al espacio dentro de las cubiertas y se detectó el volumen más grande a pH bajo, como resultado de hinchamiento aumentado con pH creciente. Cuando los grupos cargados en la celulosa, principalmente los grupos carboxílicos, se ionizaron a mayor pH, la diferencia en el potencial químico entre la celulosa cargada y la disolución acuosa dio como resultado un influjo de agua en la celulosa, lo que conduce a hinchamiento aumentado. Puede observarse una tendencia similar en la figura 4, en donde se dejó la disolución durante unas pocas horas. Sin embargo, la diferencia en el grosor de las paredes de las cubiertas fue en este caso de entre 0,4 y 0,5 mm a lo largo de un intervalo de pH de 1,5 a 13.

10

15

Se observó expansión radial hacia el interior de las cubiertas tras elevar el pH, dando como resultado grosor de pared aumentado y por consiguiente volumen disminuido del espacio dentro de la cubierta. Una posible explicación para este comportamiento podría ser que cuando entra agua alcalina en la cubierta, el dióxido de carbono gaseoso se vuelve cada vez más soluble, dando como resultado difusión del CO<sub>2</sub> solubilizado fuera de la cubierta. Por consiguiente, se reduce la presión de gas, permitiendo que las paredes se expandan hacia el interior y que el volumen del espacio dentro de la cubierta disminuya. El razonamiento detrás de esta explicación deriva del hecho de que prácticamente no puede detectarse diferencia entre las dos pastas para disolver, a pesar de sus cargas diferentes, y el hecho de que no se detecta cambio sustancial en el diámetro exterior tras variar el pH. Si el hinchamiento principalmente fue resultado de los grupos cargados en la celulosa, se habría detectado una diferencia más significativa entre las dos pastas para disolver. Cabe destacar que estas pruebas no se llevaron a cabo en cubiertas lavadas, lo que implica la presencia de una determinada cantidad de iones de LiCl, lo que afecta a las propiedades de hinchamiento y explica parcialmente por qué la diferencia entre las dos pastas para disolver es más bien baja.

20

25

### 30 Ejemplo 2: Efectos mediados por concentración de sal variable a lo largo del tiempo

La concentración de sal se varió a lo largo de una concentración que oscila entre 0 y 0,1 M. Se midieron los valores iniciales usando microscopía óptica a un punto de tiempo inicial y después de 2 a 3 horas.

5 Los resultados obtenidos indican que el diámetro exterior no cambió significativamente para las dos pastas para disolver cuando se altera la concentración de sal, pero la cubierta compuesta por pasta de sulfato aumentó en tamaño. La explicación de esto se refiere a un alto grado de deformación de las cubiertas normalmente esféricas de manera sustancial, lo que conduce a un diámetro aumentado con la medición bidimensional aplicada. Por consiguiente, el error era demasiado grande para la pasta Grycksbo, pero podría concluirse que las dos pastas para disolver presentaron características muy similares (figura 5).

10 Después de 2 a 3 horas en disolución a lo largo de un intervalo de diferentes concentraciones de sal, la pasta para disolver con el D. S. más bajo tuvo un diámetro exterior ligeramente más grande que la pasta para disolver con D. S mayor, mientras que la pasta de sulfato presentó el diámetro más grande (figura 6), por el motivo mencionado anteriormente. Tras unas pocas horas en disolución, el diámetro exterior y el grosor de las paredes disminuyó en general, compárense la figura 5 y figura 6. Además, con concentración de sal creciente el grosor de las paredes así como el diámetro exterior aumentaron para las dos pastas para disolver, dando como resultado un volumen del espacio dentro de la cubierta más pequeño (figura 7 y tabla 5 a tabla 7).

Tabla 4.

Tipo de pasta: Grycksbo 400				
Csal	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior
0	4,90	4,30	1,82	1,57
0,0001	4,53	4,22	1,66	0,93
0,001	4,24	3,81	1,64	1,36
0,01	4,44	3,97	1,92	1,56
0,1	4,55	4,21	1,99	1,53

Tabla 5.

Tipo de pasta: alto Ds de disolución				
Csal	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior
0,0001	3,44	2,81	1,15	0,70
0,001	3,46	2,75	1,10	0,84
0,01	3,42	2,78	1,23	0,74
0,1	3,39	2,90	1,40	0,87

20

Tabla 6.

Tipo de pasta: bajo Ds de disolución.				
Csal	Diámetro total (mm)		Grosor total de la pared (mm)	
	Valor inicial	Valor posterior	Valor inicial	Valor posterior
0	3,39	2,88	1,22	0,54
0,0001	3,31	3,02	0,98	0,64
0,001	3,43	3,01	1,17	0,78
0,01	3,36	2,84	1,09	0,56
0,1	3,27	3,20	1,34	0,73

Ejemplo 3: Influencia del lavado sobre las propiedades de las cubiertas de celulosa

5 La tabla 7 a la tabla 9 muestran el cambio en los tamaños de las cubiertas después del lavado. Según los resultados previos, los diámetros exteriores de las cubiertas no cambian significativamente cuando no se cambia ni el pH ni la concentración de sal. Sin embargo, el grosor de las paredes de la cubierta aumentó, lo que indica un hinchamiento radial hacia el interior cuando se añadieron iones a la disolución, lo que implica que las fuerzas que restringen el hinchamiento se redujeron cuando se elevó el pH a 10 o aumentando la concentración de sal a  $10^{-3}$  M.

Tabla 7.

Tipo de pasta: Grycksbo 400

Antes del tratamiento (pH 6,5, Csal = 0)				Después del tratamiento		
Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared	Tipo	Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared
3,93	2,69	1,24	pH = 10	3,92	2,54	1,37
3,83	2,59	1,24	Csal = 0,001	3,86	2,47	1,39

10

Tabla 8.

Tipo de pasta: alto Ds de disolución

Antes del tratamiento (pH 6,5, Csal = 0)				Después del tratamiento		
Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared	Tipo	Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared
3,49	2,29	1,2	pH = 10	3,51	2,22	1,3
3,54	2,35	1,2	Csal = 0,001	3,56	2,25	1,32

Tabla 9.

Tipo de pasta: bajo Ds de disolución.

Antes del tratamiento (pH 6,5, Csal = 0)				Después del tratamiento		
Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared	Tipo	Diámetro total	Diámetro del espacio hueco	Grosor total de la pared
3,7	2,65	1,05	pH = 10	3,78	2,54	1,23
3,85	2,68	1,16	Csal = 0,001	3,68	2,47	1,2

15 Al comparar las dos pastas para disolver, uno se da cuenta de que la pasta con el mayor D. S. posee el mayor grosor de las paredes así como diámetro exterior más pequeño. Por consiguiente, el hinchamiento de la pasta para disolver con el mayor D. S. fue mayor que el hinchamiento de la pasta para disolver con menor D. S., una implicación del hecho de que la celulosa con la mayor carga induce una mayor diferencia en el potencial químico, que se compensa con hinchamiento (dilución).

20

Ejemplo 4: Experimentos de liberación de colorante

25 Con el fin de simular la liberación de una sustancia de las cubiertas de polímero, se absorbió un compuesto coloreado (naranja de metilo) a las cubiertas. Inicialmente, se disolvió el 1,5% p/p de pasta para disolver en LiCl/DMAC, o bien en presencia o bien en ausencia de  $\text{CaCO}_3$  y se precipitaron las cubiertas de celulosa tal como se describió previamente. Se absorbió posteriormente naranja de metilo a las cubiertas seguido por transferencia de las cubiertas a un baño de agua. Se tomaron muestras del baño de agua y se midió la absorbancia a 470 nm espectrofotométricamente.

30 Se tomaron muestras, durante las primeras ocho horas, cada hora pero las mediciones tras 24 horas indicaron que el colorante incorporado en las cubiertas formadas en presencia de  $\text{CaCO}_3$  se difunde más rápidamente que el colorante en las cubiertas formadas en ausencia de  $\text{CaCO}_3$  (figura 8). Después de ocho horas, el colorante en las cubiertas formadas en presencia de  $\text{CaCO}_3$  se liberó esencialmente de manera completa de las cubiertas, mientras que se alcanzó el estado de equilibrio después para las cubiertas no tratadas. La liberación más rápida de naranja de metilo de las cubiertas formadas en presencia de  $\text{CaCO}_3$  (figura 8) puede explicarse basándose en la solubilidad

35

5 aumentada de  $\text{CaCO}_3$  a pH menor. Tras la formación de cubiertas, el  $\text{CaCO}_3$  incorporado en las cubiertas se solubilizará, dando como resultado la formación de poros que facilitan la liberación de colorante de las cubiertas de hidrato de carbono de polímero. La gráfica de la concentración de colorante normalizada frente al tiempo (figura 8) indica que puede lograrse una liberación sostenida durante más de dos horas cuando se incluye  $\text{CaCO}_3$  en la formulación de las cubiertas, y que la ausencia de  $\text{CaCO}_3$  en la formulación genera cubiertas con incluso mayores propiedades de liberación sostenida.

#### Ejemplo 5: Producción de cubierta de polímero microfluídico

10 La etapa inicial de la producción de cubierta de polímero microfluídico (por ejemplo, según la figura 9) estaba relacionada con la generación de gotitas de agua monodispersas, con un tamaño de  $60\ \mu\text{m}$ , en polidimetilsiloxano (PDMS), haciendo fluir agua como fluido interno y aceite de PDMS como fluido externo. Las gotitas de agua monodispersas rodeadas por PDMS se transportaron a través de un capilar de vidrio redondo y en el extremo del tubo se introdujo una disolución de celulosa/LiCl/DMAc. Como resultado de la dinámica de flujo, la disolución de celulosa cubría el PDMS y el agua, produciendo una doble emulsión. El aceite de PDMS actuó como agente de protección inerte, retrasando la interacción normalmente muy rápida entre celulosa y agua. Esta configuración única impidió la obstrucción, que es uno de los principales inconvenientes cuando se usa microfluidos como medios para solidificaciones de celulosa. Una vez que se obstruyó un dispositivo, se volvió habitualmente inútil y debía construirse uno nuevo. Además, al tener aceite de PDMS rodeando las gotitas de agua era posible introducir más tensión de corte que impidió que cubiertas de celulosa precipitadas de manera temprana se pegaran al capilar de vidrio. La geometría, presentada en figura 19 a continuación, con una dimensión interna empezando desde la izquierda; los tubos cuadrados tienen una anchura interna de 1 mm, el tubo de vidrio redondo tuvo un diámetro interno de  $50\ \mu\text{m}$ , la segunda abertura del mismo capilar redondo tuvo un diámetro interno de  $180\ \mu\text{m}$ , el tubo de recogida tuvo una abertura de  $400\ \mu\text{m}$ . Las flechas coloreadas punteadas significan entradas en las que los fluidos se introducen en el dispositivo microfluídico. Las flechas coloreadas no puntuadas representan la dirección de flujo de fluidos dentro del dispositivo microfluídico. El tamaño de las cubiertas de celulosa huecas producidas usando microfluidos se reduce de milímetros a micrómetros. El parámetro más importante que determina los tamaños de las cubiertas producidas por la tecnología microfluídica es el tamaño de los ahusadores de vidrio (véase la figura 5 o la figura 19), el tamaño capilar de salida del tubo de vidrio de la entrada de agua. Cuando mayor sea el ahusador, mayores serán las cubiertas de celulosa.

#### Ejemplo 6: Secado de cubiertas de polímero

35 Se midieron los tamaños de cubiertas de celulosa huecas húmedas usando microscopía antes de secado al aire a temperatura ambiental. Tras cinco horas de secado al aire, se midieron de nuevo los tamaños. El diámetro de las cubiertas de celulosa disminuyó con un factor 2,6, es decir, más del 60%.

40 Se secaron cubiertas de celulosa preparadas usando GLP (el 60% de propano y el 40% de butano) como agente formador de núcleo en un horno microondas doméstico (800 W) hasta que se secaron totalmente (aproximadamente 1,5 minutos). Al contrario que en el ejemplo anterior, los tamaños de las cubiertas no disminuyeron como resultado del secado, sino que las cubiertas se endurecieron. Tras liberar una presión física aplicada, las cubiertas regresaron a su forma y estructura originales, prácticamente de manera instantánea. Además, las cubiertas se volvieron transparentes tras inspección visual tras haberse secado en microondas, proporcionando potencialmente una ruta muy interesante para obtener cubiertas transparentes para numerosas aplicaciones.

#### Ejemplo 7: Preparación de emulsificación

50 Se disolvió 1 ml de hexano en 5 ml de disolución de celulosa. Entonces se agitó la mezcla, creando una emulsión de gotitas de hexano en disolución de celulosa. Entonces se hizo gotear esta disolución en isopropanol mediante lo cual precipitan las gotitas, creando una cápsula de celulosa llena de hexano.

Además, se llevaron a cabo experimentos en los que se añadió un tercer de líquido apolar (PDMS) antes de precipitar la celulosa. Al añadir PDMS como tercer componente en la mezcla y después agitar la disolución una vez más antes de la etapa de precipitación en isopropanol, se obtuvieron cubiertas de tamaño micro.

55 Además, se alimentaron 2 ml de disolución de celulosa con GLP y luego se transfirieron a una disolución de hexano. Entonces se agitó la mezcla y después de eso se movió mediante una pipeta de vidrio en isopropanol donde las cubiertas de celulosa se precipitaron y formaron.

#### Ejemplo 8: Modificación con xiloglucano-FITC de cubiertas de celulosa

65 Se añadieron 10 mg de xiloglucano (XG), con un peso molecular de 4000 Da y marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a 5 g de la disolución de DMAc y se agitaron durante aproximadamente una hora hasta que todo se disolvió. Se trató la disolución con  $\text{CO}_2$  gas durante 1 hora. Entonces, se hizo gotear la disolución en un baño de agua. Se adsorbió el XG-FITC a las cubiertas y se analizó el agua en el baño de agua con el fin de determinar si contenía cualquier XG-FITC. Mediante la adición de gotas de agua sobre una placa de CCF seguido

de posterior exposición a irradiación de UV a 360 nm, se valoró la interacción entre las cubiertas de celulosa y el XG-FITC. No se emitía luz de la placa de CCF, lo que confirma la ausencia de XG-FITC en la disolución de agua.

Discusión

5 El diámetro exterior y el grosor de las paredes de las cubiertas son al inicio relativamente grandes pero disminuyen a lo largo del tiempo hasta que se alcanza el equilibrio. El volumen del espacio dentro de las cubiertas puede verse afectado por el pH y el volumen más grande se observa a pH bajo. El hinchamiento de las cubiertas se produce hacia dentro en la dirección radial, el diámetro exterior permanece relativamente constante mientras que la pared de  
10 celulosa se expande hacia el interior tras exposición a concentraciones de sal variables y pH variable. Para las cubiertas lavadas, la pasta para disolver con el mayor D. S. presentó un mayor grosor de las paredes de las cubiertas que la pasta para disolver con menor D. S., lo que implica que la pasta con la mayor carga se hincha más cuando se añade sal o se aumenta el pH. Además, las propiedades físicas de las cubiertas pueden permitir la liberación sostenida de un compuesto modelo a lo largo de un plazo de varias horas, y la liberación puede además modularse fácilmente, lo que implica una utilidad significativa en los ajustes de administración de fármacos.  
15

La capacidad para usar técnicas microfluídicas para la preparación de las cubiertas de polímero es indicadora de la alta versatilidad y aplicabilidad de la presente invención, proporcionando diversos medios para preparar cubiertas de tamaños y formas muy variables. Además, los efectos diferenciales ejercidos por las diferentes condiciones de  
20 secado implican que aún otro parámetro puede utilizarse para controlar las características físicas de las cubiertas de polímero. Además, la modificación superficial es otra herramienta importante para ajustar las propiedades de las cubiertas de polímero, o bien mediante el uso de sales, moléculas pequeñas y/o bien polímeros de diversos orígenes.  
25

**REIVINDICACIONES**

1. Método para preparar cubiertas de polímero, que comprende las etapas de:
- 5 (a) disolver un componente de polímero en un primer disolvente, en el que el componente de polímero es un polisacárido;
- (b) disolver una sustancia formadora de núcleo en la disolución de la etapa (a), en el que la sustancia formadora de núcleo comprende al menos un gas y dicha disolución comprende
- 10 alimentar el gas a la disolución obtenida en la etapa (a), o presurizar la disolución obtenida en la etapa (a) con el gas;
- y
- (c) precipitar el componente de polímero y formar núcleos poniendo en contacto la primera disolución con un segundo disolvente de carácter polar en el que el componente de polímero es insoluble, obteniendo de ese modo cubiertas de polímero formadas alrededor de dichos núcleos.
- 15
2. Método para preparar cubiertas de polímero según la reivindicación 1, en el que la sustancia formadora de núcleo se selecciona del grupo que comprende CO<sub>2</sub>, aire, argón, nitrógeno, hidrógeno y gas licuado de petróleo (GLP).
- 20
3. Método para preparar cubiertas de polímero según la reivindicación 2, en el que la sustancia formadora de núcleo es GLP.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho componente de polímero se selecciona del grupo que consiste en celulosa, hemicelulosa, quitosano,
- 25 galactoglucomanano.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho componente de polímero se disuelve en un disolvente orgánico que comprende al menos un tipo de ión metálico en la etapa (a).
- 30
6. Método según la reivindicación 5, en el que la concentración de ión metálico en la disolución de la etapa (a) es del 0,1 al 25% p/p, preferiblemente del 5 al 10% p/p.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el ión metálico en la disolución de la etapa (a) es un ión de metal alcalino, preferiblemente Li, y en el que el primer disolvente es DMAc y en el que el segundo disolvente es un disolvente acuoso o un disolvente polar, tal como agua, isopropanol, metanol, etanol, 1,2-
- 35 dicloroetano y/o tolueno.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera disolución se pone en contacto con el segundo disolvente como resultado de al menos uno de los siguientes:
- 40 (a) el uso de un dispositivo de pulverización; o
- (b) transferencia manual.

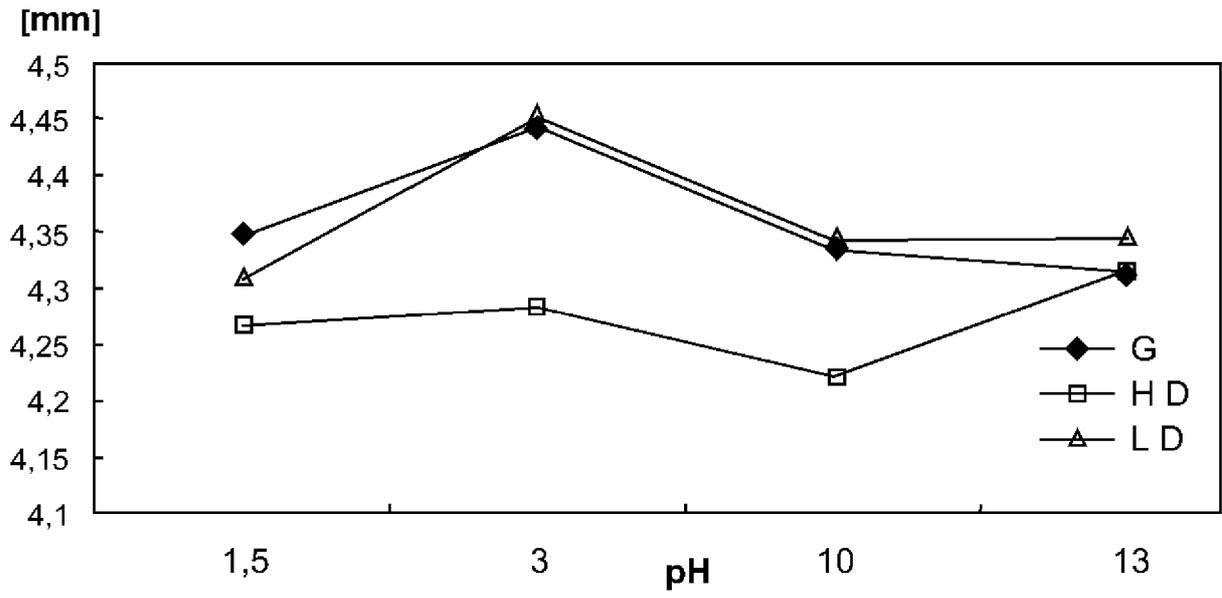


Fig. 1

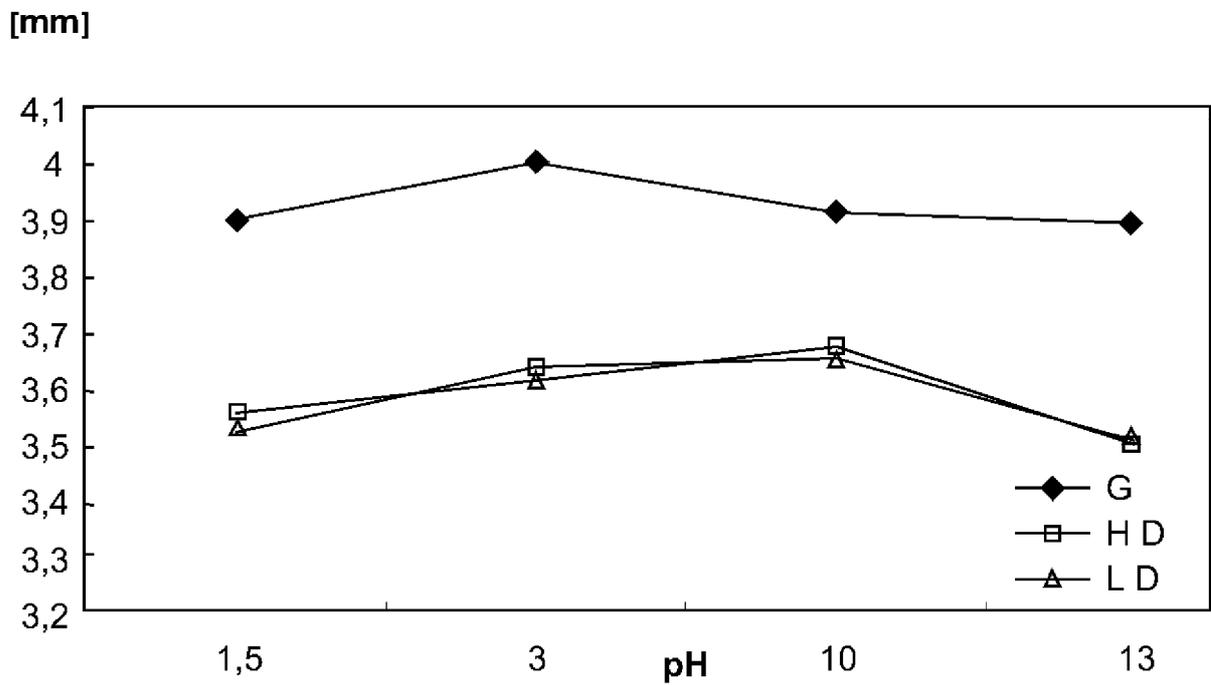


Fig. 2

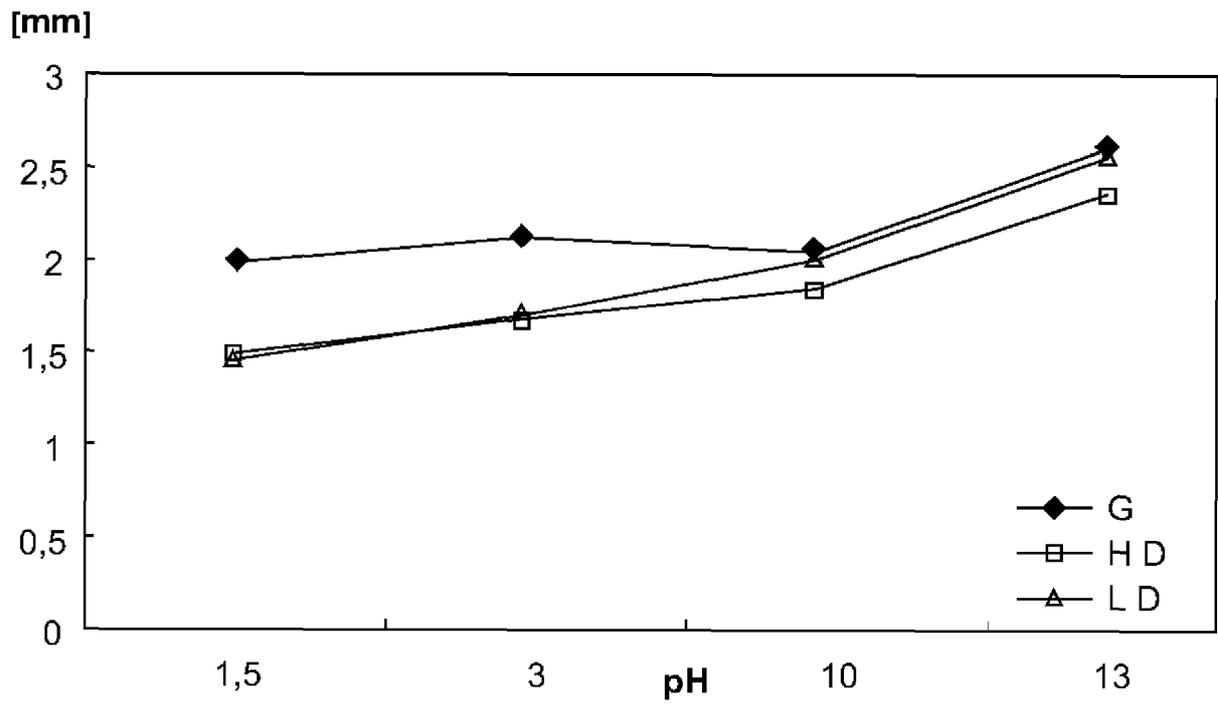


Fig. 3

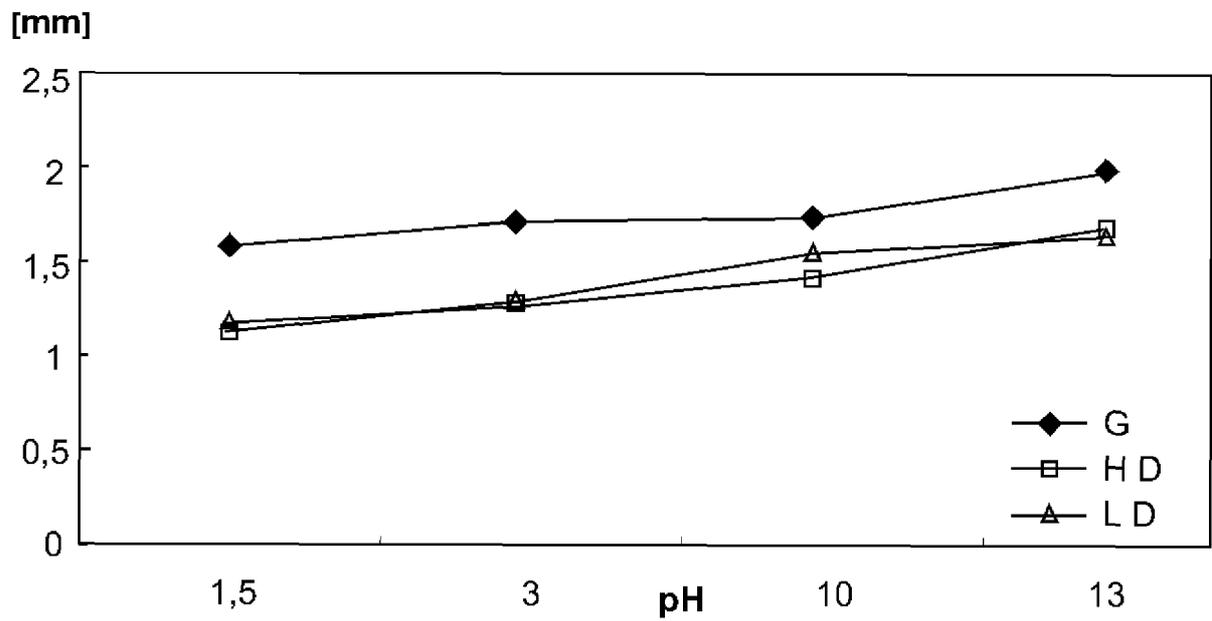


Fig. 4

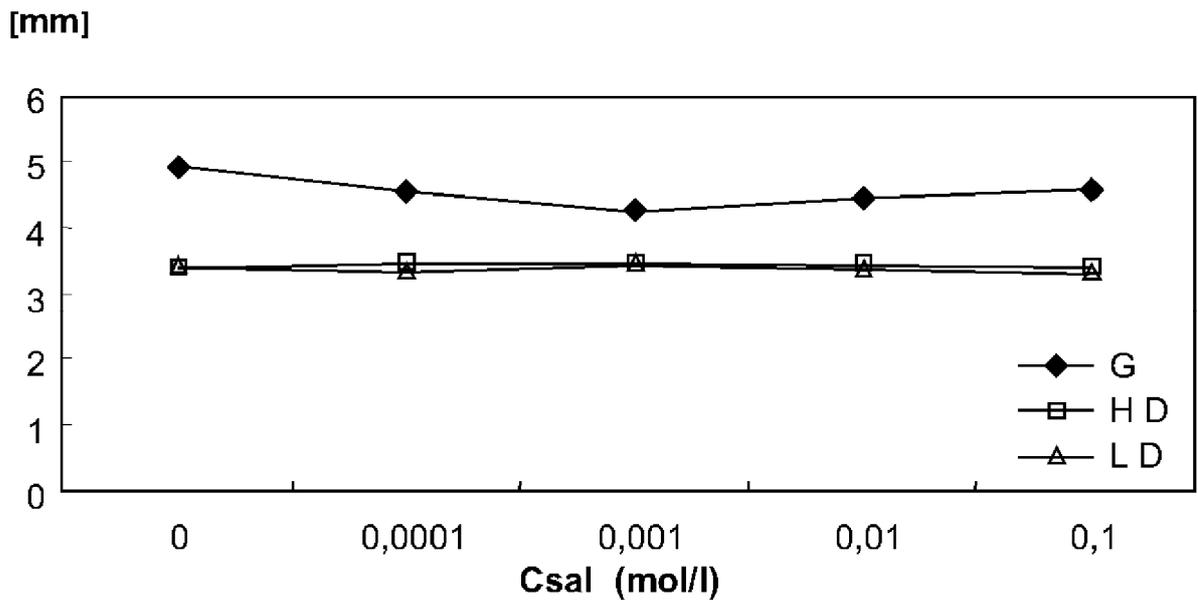


Fig. 5

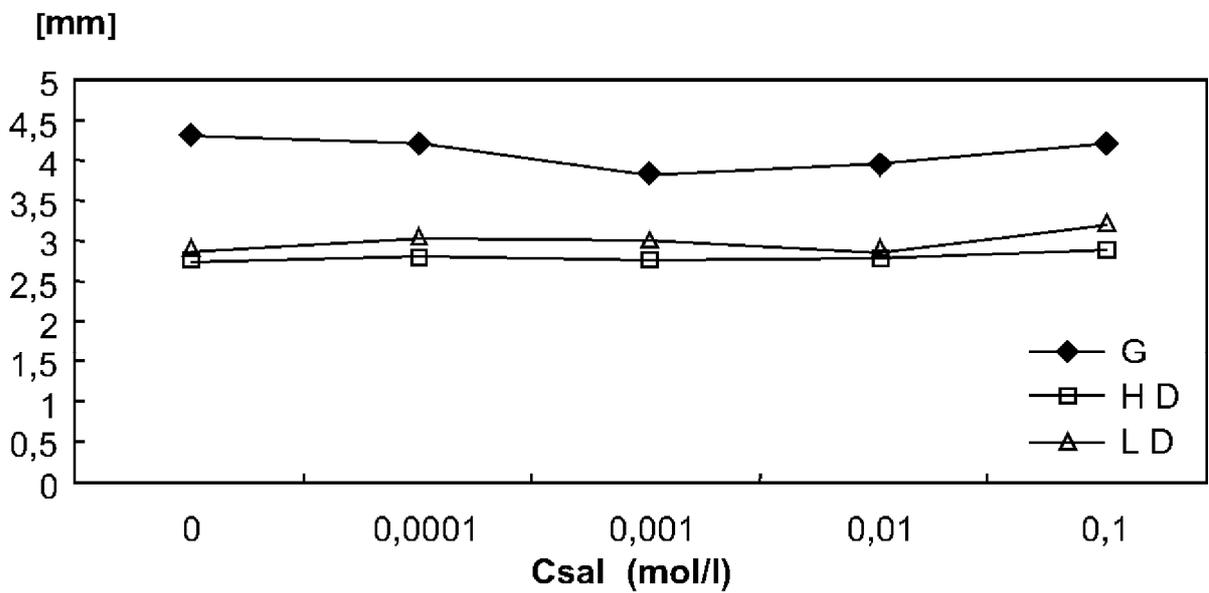


Fig. 6

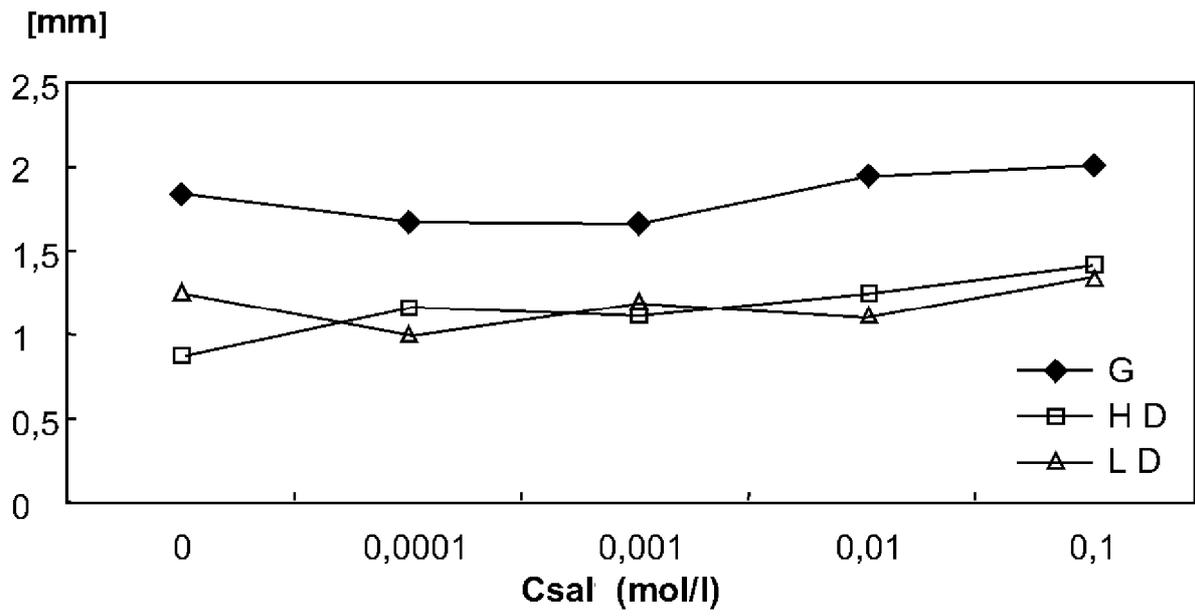


Fig. 7

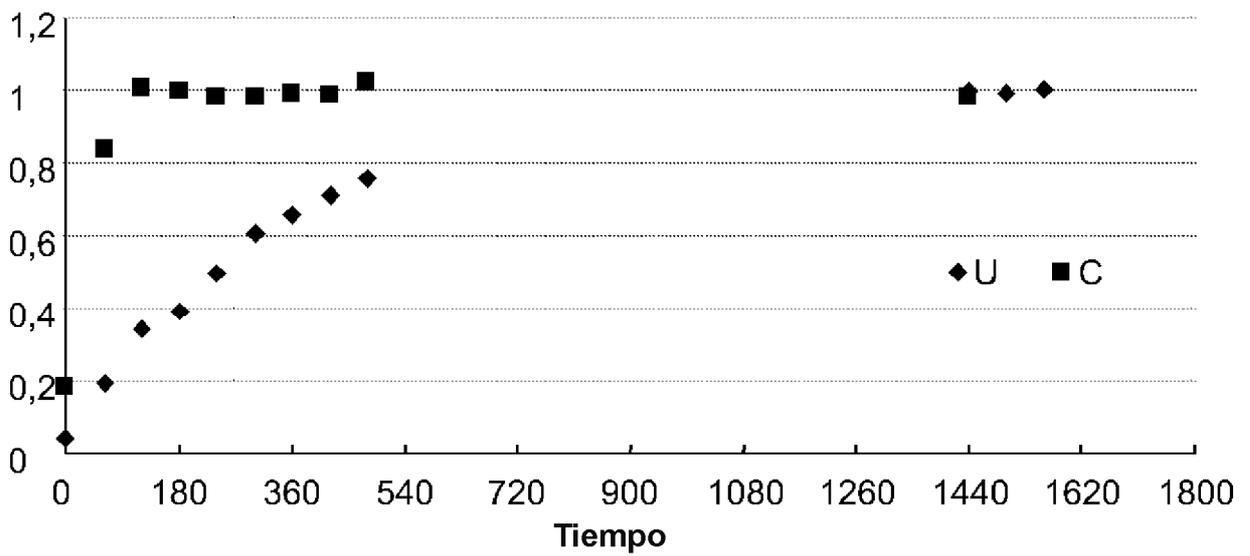


Fig. 8

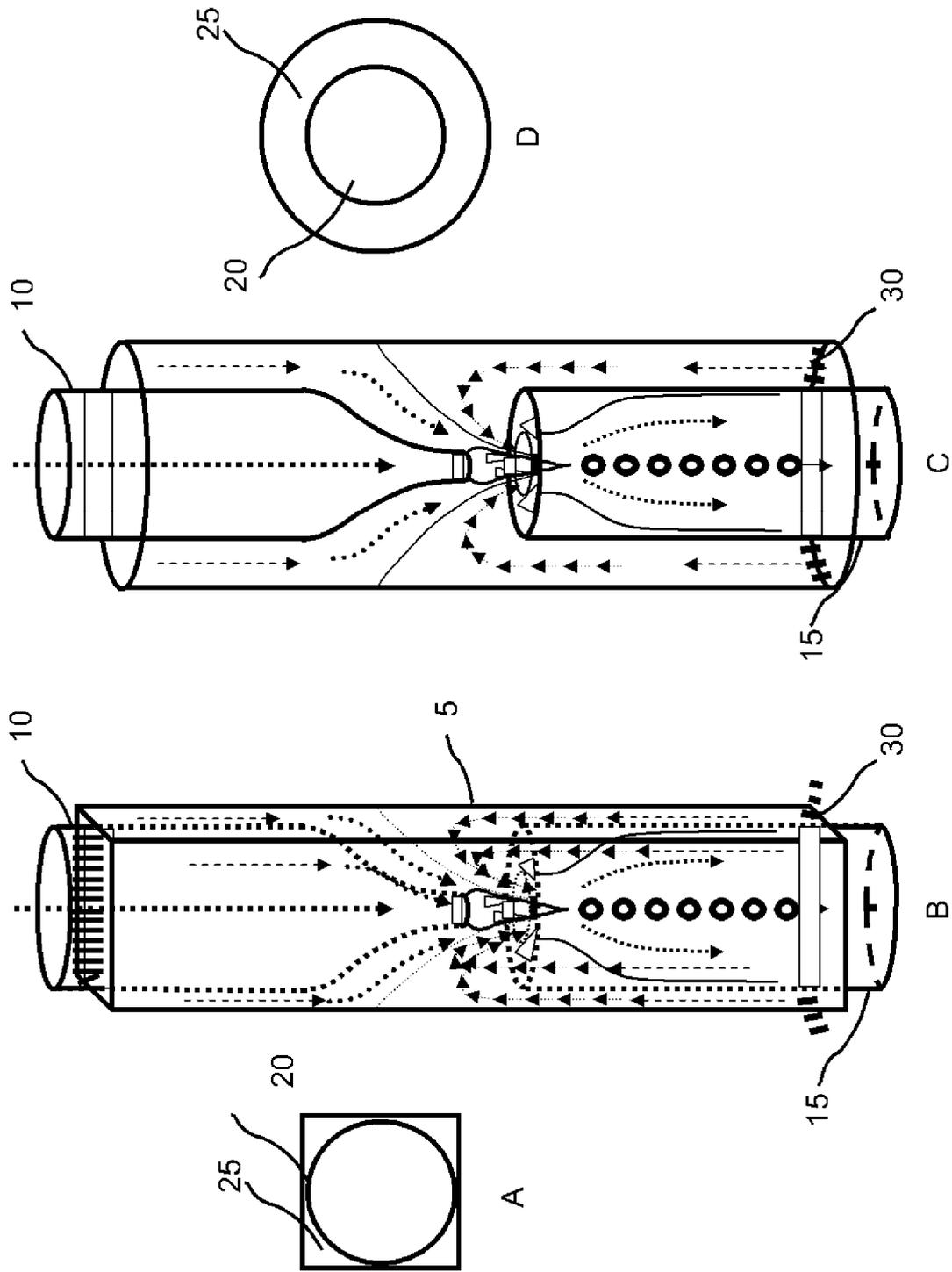


Fig. 9

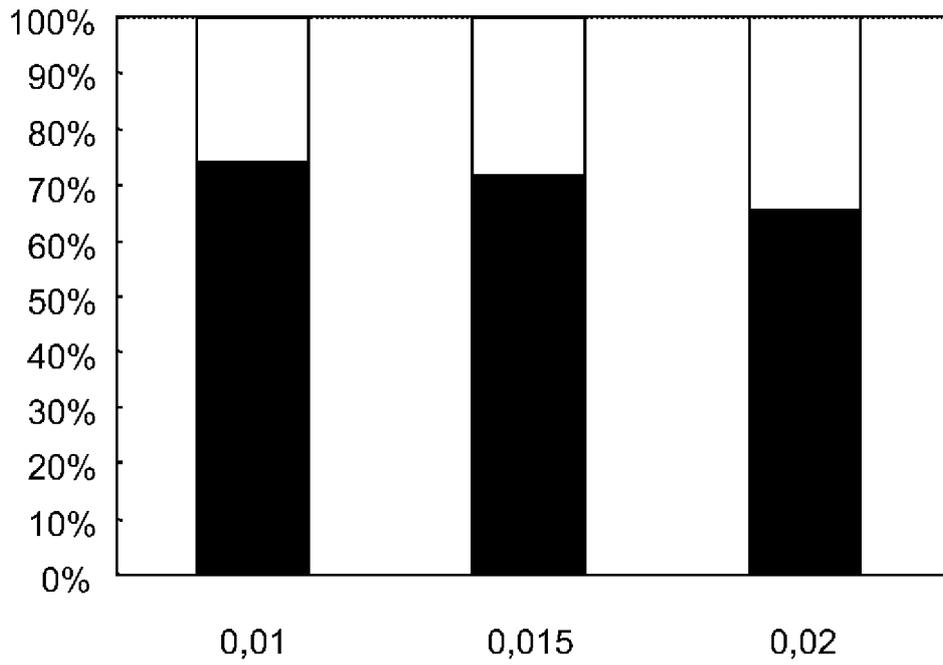


Fig. 10

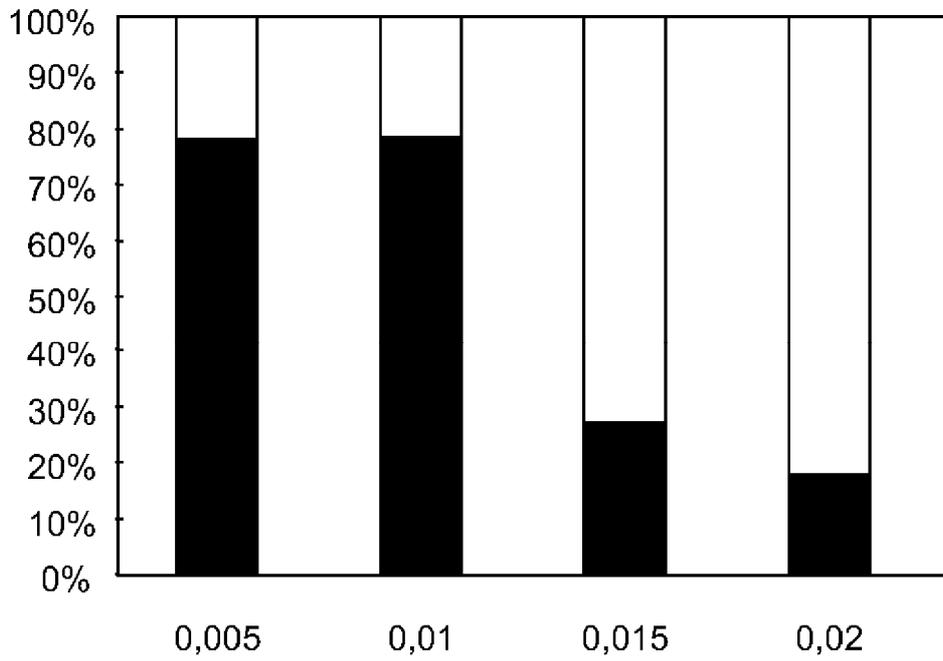


Fig. 11

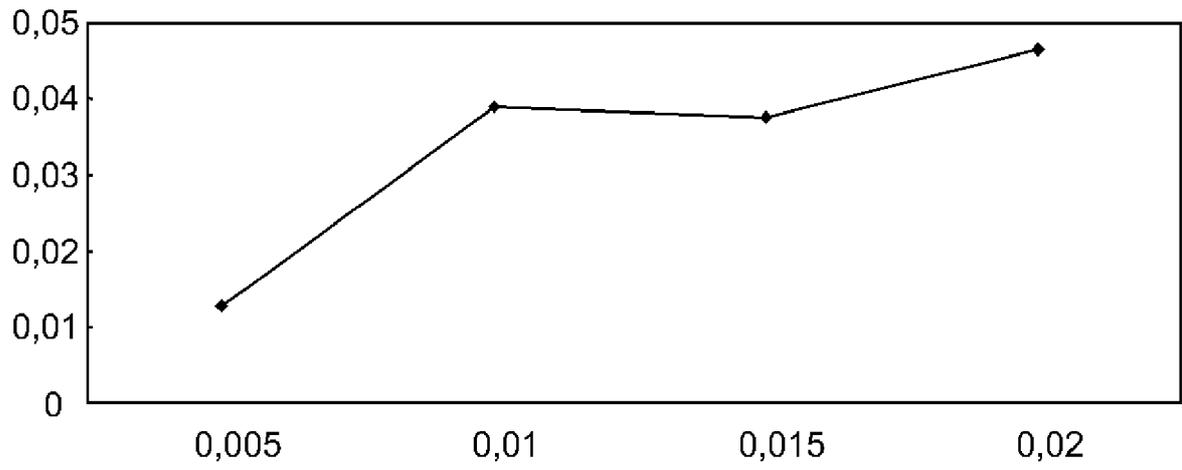


Fig. 12

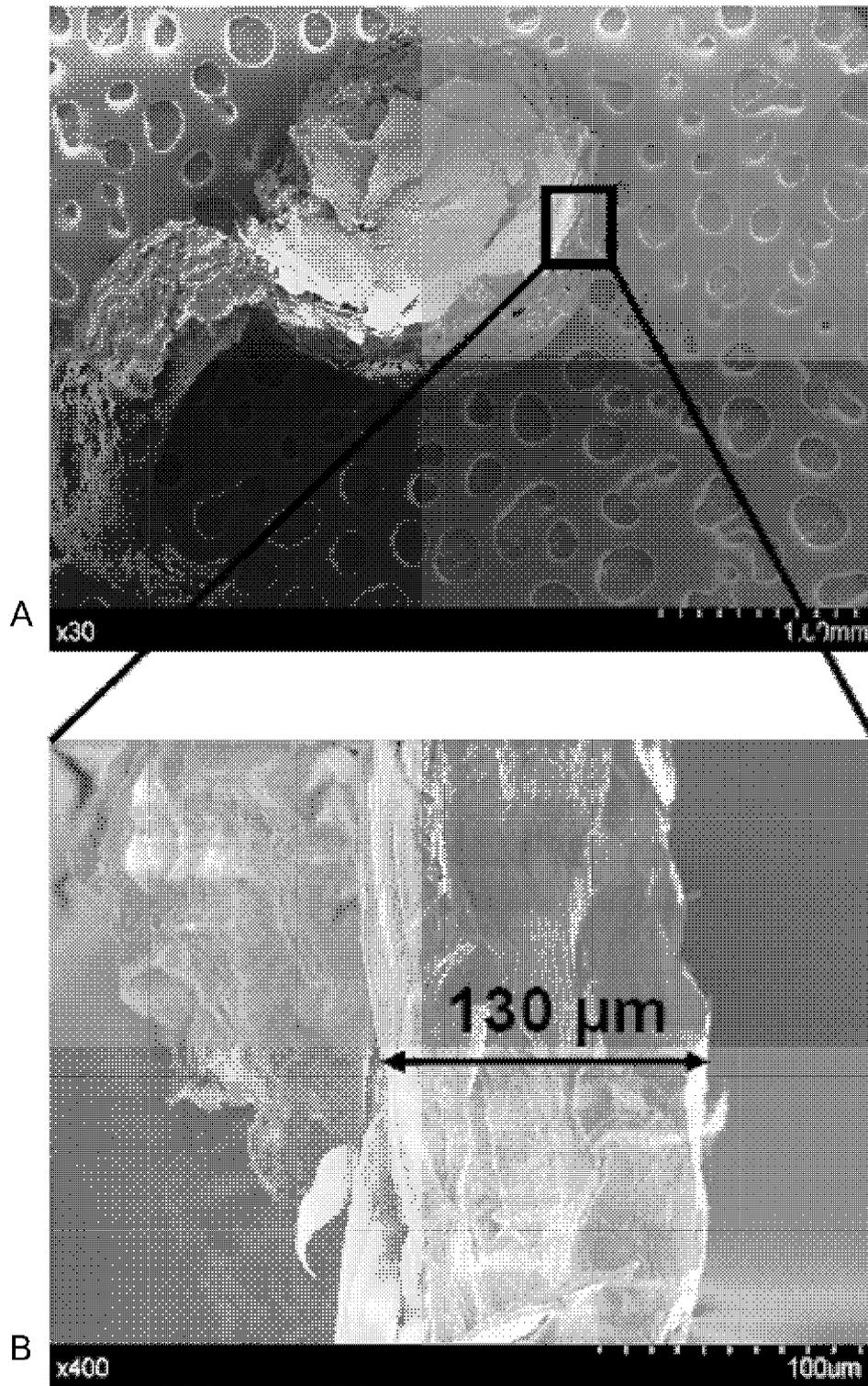


Fig. 13

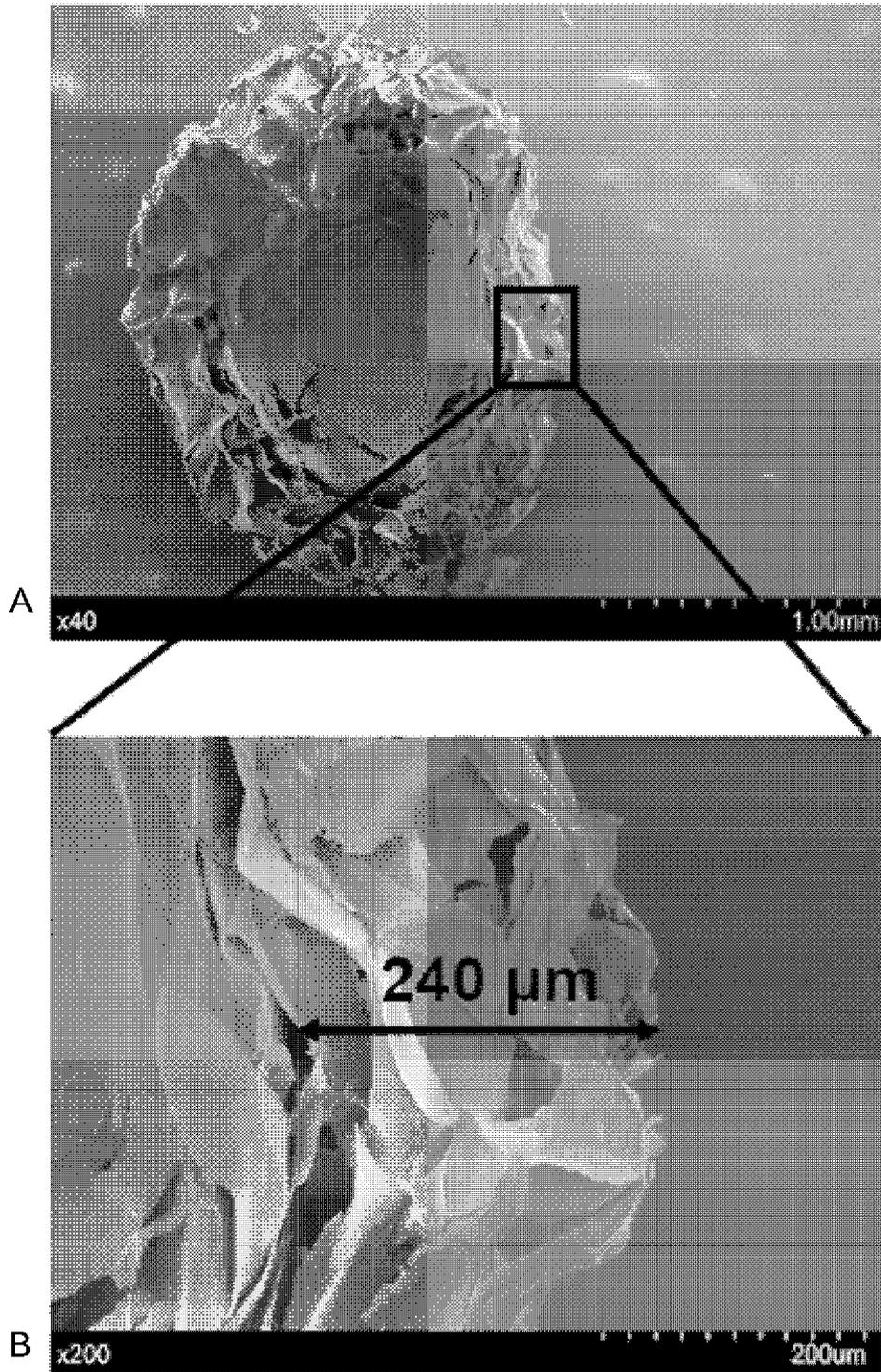


Fig. 14

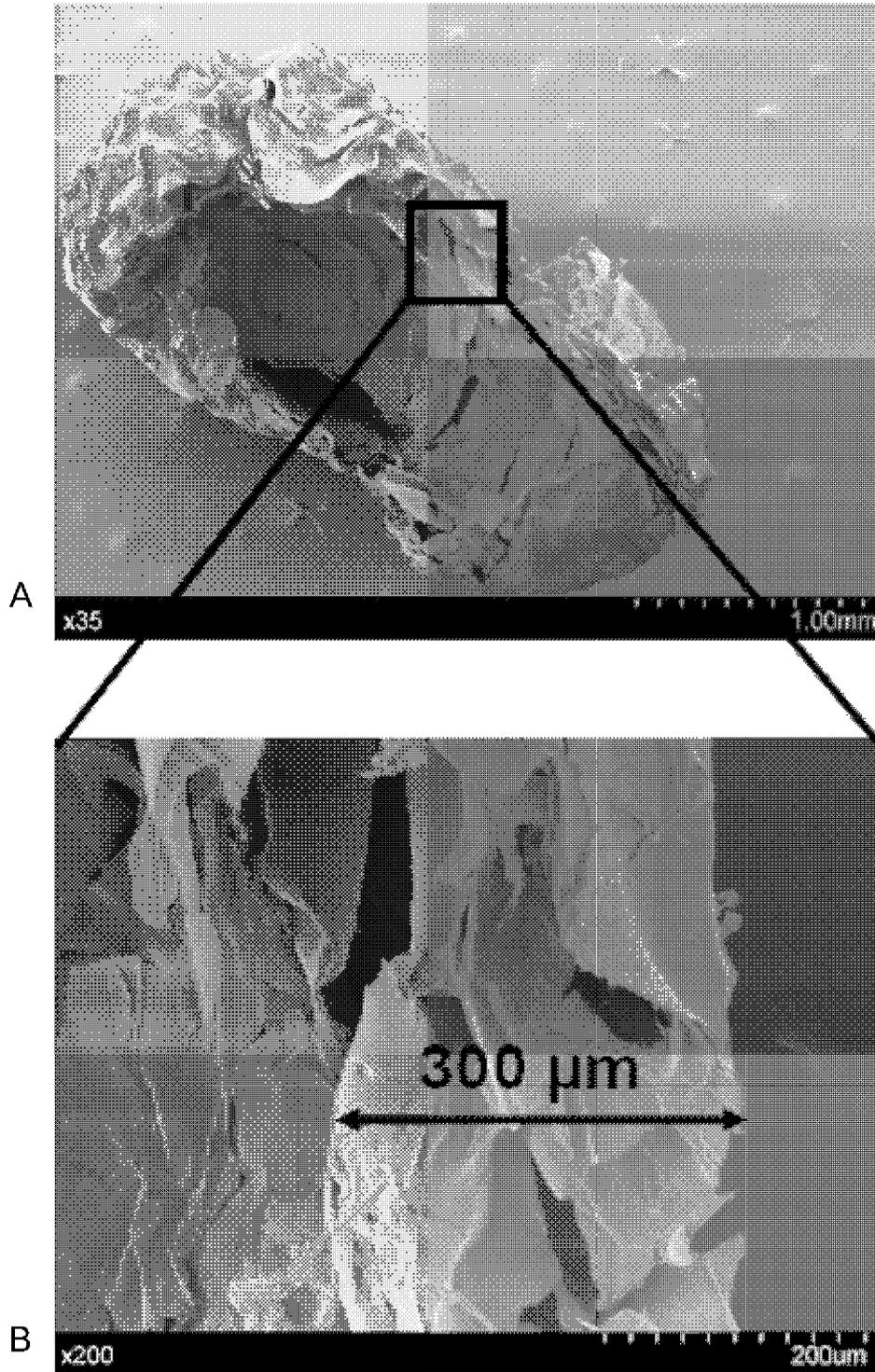


Fig. 15

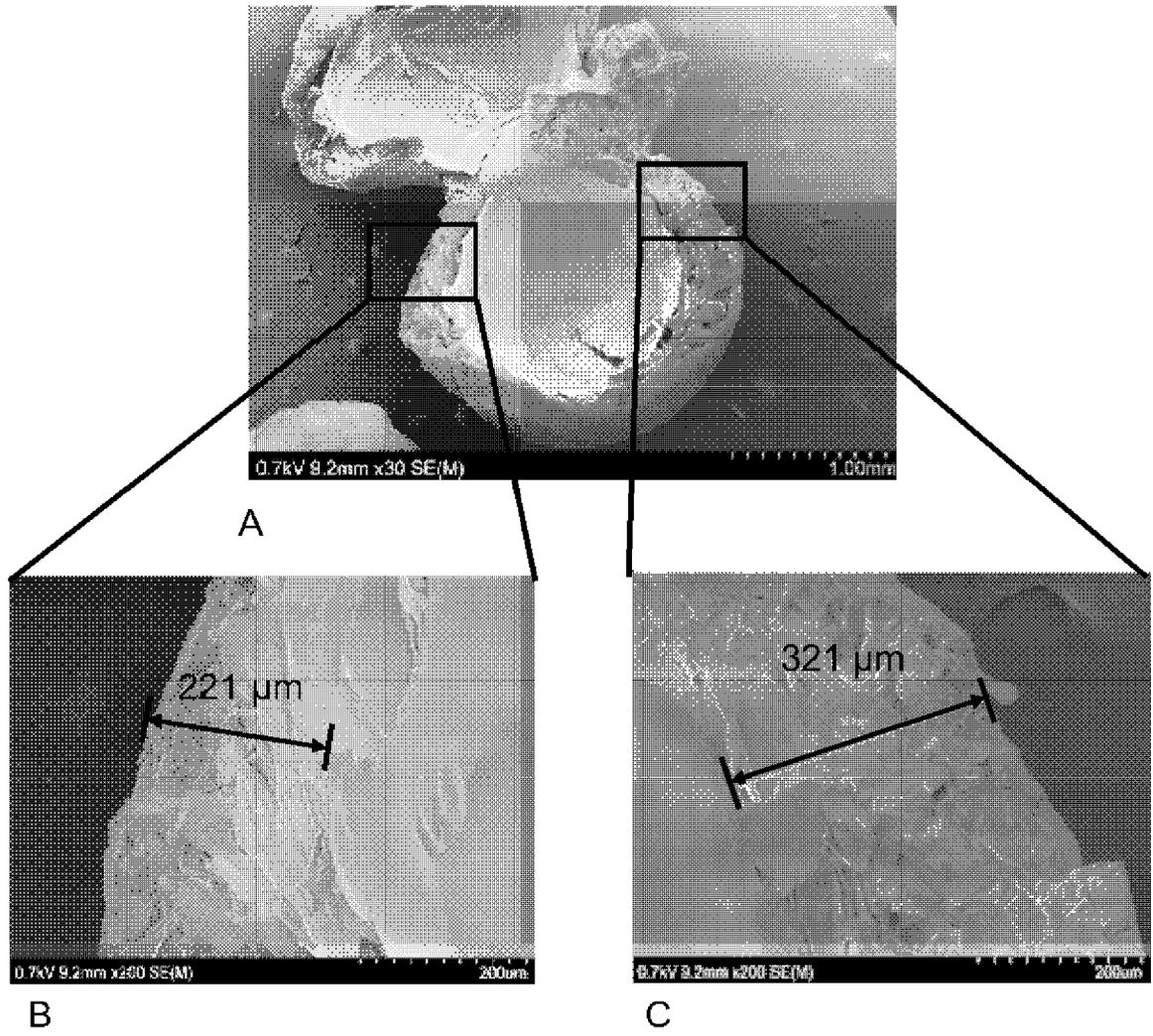


Fig. 16

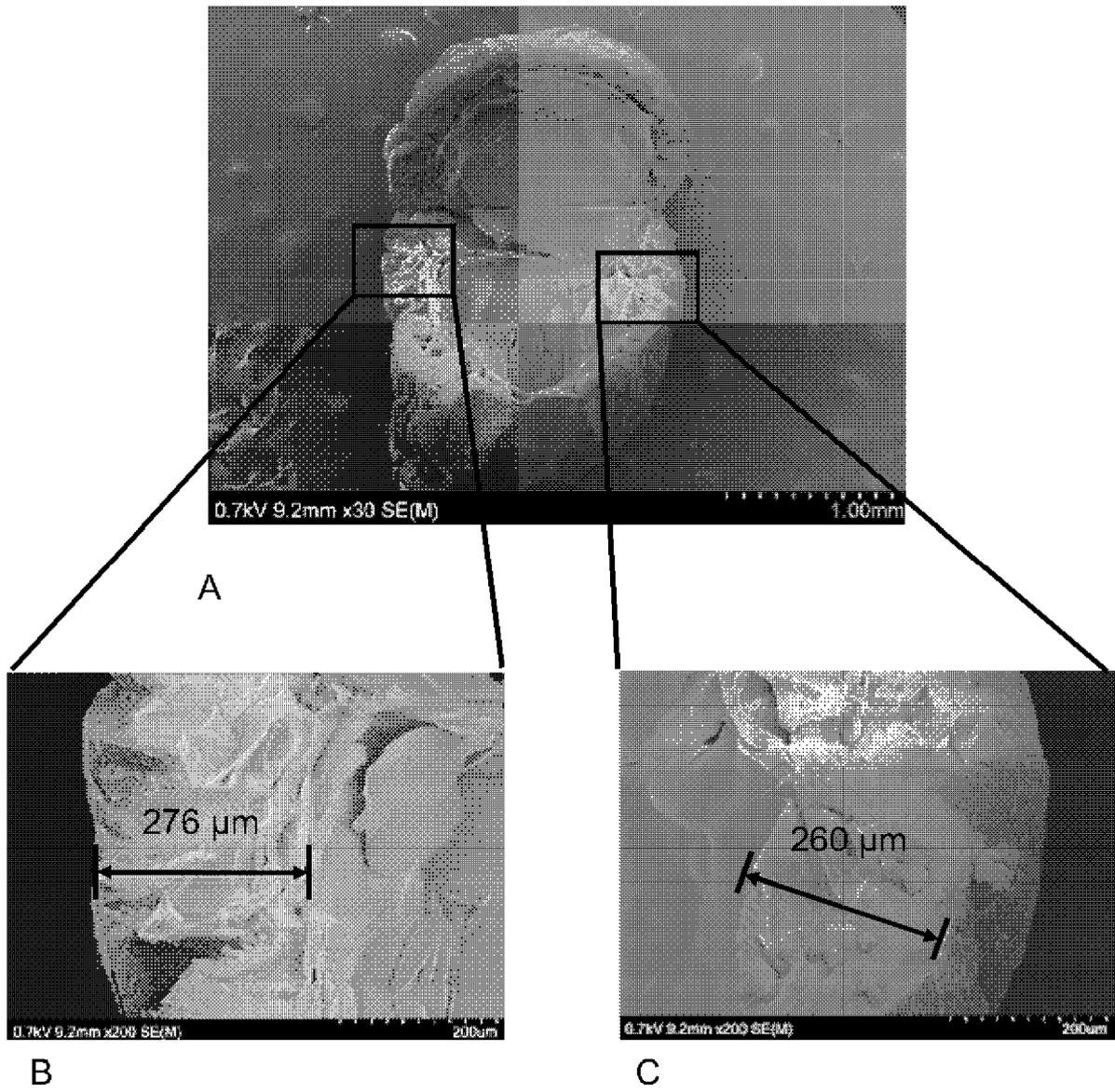


Fig. 17

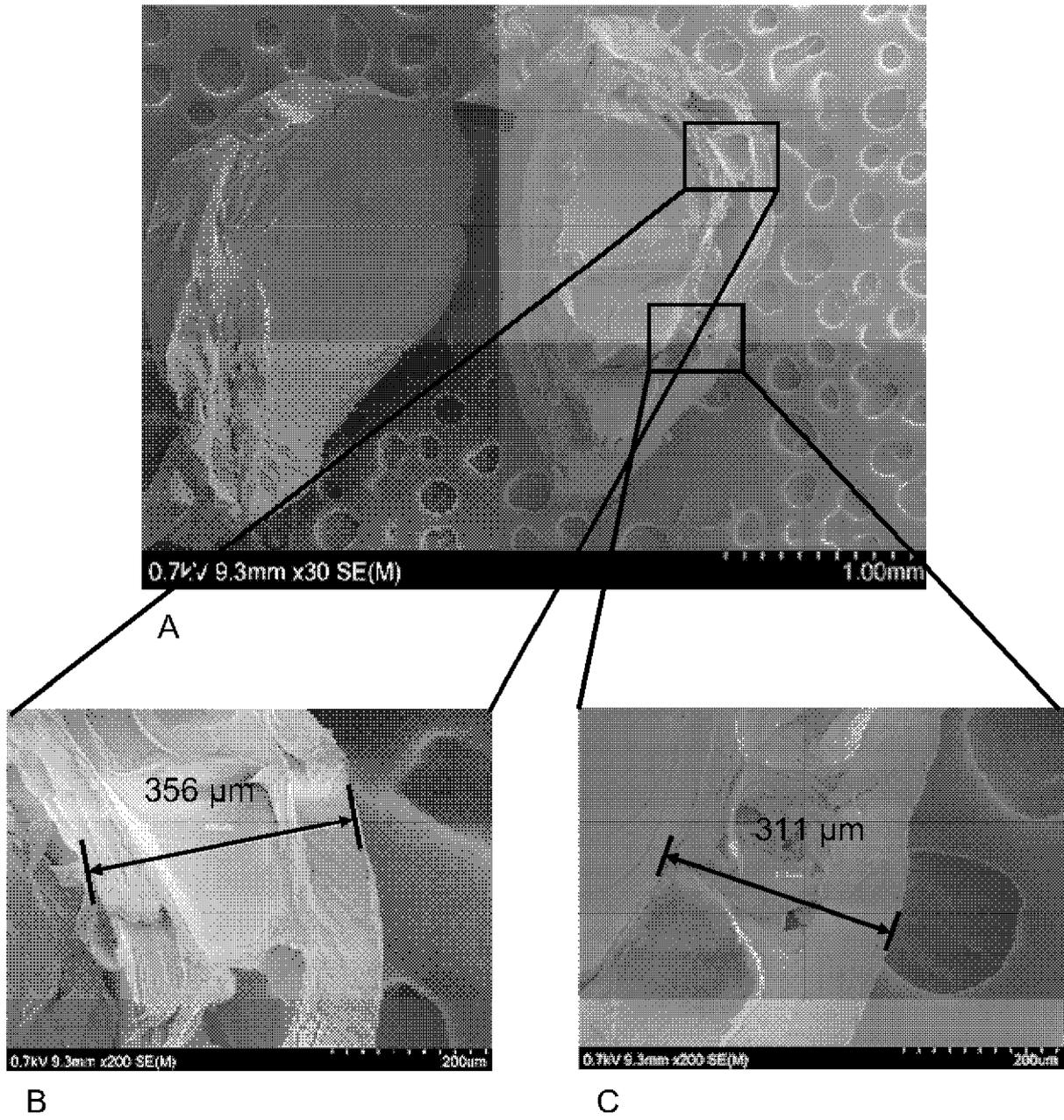
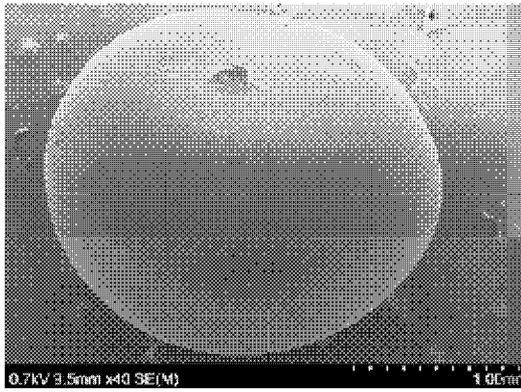
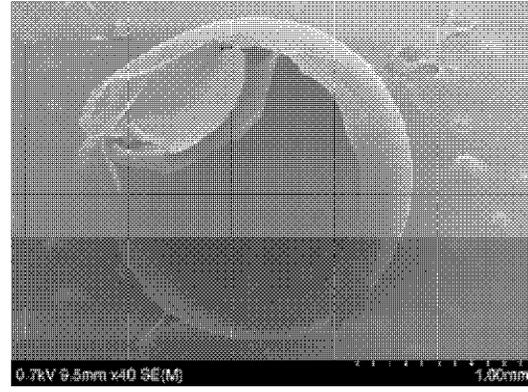


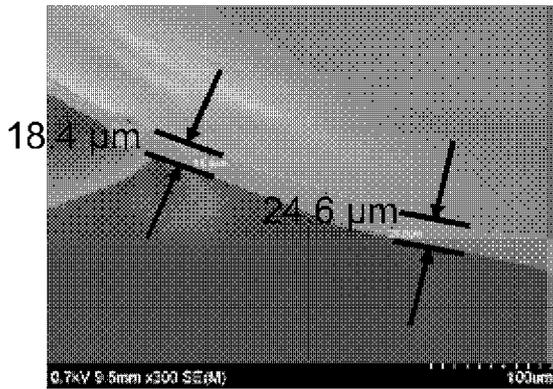
Fig. 18



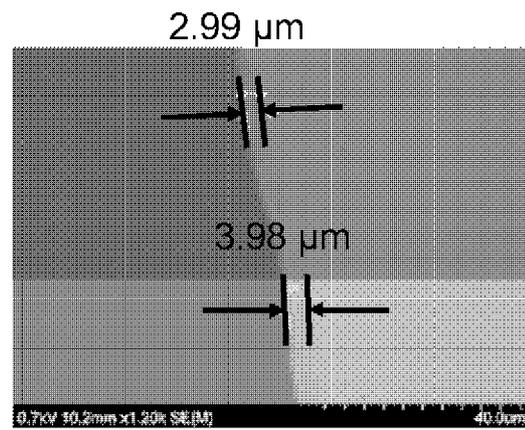
A



B



C



D

Fig. 19

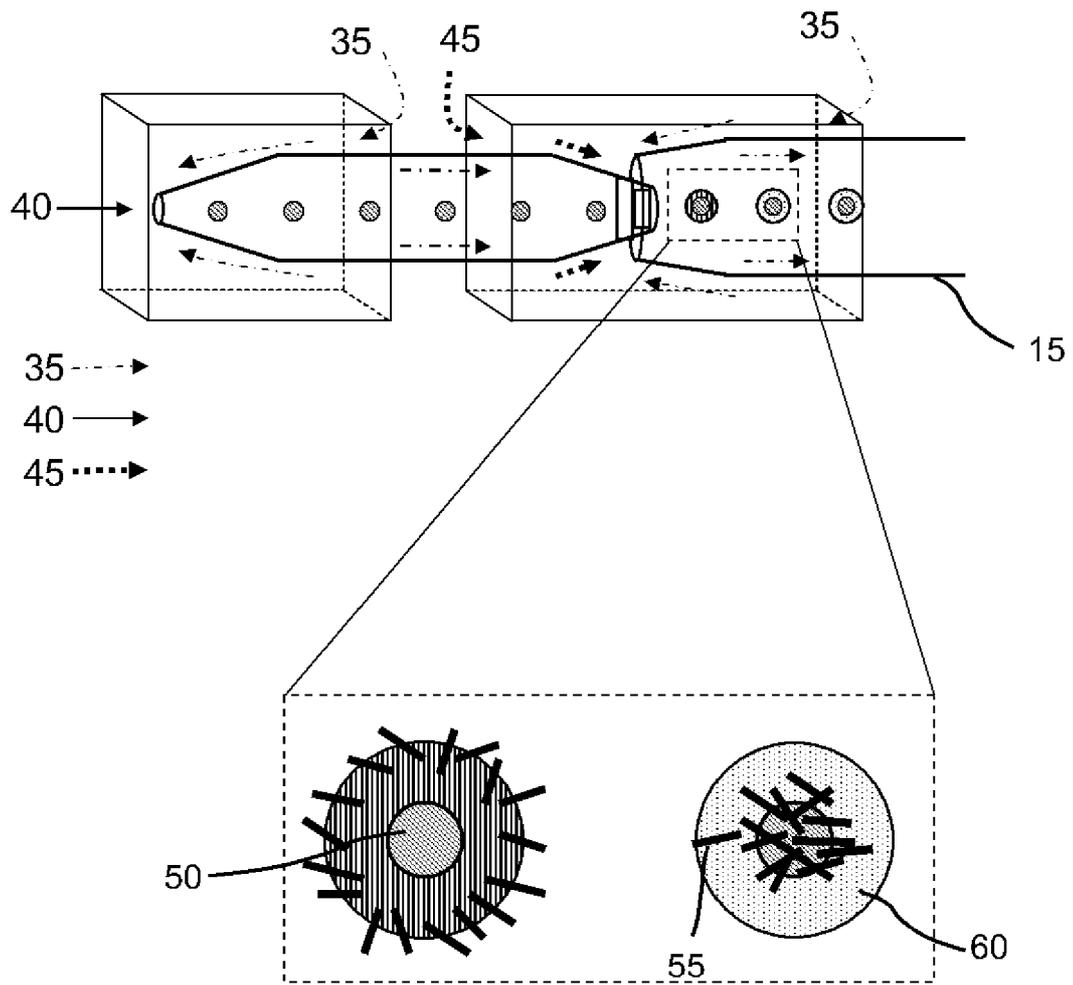


Fig. 20