

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 102**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010** **E 19175215 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.05.2021** **EP 3556356**

54 Título: **Micropartículas de dicetopiperazina con contenido de isómeros definido**

30 Prioridad:

12.06.2009 US 18677909 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
23.11.2021

73 Titular/es:

MANNKIND CORPORATION (100.0%)
30930 Russell Ranch Road Suite 301
Westlake Village CA 91362, US

72 Inventor/es:

SOMERVILLE, KARLA y
KRAFT, KELLY S

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 880 102 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

Micropartículas de dicetopiperazina con contenido de isómeros definido

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Campo técnico

- 5 Se dan a conocer en el presente documento composiciones y micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que tienen un contenido específico de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. Las micropartículas de FDKP pueden usarse como un sistema de administración de fármacos o agentes activos en el tratamiento de enfermedades o trastornos, por ejemplo, los de origen endocrino, que incluyen la diabetes y la obesidad.

Antecedentes de la invención

- 10 La administración de fármacos ha sido un problema importante durante muchos años, particularmente cuando el compuesto a administrar es inestable en las condiciones que se encuentra en el tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral a un sujeto, antes de alcanzar su ubicación objetivo. Por ejemplo, es preferible en muchos casos administrar fármacos por vía oral, especialmente en términos de facilidad de administración, cumplimiento por el paciente y disminución del costo. Sin embargo, muchos compuestos son ineficaces o exhiben una potencia baja o variable cuando se administran por vía oral. Presumiblemente esto se debe a que los fármacos son inestables en las condiciones del tracto digestivo o porque se absorben de manera ineficiente.

- 20 Debido a los problemas asociados con la administración oral de fármacos, se ha explorado la administración de fármacos a los pulmones. Por ejemplo, típicamente los fármacos administrados a los pulmones están diseñados para tener un efecto en el tejido de los pulmones, por ejemplo, como vasodilatadores, tensioactivos, agentes quimioterapéuticos o vacunas para la gripe u otras enfermedades respiratorias. Se han administrado otros fármacos, incluidos los nucleótidos, a los pulmones porque representan un tejido particularmente apropiado para el tratamiento, por ejemplo, para la terapia génica en la fibrosis quística, donde los vectores retrovirales que expresan una adenosina desaminasa defectuosa se administran a los pulmones.

- 25 También se puede realizar el suministro de fármacos a los pulmones para agentes que tienen efectos sistémicos. Las ventajas de los pulmones para el suministro de agentes sistémicos incluyen el área de superficie grande y la facilidad de absorción por la superficie de la mucosa del pulmón. Un problema asociado con todas estas formas de administración pulmonar de fármacos es que es difícil administrar fármacos a los pulmones debido a problemas para superar las barreras naturales, tales como los cilios que recubren la tráquea y a tratar de administrar un volumen y peso uniformes del fármaco.

- 30 En consecuencia, hay margen de mejora en la administración pulmonar de fármacos.

Compendio

- 35 La presente divulgación proporciona sistemas, micropartículas y métodos que permiten un suministro mejorado de fármacos a los pulmones. Las realizaciones divulgadas en el presente documento logran un suministro mejorado proporcionando micropartículas de dicetopiperazina que comprenden un contenido de isómero definido. En particular, las micropartículas de dicetopiperazina se ejemplifican por el compuesto fumaril dicetopiperazina (FDKP) que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. Las micropartículas de FDKP que tienen un contenido de isómero trans en este intervalo exhiben características beneficiosas para el suministro de fármacos a los pulmones, tales como una actuación aerodinámica mejorada.

- 40 Una realización divulgada en el presente documento comprende micropartículas de FDKP que comprenden un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. En otras realizaciones de las micropartículas de FDKP, el contenido de isómero trans puede ser de aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, de aproximadamente 52% a 62%, o de aproximadamente 53% a aproximadamente 65%. En otra realización de las micropartículas de FDKP, el contenido de isómero trans es de aproximadamente 53% a aproximadamente 63%.

- 45 En otra realización, las micropartículas de FDKP comprenden un fármaco o compuesto activo. En varias realizaciones de las partículas de FDKP el fármaco puede ser, por ejemplo, un péptido incluyendo insulina, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), glucagón, exendina, hormona paratiroidea, calcitonina, oxintomodulina y similares. En otra realización de las micropartículas de FDKP el contenido de péptido puede variar dependiendo de las condiciones de procesamiento aguas abajo. En un ejemplo particular, las micropartículas de FDKP pueden prepararse para tener un contenido de fármaco/péptido que puede variar dependiendo de la dosis a ser dirigida o administrada. Por ejemplo, en donde el fármaco es la insulina, el componente de insulina puede ser de aproximadamente 3 U/mg a aproximadamente 4 U/mg en la formulación en polvo que comprende las micropartículas.

Las realizaciones divulgadas en el presente documento también incluyen polvos secos que comprenden las micropartículas. En una realización, los polvos secos comprenden micropartículas de FDKP que comprenden un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. En otras realizaciones de los polvos

secos, las micropartículas de FDKP pueden tener un contenido de isómero trans de aproximadamente 50% a aproximadamente 65%, de aproximadamente 52% a 62%, o de aproximadamente 53% a aproximadamente 65%. En otra realización de los polvos secos que comprenden las micropartículas de FDKP, el contenido de isómero trans es de aproximadamente 53% a aproximadamente 63%.

En otra realización de los polvos secos, las micropartículas de FDKP comprenden un fármaco. En otra realización de los polvos secos, el fármaco es un péptido de varios tamaños moleculares o masas, que incluye; insulina, péptido 1 similar al glucagón, glucagón, exendina, hormona paratiroidea, calcitonina, oxintomodulina y similares. En una realización de los polvos secos, en donde el contenido de isómero trans de la fumaril dicetopiperazina varía entre 45% y 65% y el fármaco es la insulina, el contenido de insulina de las micropartículas de FDKP es de aproximadamente 3 U/mg a aproximadamente 4 U/mg. En ciertas realizaciones el fármaco se adsorbe en las superficies de las micropartículas

Otras realizaciones se refieren a sistemas de suministro de fármacos que comprenden un inhalador, un recipiente de medicamento en polvo seco de dosis unitaria, por ejemplo, un cartucho y un polvo que comprende las micropartículas divulgadas en el presente documento y un agente activo. En una realización, el sistema de suministro para uso con los polvos secos incluye un sistema de inhalación que comprende un inhalador de alta resistencia que tiene conductos de aire que imparten una alta resistencia al flujo de aire a través de los conductos para desaglomerar y dispensar el polvo. En una realización, el sistema de inhalación tiene un valor de resistencia de, por ejemplo, aproximadamente 0,065 a aproximadamente 0,200 (√kPa)/litro por minuto. En ciertas realizaciones, los polvos secos pueden administrarse eficazmente por inhalación con un sistema de inhalación en donde el diferencial de presión de inhalación máximo puede variar de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 kPa, lo que puede producir velocidades de flujo máximo resultantes de aproximadamente entre 7 y 70 litros por minuto. En ciertas realizaciones, el sistema de inhalación está configurado para proporcionar una dosis única descargando polvo del inhalador como un flujo continuo, o como uno o más pulsos de polvo entregados a un paciente. En algunas realizaciones divulgadas aquí, el sistema inhalador de polvo seco comprende un equilibrio de flujo de masa predeterminado dentro del inhalador. Por ejemplo, un equilibrio de flujo de aproximadamente 10% a 70% del flujo total que sale del inhalador y hacia el paciente es administrado por uno o más puertos de dispensación, cuyo flujo de aire pasa a través del área que contiene la formulación en polvo, y en donde aproximadamente del 30% al 90% del flujo de aire se genera desde otros conductos del inhalador. Además, el flujo de derivación, o el flujo que no entra y sale del área de contención del polvo, tal como a través de un cartucho, puede recombinarse con el flujo que sale del puerto de distribución de polvo dentro del inhalador para diluir, acelerar y finalmente desaglomerar el polvo fluidizado antes de salir de la boquilla. En una realización, los caudales que varían de aproximadamente 7 a 70 litros por minuto dan como resultado más del 75% del recipiente o el contenido del cartucho dispensado en masas de llenado entre 1 y 30 mg. En ciertas realizaciones, un sistema de inhalación como se describió anteriormente puede emitir una fracción respirable/llenado de una dosis de polvo en porcentajes mayores del 40%. En una sola inhalación, mayores del 50%, mayores del 60% o mayores del 70%.

En realizaciones particulares, se proporciona un sistema de inhalación que comprende un inhalador de polvo seco, una formulación de polvo seco que comprende micropartículas de fumaril dicetopiperazina que tienen un contenido de isómero trans de FDKP entre 45% y 65% y uno o más de un agente activo. En algunos aspectos de esta realización del sistema de inhalación, la formulación de polvo seco se proporciona en un cartucho de dosis unitaria. Alternativamente, la formulación de polvo seco puede precargarse en el inhalador. En esta realización, la configuración estructural del sistema de inhalación permite que el mecanismo de desaglomeración del inhalador produzca fracciones respirables superiores al 50%; es decir, más de la mitad del polvo contenido en el inhalador (cartucho) se emite como partículas de menos de 5,8 µm. Los inhaladores pueden descargar más del 85% de un medicamento en polvo contenido dentro de un recipiente durante la dosificación. En ciertas realizaciones, los inhaladores pueden descargar más del 85% de un medicamento en polvo contenido en una sola inhalación. En una realización, los inhaladores pueden descargar más del 90% del contenido del cartucho o del contenido del recipiente en menos de 3 segundos a diferenciales de presión entre 2 y 5 kPa con masas de llenado que varían hasta 30 mg.

Las realizaciones divulgadas en el presente documento también incluyen métodos. En una realización está un método para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con el sistema endocrino que comprende administrar a una persona que lo necesita una formulación de polvo seco que comprende micropartículas de FDKP que comprenden un contenido de isómero trans de FDKP de aproximadamente 45 a aproximadamente 65% y un fármaco adecuado para tratar dicha enfermedad o trastorno. Una realización incluye un método para tratar un trastorno relacionado con la insulina que comprende administrar un polvo seco que comprende las micropartículas de FDKP descritas anteriormente a una persona que lo necesita. El método comprende administrar a un sujeto una formulación de polvo seco que comprende micropartículas de fumaril dicetopiperazina que tienen un contenido de isómero trans que varía de aproximadamente 45% a 65% o de aproximadamente 45% a aproximadamente 63%. En diversas realizaciones, un trastorno relacionado con la insulina puede incluir o excluir específicamente cualquiera o la totalidad de las pre-diabetes, diabetes melitus tipo 1 (fase de luna de miel, fase posterior a la luna de miel, o ambas), diabetes melitus tipo 2, diabetes gestacional, hipoglucemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina, disfunción secretora, alteración de la liberación de insulina en la fase temprana, pérdida de la función de las células β pancreáticas, pérdida de las células β pancreáticas y trastorno metabólico. En una realización, el polvo seco comprende insulina. En otras realizaciones, el polvo seco comprende, glucagón, una exendina o GLP-1.

Otra realización divulgada en el presente documento incluye un método para preparar micropartículas adecuadas para la administración pulmonar como un polvo seco que comprende: a) sintetizar un compuesto FDKP que tiene un

contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%; b) determinar el contenido de isómero trans del compuesto FDKP para evaluar que el intervalo de contenido de isómero trans es de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%; c) disolver el compuesto FDKP de la etapa b) en una solución que tiene un pH básico para formar una solución de FDKP; d) proporcionar una solución de un ácido volátil, y e) mezclar la solución de FDKP con la solución de un ácido volátil en un mezclador de alto cizallamiento para producir las micropartículas. En una realización, la etapa de determinar el contenido de isómero trans del compuesto FDKP se realiza usando cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En realizaciones alternativas, el contenido de isómero se determina después de la formación de partículas.

En otra realización, se describe un método para sintetizar una dicetopiperazina que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%, el método comprende: proporcionar una dicetopiperazina que tiene un grupo éster; saponificar el grupo éster de la dicetopiperazina en una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua a un pH básico; y recrystallizar la dicetopiperazina en una mezcla de reacción que comprende ácido trifluoroacético y ácido glacial en una relación resultante que varía de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7, respectivamente. En esta y otras realizaciones, la mezcla de reacción en la etapa de recrystallización se mantiene o se permite que continúe durante un período de aproximadamente 4 horas o mayor de 4 horas.

En una realización del método de síntesis, el disolvente miscible en agua es un alcohol, que incluye metanol, etanol o isopropanol. También se pueden usar otros disolventes tales como tetrahidrofurano, dioxano, acetona y acetonitrilo. En esta y otras realizaciones, el método comprende además la etapa de determinar el contenido de isómero trans de la dicetopiperazina.

En una realización específica, el método de hacer una dicetopiperazina que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%, utiliza una dicetopiperazina que tiene la fórmula 2,5-diceto-3,6-bis (N-X-4-aminobutil)piperazina, en donde X se selecciona del grupo que consiste en fumarilo, succinilo, maleilo y glutarilo. En una realización de ejemplo, la dicetopiperazina tiene la fórmula 2,5-diceto-3,6-bis(N-fumaril-4-aminobutil)piperazina.

En realizaciones particulares, el método para preparar un compuesto de DKP que tiene un contenido de isómero trans de DKP que varía de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% comprende una reacción de saponificación y una reacción de recrystallización. En una realización, el método comprende una reacción de saponificación de un compuesto de una dicetopiperazina que comprende un grupo protector de éster, lo que incluye un éster alquílico tal como un éster etílico o éster metílico. En una realización, la etapa de sintetizar un compuesto FDKP que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% comprende saponificar un éster de FDKP en un disolvente tal como un disolvente a base de agua y añadir una base. En una realización particular, el método comprende disolver la DKP tal como el éster etílico de fumarildicetopiperazina en un disolvente tal como agua:metanol en una relación de 1:1 a aproximadamente 3:1, respectivamente. En otras realizaciones, se pueden usar otros disolventes miscibles con agua, que incluyen otros alcoholes, tetrahidrofurano, dioxano, acetona, acetonitrilo y similares. En una realización, el disolvente puede comprender solo agua. En esta y otras realizaciones, la reacción de saponificación comprende además agregar una solución que comprende hidróxido de sodio; mantener la mezcla de reacción a una temperatura que varía de aproximadamente 20° C a aproximadamente 60° C o en condiciones de reflujo; filtrar la mezcla de reacción para producir un filtrado; añadir una solución ácida al filtrado y recoger el material sólido formado por filtración y lavar el material sólido FDKP. El material sólido se puede analizar para determinar el contenido de isómero trans de las partículas de FDKP formadas.

En una realización particular, el método comprende recrystallizar el material de FDKP lo que comprende calentar una suspensión de FDKP en ácido trifluoroacético a aproximadamente de 40° C a aproximadamente 85° C durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas y enfriar la reacción; añadir ácido acético glacial a la solución y enfriar la suspensión durante aproximadamente de 1 a aproximadamente 24 horas a aproximadamente 20° C. En una realización, la etapa de cristalización comprende conducir la reacción a una temperatura de cristalización que varía de aproximadamente 15° C a aproximadamente 25° C, durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6,5 horas en una solución que comprende ácido trifluoroacético:ácido acético glacial, respectivamente, en una relación que varía de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7. En esta realización, el método comprende además lavar la mezcla de reacción con ácido acético glacial y enfriar la temperatura de la reacción a una velocidad de aproximadamente 7° C a aproximadamente 10° C por hora. Se puede usar otras velocidades de enfriamiento para obtener un material de FDKP que tenga el contenido de isómero deseado.

Otra realización divulgada en el presente documento incluye un método para administrar insulina a un paciente que lo necesita que comprende administrar un polvo seco que comprende micropartículas de dicetopiperazina divulgadas en el presente documento al pulmón profundo por inhalación del polvo seco por el paciente. En aspectos de esta realización, se especifican características particulares de un sistema inhalador.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de los ejemplos divulgados en el presente documento. La divulgación puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas

en el presente documento.

FIG. 1 representa la actuación aerodinámica del polvo en función del contenido % de isómero trans;

FIG. 2 representa etapas en un esquema sintético que pueden controlarse para producir FDKP con un contenido de isómero trans de aproximadamente 45 a aproximadamente 65%;

5 FIG. 3 representa el contenido % de isómero trans en función de la adición lenta de NaOH durante la etapa de saponificación del esquema representado en la FIG. 2;

FIG. 4 representa el contenido % de isómero trans después de la recristalización de ácido trifluoroacético (TFA) usando un gradiente de enfriamiento rápido;

10 FIG. 5 representa un esquema de un proceso para fabricar micropartículas de FDKP cargadas de insulina con un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%; y

FIG. 6 representa un análisis de metodología de superficie de respuesta para contenido de isómero trans.

Descripción detallada

15 Como se indicó, el suministro de fármacos a los pulmones ofrece muchas ventajas. Sin embargo, es difícil administrar fármacos a los pulmones debido a problemas en el transporte de los fármacos más allá de las barreras físicas naturales en un volumen y peso uniforme del fármaco. En el presente documento se divulgan dicetopiperazinas que tienen un contenido definido de isómeros trans, micropartículas como agentes de administración de fármacos, métodos para obtener las micropartículas y métodos de tratamiento que usan las micropartículas.

20 Como se usa en el presente documento, el término "micropartícula" se refiere a una partícula con un diámetro de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1000 μm , independientemente de la estructura exterior o interior precisa. Las micropartículas que tienen un diámetro de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 micras pueden llegar a los pulmones, pasando con éxito la mayoría de las barreras naturales. Se requiere un diámetro de menos de aproximadamente 10 micras para navegar el giro de la garganta y se requiere un diámetro de aproximadamente 0,5 micras o más para evitar ser exhalado. Para llegar al pulmón profundo (o región alveolar) donde se cree que ocurre la absorción más eficiente, se prefiere maximizar la proporción de partículas contenidas en la "fracción respirable" (RF),
25 generalmente aceptadas como aquellas partículas con un diámetro aerodinámico de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5,7 micras, aunque algunas referencias usan intervalos algo diferentes, medidos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, con un impactador en cascada Anderson. Se pueden usar otros impactadores para medir el tamaño de partícula aerodinámico, tal como el NEXT GENERATION IMPACTOR™ (NGI™, MSP Corporation), para el cual la fracción respirable se define por un tamaño aerodinámico similar, por ejemplo $<6,4 \mu\text{m}$. En algunas realizaciones, se usa un aparato de difracción láser para determinar el tamaño de partícula, por ejemplo, el aparato de difracción láser divulgado en el documento de solicitud de patente de Estados Unidos Nº. 12/727.179, presentada el 18 de marzo de 2010, que se incorpora al presente documento en su totalidad por sus enseñanzas relevantes, en donde la mediana del diámetro geométrico (VMGD) de las partículas se mide para evaluar la actuación del sistema de inhalación. Por ejemplo, en varias realizaciones, el vaciado del cartucho de $\geq 80\%$, 85% o 90% y un VMGD de las partículas emitidas de $\geq 12,5 \mu\text{m}$, $\geq 7,0 \mu\text{m}$, o $\geq 4,8 \mu\text{m}$ puede indicar una actuación aerodinámica progresivamente mejor. Las realizaciones divulgadas en el presente documento muestran que las micropartículas de FDKP con un contenido de isómero trans de entre aproximadamente del 45% a aproximadamente el 65% exhiben características beneficiosas para el suministro de fármacos a los pulmones, tales como una actuación aerodinámica mejorada.

40 La fracción respirable en el llenado (RF/llenado) representa el % de polvo en una dosis emitida por un inhalador al descargar el contenido de polvo llenado para usar como dosis, y que es adecuado para la respiración, es decir, el porcentaje de partículas de la dosis llenada que se emite con tamaños adecuados para el suministro pulmonar, que es una medida de la actuación aerodinámica de las micropartículas. Como se describe en el presente documento, un valor de RF/llenado del 40% o superior al 40% refleja características de actuación aerodinámica aceptables. En ciertas realizaciones divulgadas en el presente documento, la fracción respirable en el llenado puede ser superior al 50%. En una realización de ejemplo, una fracción respirable en el llenado puede ser de hasta aproximadamente el 80%, en donde aproximadamente el 80% del llenado se emite con tamaños de partículas $< 5,8 \mu\text{m}$, medidos utilizando técnicas estándar.

Como se usa en el presente documento, el término "polvo seco" se refiere a una composición en partículas finas que no se suspende o disuelve en un propulsor, vehículo u otro líquido. No implica necesariamente una ausencia completa de todas las moléculas de agua.

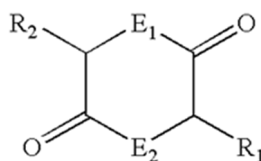
50 Debe entenderse que los valores específicos de RF/llenado pueden depender del inhalador utilizado para administrar el polvo. Los polvos generalmente tienden a aglomerarse y las micropartículas cristalinas de DKP forman polvos particularmente cohesivos. Una de las funciones de un inhalador de polvo seco es desaglomerar el polvo de modo que las partículas resultantes comprendan una fracción respirable adecuada para administrar una dosis por inhalación. Sin embargo, la desaglomeración de los polvos cohesivos generalmente es incompleta, de modo que la distribución del tamaño de partícula que se observa al medir la fracción respirable que administra un inhalador no coincidirá con la distribución del tamaño de las partículas primarias, es decir, el perfil se desplazará hacia partículas más grandes.

Los diseños de los inhaladores varían en su eficiencia de desaglomeración y, por lo tanto, el valor absoluto de RF/llenado observado usando diferentes diseños también variará. Sin embargo, la RF/llenado óptima en función del contenido isomérico será similar de un inhalador a otro.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de la medición para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

Dicetopiperazinas

Una clase de agentes de administración de fármacos que se ha utilizado para superar problemas en las realizaciones farmacéuticas, tales como la inestabilidad del fármaco y/o la absorción deficiente, son las 2,5-dicetopiperazinas. Las 2,5-dicetopiperazinas están representadas por el compuesto de la Fórmula general 1 como se muestra a continuación en donde E₁ y E₂ son independientemente N o más particularmente NH. En otras realizaciones, E₁ y/o E₂ son independientemente un oxígeno o un nitrógeno, de modo que en donde uno cualquiera de los sustituyentes para E₁ y E₂ es un oxígeno y el otro es un nitrógeno, la fórmula produce el análogo de sustitución de dicetomorfolina, o cuando tanto E₁ como E₂ son oxígeno la fórmula produce el análogo de sustitución de dicetodioxano.



Fórmula 1

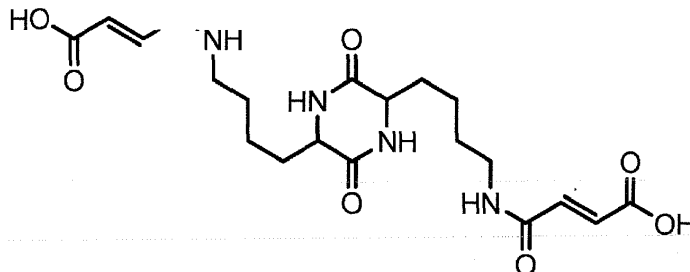
Se ha demostrado que estas 2,5 dicetopiperazinas son útiles en la administración de fármacos, particularmente aquellas que tienen grupos ácidos R₁ y R₂ como se describe, por ejemplo, en los documentos de patente de Estados Unidos. N° 5.352.461 titulado "Self Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System"; N° 5.503.852 titulado "Method For Making Self-Assembling Diketopiperazine Drug Delivery System"; cada uno de los cuales se incorporará al presente documento por referencia para todo lo que enseña con relación al suministro de fármacos mediado por dicetopiperazinas y dicetopiperacina. N° 6.071.497 titulada "Microparticles For Lung Delivery Comprising Diketopiperazine" y N° 6.331.318 titulado "Carbon-Substituted Diketopiperazine Delivery System". Las dicetopiperazinas se pueden formar en micropartículas que incorporan un fármaco o micropartículas sobre las cuales se puede adsorber un fármaco. La combinación de un fármaco y una dicetopiperazina puede impartir características mejoradas de estabilidad y/o absorción del fármaco. Estas micropartículas pueden administrarse por diversas vías de administración. Como polvos secos, estas micropartículas pueden administrarse por inhalación a áreas específicas del sistema respiratorio, incluidos los pulmones.

Dichas micropartículas se obtienen típicamente por precipitación basada en el pH del ácido libre (o base) libre que da como resultado micropartículas autoensambladas compuestas de placas cristalinas agregadas. La estabilidad de la partícula se puede mejorar con pequeñas cantidades de un tensioactivo, tal como el polisorbato-80, en la solución de DKP de la que precipitan las partículas (véase, por ejemplo, la publicación del documento de patente de Estados Unidos N° 2007/0059373 titulada "Method of drug formulation based on increasing the affinity of crystalline microparticle surfaces for active agents", que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad para todo lo que muestra con relación a la formación y carga de micropartículas DKP y polvos secos de las mismas). Finalmente, el disolvente se puede eliminar para obtener un polvo seco. Los métodos apropiados de eliminación de disolventes incluyen liofilización y secado por pulverización (véase, por ejemplo, la publicación del documento de patente de Estados Unidos N° 2007/0196503 titulada "A method for improving the pharmaceutical properties of microparticles comprising diketopiperazine and an active agent" y el documento de patente de los Estados Unidos N° 6.444.226 titulado "Purification and stabilization of peptide and protein pharmaceutical agents", cada uno de los cuales se incorpora al presente documento en su totalidad para todo lo que muestra con relación a la formación y carga de micropartículas DKP y polvo seco de las mismas). Las micropartículas divulgadas en el presente documento son distintas de las micropartículas compuestas de sales de DKP. Dichas partículas se forman típicamente (en lugar de secarse) mediante secado por pulverización, lo que da como resultado esferas y/o esferas colapsadas de una sal amorfa (en oposición a un ácido o base libre) de modo que son entidades química, física y morfológicamente distintas. La presente divulgación se refiere a FDKP para que se entienda como el ácido libre o el anión disuelto.

Los métodos para sintetizar dicetopiperazinas se describen en, por ejemplo, Katchalski, et al., J. Amer. Chem Soc. 68, 879-880 (1946) y Kopple, et al., J. Org. Chem 33 (2), 862-864 (1968), cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad. 2,5-diceto-3,6-di(aminobutil)piperazina (Katchalski et al. se refieren a esto como anhídrido de lisina) también se puede preparar mediante la ciclodimerización de N-ε-P-L-lisina en fenol fundido, similar al método de Kopple, seguido de la eliminación de los grupos de bloqueo (P) con un reactivo y condiciones apropiados. Por ejemplo, los grupos protectores -CBz se pueden eliminar usando HBr 4,3 M en ácido acético. Se puede preferir esta ruta porque utiliza un material de partida disponible en el mercado, implica condiciones de reacción que, según se informa, conservan la estereoquímica de los materiales de partida en el producto y todas las etapas se pueden ampliar fácilmente para su fabricación. Los métodos para sintetizar dicetopiperazinas también se describen

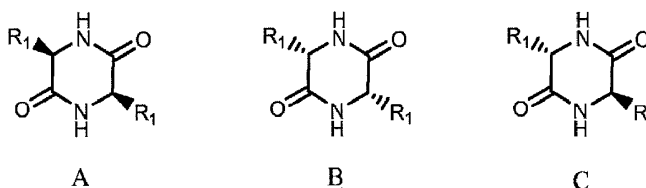
en el documento de patente de Estados Unidos. Nº. 7.709.639, titulado "Catalysis of Diketopiperazine Synthesis", que también se incorpora por referencia la presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo.

La fumarildiketopiperazina, (2,5-diceto-3,6-bis(N-fumaril-4-aminobutil)piperazina; FDKP) es una diketopiperazina preferida para aplicaciones pulmonares:



FDKP proporciona una matriz de micropartículas beneficiosa porque tiene baja solubilidad en ácido pero es fácilmente soluble a pH neutro o básico. Estas propiedades permiten que FDKP se cristalice y los cristales se autoensamblen en forma de micropartículas en condiciones ácidas. Las partículas se disuelven fácilmente en condiciones fisiológicas donde el pH es neutro. Como se señaló, las micropartículas que tienen un diámetro de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 micras pueden llegar a los pulmones, pasando con éxito la mayoría de las barreras naturales. Las partículas en este intervalo de tamaño pueden prepararse fácilmente a partir de FDKP.

FDKP posee dos centros asimétricos en el anillo de diketopiperazina. FDKP se fabrica como una mezcla de isómeros geométricos que se identifican como "cis-FDKP" y "trans-FDKP" según la disposición de las cadenas laterales en relación con el "anillo" central de la diketopiperazina. Los enantiómeros R,R y S,S tienen los "brazos laterales" de propenil(amidobutilo) que se proyectan desde el mismo lado plano del anillo de diketopiperazina (A y B a continuación) y, por lo tanto, se los denomina isómeros cis mientras que el compuesto R,S tiene los "brazos laterales" que se proyectan desde lados planos opuestos del anillo de diketopiperazina (C a continuación) y se conoce como el isómero trans.



Polvos de micropartículas de FDKP con una actuación aerodinámico aceptable, medida por RF/llenado con inhaladores moderadamente eficientes tales como el inhalador MEDTONE® descrito en el documento de patente de Estados Unidos 7.464.706 titulado, "Unit Dose Cartridge and Dry Powder Inhaler", que se incorpora por referencia al presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo, se han producido a partir de FDKP con un contenido de isómero trans que varía de aproximadamente 45 a aproximadamente 65%. Las partículas con un contenido de isómero en este intervalo también funcionan bien con inhaladores de alta eficiencia tales como los divulgados en el documento de solicitud de patente de Estados Unidos Nº 12/484.125 titulado, "A Dry Powder Inhaler and System for Drug Delivery", presentada el 12 de junio de 2009, y el documento de solicitud de patente de Estados Unidos Nº. 12/717.884, titulado, "Improved Dry Powder Drug Delivery System", presentada el 4 de marzo de 2010, que se incorpora por referencia al presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo. Los polvos que comprenden micropartículas que contienen más del 65% de trans-FDKP tienden a tener un RF/llenado más bajo y más variable (FIG. 1). Las micropartículas enriquecidas en isómeros trans de FDKP tienen una morfología alterada y también conducen a suspensiones viscosas que son difíciles de procesar.

En otros experimentos realizados en condiciones comparables a las reportadas en la FIG. 1, las micropartículas hechas de aproximadamente 95% de FDKP enriquecido en trans e insulina produjeron un RF/llenado de aproximadamente 24%, mientras que las muestras de control con un contenido de isómero trans de aproximadamente 59% con igual contenido de insulina dieron un RF/llenado de aproximadamente 49-52 % (datos no mostrados). Por consiguiente, un polvo de micropartículas de FDKP que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% proporciona un polvo con propiedades aerodinámicas aceptables. En realizaciones alternativas, el contenido de isómero trans FDKP varía de aproximadamente 50% a aproximadamente 65% de aproximadamente 52% a aproximadamente 62% o de aproximadamente 53% a aproximadamente 63% (véase la FIG. 1).

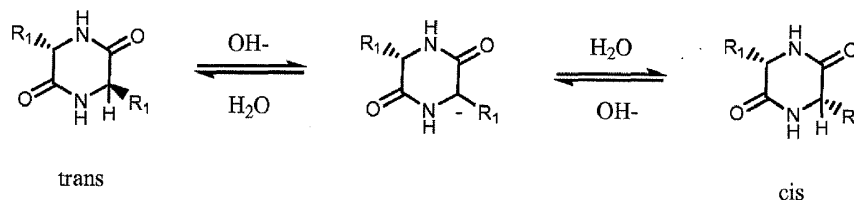
En base a lo anterior, es deseable producir polvos de micropartículas que tengan un contenido de isómero trans dentro del intervalo de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. Por lo tanto, la presente divulgación determina que el contenido de isómeros trans afectaría la actuación aerodinámica de las micropartículas de FDKP lo que no se anticipó. Sin embargo, se descubrió que se podía obtener una consistencia mejorada controlando cuidadosamente el contenido de isómeros de la FDKP utilizada para fabricar micropartículas de FDKP. En la FIG. 1, la línea curva continua representa el RF/llenado predicho y la línea curva discontinua representa el límite de confianza inferior unilateral del

95% para obtener una puntuación de RF/llenado adecuada. Las líneas discontinuas verticales proporcionan límites sobre el contenido del isómero trans para una realización de ejemplo divulgada en el presente documento.

La relación isómero cis/trans de FDKP se establece durante las etapas de fabricación representadas en la FIG. 2. La FIG. 2 representa etapas en un esquema sintético que puede controlarse para producir FDKP con un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%. En el esquema sintético, hay varios parámetros y/o etapas de reacción, que incluyen saponificación y recristalización, durante la síntesis de FDKP que pueden regularse para obtener la relación de isómeros proyectada o deseada. Por ejemplo, los parámetros específicos de las reacciones, que incluyen la temperatura, el tiempo de reacción y el tipo de disolventes o codisolventes utilizados, se pueden controlar para obtener un producto con el contenido proyectado o deseado de isómero trans.

Control del extremo inferior del intervalo del contenido de isómero trans de FDKP

El extremo inferior del contenido de isómero trans se controla exponiendo el anillo de DKP a una base fuerte. En una etapa de fabricación, los grupos protectores de etilo se eliminan por saponificación con hidróxido de sodio. Estas condiciones básicas también promueven la epimerización del anillo entre los isómeros como se muestra a continuación, sin tener en cuenta qué isómero está en exceso. Por ejemplo, la adición de una base a una reacción que comprende un compuesto de partida compuesto de, por ejemplo, un 95% de isómero trans puede producir un material de FDKP compuesto de aproximadamente una mezcla 50/50 de contenido de isómero cis y trans (FIG. 3). Además del pH básico, otros factores también pueden contribuir a la regulación de la formación del contenido de isómeros trans, incluido la concentración de disolventes y codisolventes, el tiempo de exposición y la temperatura de la reacción.



Control del extremo superior del intervalo de contenido de isómero trans de FDKP

Las diferencias de solubilidad entre los isómeros afectan el contenido de isómeros de FDKP. Por ejemplo, FDKP puede recristalizarse en ácido trifluoroacético (TFA) y ácido acético glacial (GAA). Trans FDKP es menos soluble en este sistema de disolvente que cis FDKP. En consecuencia, las condiciones que favorecen la precipitación selectiva del isómero trans menos soluble pueden usarse para aumentar el contenido de isómero trans del producto final. Tales condiciones incluyen la disminución del tiempo de recristalización, adición de antidisolvente a baja temperatura y/o enfriamiento rápido de la mezcla de ácido trifluoroacético-ácido acético glacial (TFA-GAA) (FIG. 4). También se apreciará que elevar el contenido de isómero trans mediante tales métodos proporciona una solución residual de FDKP enriquecida en los isómeros cis.

Tabla 1. Intervalos de fabricación de ejemplo

Parámetro	Intervalo de operación
Relación TFA/GAA*	0,67 ± 0,05
Tiempo de cristalización (horas)	6 ± 0,5
Temperatura de cristalización (° C)	15-25
Rampa de enfriamiento posterior a la adición de GAA (° C/hora)	7-10
*Denota ácido trifluoroacético:ácido acético glacial	

Al proporcionar micropartículas con un contenido de isómeros en el intervalo de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% se proporcionan micropartículas con características aerodinámicas beneficiosas.

Selección e incorporación de agentes activos

Siempre que las micropartículas divulgadas en el presente documento retengan el contenido de isómero requerido, pueden adoptar otras características adicionales beneficiosas para la administración al pulmón y/o la adsorción de fármacos. El documento de patente de Estados Unidos N° 6.428.771 titulado "Method for Drug Delivery to the Pulmonary System" describe la administración de partículas DKP al pulmón, que se incorpora por referencia al presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo. El documento de patente de Estados Unidos N° 6.444.226, titulado "Purification and Stabilization of Peptide and Protein Pharmaceutical Agents", describe métodos beneficiosos para adsorber fármacos en superficies de micropartículas y también se incorpora por referencia al presente documento con relación al mismo. Las propiedades de la superficie de las micropartículas se pueden

manipular para lograr las características deseadas como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 11/532.063 titulado "Method of Drug Formulation based on Increasing the Affinity of Crystalline Microparticle Surfaces for Active Agents", que se incorpora por referencia al presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo. El documento de patente de Estados Unidos N° 11/532.065 titulado "Method of Drug Formation based on Increasing the Affinity of Active Agents for Crystalline Microparticle Surfaces" describe métodos para promover la adsorción de agentes activos en micropartículas, la solicitud de patente de EE.UU. No. 11/532,065 también se incorpora por referencia al presente documento por sus enseñanzas con relación al mismo.

Las micropartículas divulgadas en el presente documento pueden comprender uno o más agentes activos. Como se usa en el presente documento, "agente activo", usado indistintamente con "fármaco", se refiere a sustancias farmacéuticas, que incluyen fármacos de molécula pequeña, agentes biológicos y agentes bioactivos. Los agentes activos pueden ser de origen natural, recombinantes o de origen sintético, incluidas proteínas, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos, macromoléculas orgánicas, compuestos orgánicos sintéticos, polisacáridos y otros azúcares, ácidos grasos y lípidos, y anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos humanizados o quiméricos, F(ab), F(ab)₂, un anticuerpo de cadena sencilla solo o fusionado a otros polipéptidos o anticuerpos monoclonales terapéuticos o de diagnóstico para antígenos de cáncer. Los agentes activos pueden clasificarse en una variedad de actividades y clases biológicas, tales como agentes vasoactivos, agentes neuroactivos, hormonas, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes citotóxicos, antibióticos, agentes antivíricos, antígenos, agentes infecciosos, mediadores inflamatorios, hormonas y antígenos de superficie celular. Más particularmente, los agentes activos pueden incluir, de manera no limitativa, citocinas, lipocinas, encefalinas, alquinos, ciclosporinas, anticuerpos anti-IL-8, antagonistas de IL-8 que incluyen ABX-IL-8; prostaglandinas que incluyen PG-12, bloqueadores de receptores de LTB que incluyen LY29311, BIIL 284 y CP105696; triptanos tales como sumatriptán y palmitoleato, insulina y sus análogos, hormona del crecimiento y sus análogos, hormona paratiroidea (PTH) y sus análogos, péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), grelina, obestatina, enterostatina, factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), amilina, análogos de amilina, péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), rojo de Texas, clopidogrel, PPACK (D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometilcetona), oxintomodulina (OXM), péptido YY(3-36) (PYY), adiponectina, colecistoquinina (CCK), secretina, gastrina, glucagón, motilina, somatostatina, péptido natriurético cerebral (BNP), péptido natriurético auricular (ANP), IGF-1, factor de liberación de hormona de crecimiento (GHRF), antagonista del receptor precursor de la beta-4 integrina (ITB4), nociceptina, nocistatina, orfanina FQ2, calcitonina, CGRP, angiotensina, sustancia P, neuroquinina A, polipéptido pancreático, neuropéptido Y, péptido inductor del sueño delta y péptido intestinal vasoactivo.

El contenido de fármaco a administrar en micropartículas formadas a partir de FDKP que tienen un contenido de isómero trans entre 45% y 65% es típicamente mayor de 0,01%. En una realización, el contenido de fármaco a administrar con las micropartículas que tienen el contenido de isómero trans mencionado anteriormente, puede variar de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, lo que es típico para péptidos tales como la insulina. Por ejemplo, si el fármaco es la insulina, las micropartículas actuales típicamente comprenden de 3-4 U/mg (aproximadamente de 10 a 15%) de insulina. En ciertas realizaciones, el contenido de fármaco de las partículas puede variar dependiendo de la forma y el tamaño del fármaco a administrar.

Fabricación de micropartículas

En una realización y divulgado en el presente documento, se describe un proceso de fabricación que puede usarse para producir micropartículas de FDKP que comprenden un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% e insulina.

La FIG. 5 representa una representación esquemática de un proceso de fabricación para hacer las presentes micropartículas de FDKP que contienen insulina. En resumen, usando un mezclador de alto cizallamiento de doble alimentación, por ejemplo, como se describe en el documento de Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie 61/257.311, presentado el 2 de noviembre de 2009, cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad, masas iguales de aproximadamente 10,5% en peso de ácido acético y aproximadamente 2,5% en peso de soluciones de FDKP a aproximadamente 16° C ± aproximadamente 2° C (Tablas 2 y 3) pueden alimentarse a 2000 psi a través de un orificio de 0,001 pulgadas². El precipitado se puede recoger en un depósito de agua desionizada (DI) de aproximadamente la misma masa y temperatura. La suspensión resultante contiene aproximadamente 0,8% de sólidos. El precipitado se puede concentrar y lavar mediante filtración de flujo tangencial. El precipitado puede concentrarse primero a aproximadamente 4% de sólidos y luego lavarse con agua desionizada. La suspensión finalmente se puede concentrar a aproximadamente 10% de sólidos en base a la masa inicial de FDKP. La suspensión concentrada puede analizarse para determinar el contenido de sólidos mediante un método de secado en horno.

Se puede preparar una solución madre de insulina concentrada con 1 parte de insulina y 9 partes de aproximadamente 2% en peso de ácido acético. La solución madre de insulina se puede agregar gravimétricamente a la suspensión para obtener una carga de aproximadamente 11,4% en peso. La suspensión que contiene insulina se puede mezclar durante al menos aproximadamente 15 minutos, y luego se titula con aproximadamente 14 a aproximadamente 15% en peso de amoníaco acuoso a un pH de aproximadamente 4,5 desde un pH inicial de aproximadamente 3,5. La suspensión se puede congelar rápidamente en nitrógeno líquido para formar pelets usando un criogranulador, por ejemplo, como se describe en el documento de Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie N°

61/257.385, presentada el 2 de noviembre de 2009, cuya divulgación se incorpora por referencia al presente documento en su totalidad, y se liofiliza para producir las micropartículas de FDKP cargadas con insulina a granel con un % de contenido de isómero trans de entre aproximadamente 45% y 65%. Las micropartículas de FDKP sin fármaco se pueden fabricar de manera idéntica menos las etapas de carga de insulina y ajuste del pH.

5

Tabla 2. Solución de ácido acético al 10,5%

Componente	% en peso
Agua DI	89,00
GAA	10,50
10% de polisorbato 80	0,50

Filtrado por 0,2 µm

Tabla 3. Solución de 2,5% de FDKP

Componente	% en peso
Agua DI	95,40
FDKP	2,50
NH ₄ OH	1,60
10% de polisorbato 80	0,50

10 Filtrado por 0,2 µm

Como se usa en el presente documento, "disolvente" se refiere al medio fluido en el que el agente activo y la micropartícula se "bañan". No debe interpretarse que requiere que todos los componentes estén en solución. De hecho, en muchos casos puede usarse para referirse al medio líquido en el que se suspenden las micropartículas.

15 Como es evidente por la descripción anterior, las micropartículas de las realizaciones divulgadas en el presente documento pueden tomar muchas formas diferentes e incorporar muchos fármacos o agentes activos diferentes. Sin embargo, el atributo común de cada una de estas realizaciones es que las micropartículas formadas tienen un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%.

Ejemplos

20 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones de las micropartículas divulgadas. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para el buen funcionamiento de la práctica de la presente divulgación y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del alcance de la invención.

25 Ejemplo 1.

I. Relación entre el contenido de isómeros trans y RF/llenado

Se fabricaron las micropartículas a partir de FDKP e insulina. Se disolvió FDKP en NH₄OH acuoso para formar una solución. Se combinó una corriente de alimentación de esta solución con una corriente de alimentación de una solución acuosa de HOAc en un mezclador de alto cizallamiento para formar una suspensión acuosa de micropartículas.

30 La solución de alimentación de FDKP se preparó con aproximadamente 2,5% en peso de FDKP, aproximadamente 1,6% en peso de NH₄OH concentrado (aproximadamente de 28 a aproximadamente 30% en peso de NH₃) y aproximadamente 0,05% en peso de polisorbato 80. La solución de alimentación de ácido acético se preparó a aproximadamente 10,5% en peso de GAA y aproximadamente 0,05% en peso de polisorbato 80. Ambas soluciones de alimentación se filtraron a través de una membrana de aproximadamente 0,2 µm antes de su uso.

35 Se bombearon cantidades iguales (en masa) de cada solución de alimentación a través de un DUAL-FEED SONOLATOR™ equipado con el orificio n° 5 (0,0011 pulgadas cuadradas). La bomba menor se ajustó al 50% para caudales iguales de cada corriente de alimentación y la presión de alimentación fue de aproximadamente 2000 psi. El recipiente receptor contenía agua desionizada (DI) igual a la masa de cualquiera de las soluciones de alimentación (por ejemplo, 4 kg de solución de alimentación de FDKP y 4 kg de solución de alimentación de HOAc se bombearían

a través del SONOLATOR™ al recipiente receptor que contenía 4 kg de agua DI).

La suspensión resultante se concentró y se lavó mediante filtración de flujo tangencial usando una membrana PES de 0,2 m². Las suspensiones se concentraron primero a aproximadamente 4% de sólidos, luego se filtraron con agua DI y finalmente se concentraron a aproximadamente 16% de sólidos nominales. El porcentaje real de sólidos de la suspensión lavada se determinó por "pérdida por secado".

Se prepararon soluciones madre de insulina que contenían aproximadamente 10% en peso de insulina (tal como se recibió) en un disolvente que comprendía aproximadamente 2% en peso de HOAc en agua DI y se esterilizaron por filtración. La solución madre se filtró a través de un filtro de 0,22 µm antes de su uso. En base al contenido de sólidos de la suspensión, se añadió la cantidad apropiada de solución madre a la suspensión mixta. La mezcla resultante de micropartículas/insulina se ajustó luego de un pH de aproximadamente 3,6 a un pH de aproximadamente 4,5 usando una solución de hidróxido de amonio.

La suspensión de micropartículas/insulina fue entonces peletizada (criogranulada) por congelación rápida en nitrógeno líquido. Las pelets de hielo se liofilizaron para producir un polvo seco.

La fracción respirable en el llenado (RF/llenado) de los polvos a granel es una medida de la distribución del tamaño aerodinámico de las micropartículas y se determina mediante pruebas con el impactador en cascada Andersen. Para obtener valores de RF/llenado, los cartuchos se llenan con polvo a granel y se descargan a través de un inhalador MEDTONE® a 30 l/min. El polvo recogido en cada etapa del inhalador se pesa y el polvo total recogido se normaliza a la cantidad total llenada en los cartuchos. En consecuencia, RF/llenado es el polvo recogido en esas etapas del impactador que representa la fracción respirable dividida por el polvo cargado en los cartuchos.

Como se muestra en la FIG. 1, los polvos de FDKP con una actuación aerodinámica aceptable medida como RF/llenado se han producido a partir de FDKP con tan poco como 45% de contenido de isómero trans (FIG. 1). Los polvos que contienen más del 65% de trans-FDKP tienden a tener un RF/llenado más bajo y más variable.

Los estudios determinaron el intervalo de contenido de isómeros trans con propiedades aerodinámicas beneficiosas. Las siguientes secciones describen los experimentos realizados para evaluar las condiciones de procesamiento que pueden generar el contenido de isómero especificado.

II Disolvente de saponificación

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto, si lo hubiera, de las condiciones de saponificación sobre el contenido de isómero trans de FDKP (FIG. 2). Se calentó una mezcla de éster dietílico de FDKP (Compuesto 004) y 590 ml de disolvente de reacción (véase la Tabla 5) a aproximadamente 57° C. Después de que la temperatura de reacción se estabilizara, se añadió gota a gota aproximadamente 50% de solución de NaOH a través de un embudo de adición durante aproximadamente 60 minutos. La reacción se mantuvo durante aproximadamente 30 minutos después de que se completó la adición de NaOH y luego se filtró para eliminar cualquier sólido sin reaccionar. El filtrado se acidificó con ácido acético a un pH de aproximadamente 5 y los sólidos resultantes se aislaron por filtración, se lavaron con agua y acetona, se secaron en un horno de vacío y se analizaron por HPLC para determinar el contenido de isómeros cis y trans.

Por consiguiente, se evaluaron cinco sistemas de disolventes diferentes que iban desde acuoso (Tabla 4, A) hasta orgánico (Tabla 4, E). En general, los datos en la Tabla 4 muestran que el sistema disolvente usado en los experimentos A, B y C produjo FDKP con un contenido aceptable de isómeros trans.

Tabla 4. Efecto de la relación de disolvente agua:metanol en la etapa 5 en el contenido isomérico de FDKP

Identificación de la muestra	Relación de agua:metanol (v:v)	% de Trans FDKP
A	4:0	51
B	3:1	53
C	2:2	55
D	1:3	78
E	0:4	33

III. Condiciones de recristalización

La FDKP se puede recristalizar a partir de una mezcla de TFA (disolvente)/GAA (antidisolvente) (FIG. 2; etapa 6). Se evaluaron los parámetros de proceso controlados para caracterizar este proceso de recristalización y sus efectos sobre el contenido de isómeros de FDKP. En general, las reacciones de recristalización con alto rendimiento también dieron FDKP con un contenido deseado de isómero trans. Las reacciones de recristalización de bajo rendimiento dieron como

resultado un contenido elevado de isómero trans, ya que el isómero cis tiene una mayor solubilidad en el sistema disolvente de recristalización.

Se cargó un reactor con FDKP bruto (aproximadamente 75 g) y TFA (aproximadamente 250 ml) y se inició la agitación. La suspensión se calentó a reflujo (aproximadamente de 80° C a aproximadamente 85° C) y se mantuvo durante aproximadamente 10 minutos o hasta que se disolvieron todos los sólidos. La mezcla se enfrió por debajo de aproximadamente 60° C. Se añadió ácido acético glacial (aproximadamente 375 ml) a la solución. La mezcla se enfrió y se mantuvo durante un mínimo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente de 10° C a aproximadamente 20° C. El producto precipitado se filtró y se lavó con GAA (3 x aproximadamente 100 ml), acetona (3 x aproximadamente 100 ml) y agua (1 x aproximadamente 100 ml). El producto se secó a aproximadamente 55° C al vacío (aproximadamente de 22 a aproximadamente 25 pulgadas de Hg) durante aproximadamente de 12 a aproximadamente 18 horas.

Inicialmente, se probaron cuatro factores, incluida la cantidad de disolvente, cantidad de antidisolvente, el tiempo de cristalización y temperatura de cristalización. Una cantidad de disolvente de aproximadamente 2,68 o aproximadamente 3,34 ml/g de FDKP proporcionó un % de isómero trans de FDKP aceptable. Con aproximadamente 6,68 ml de disolvente/g de FDKP, se produjo un contenido de isómero trans inaceptablemente alto. La cantidad de antidisolvente no afectó significativamente el % de contenido de isómero trans de FDKP a hasta 5,0 ml/g de FDKP. La reducción de la cantidad de antidisolvente de la cantidad de control produjo sustancialmente un % de trans FDKP por encima del intervalo deseado.

En experimentos con alto rendimiento del producto, el tiempo de cristalización no afectó significativamente el % de contenido de isómero trans de FDKP hasta aproximadamente 6 o 24 horas. El contenido de isómero (% de isómero trans de FDKP) cayó fuera del intervalo de aproximadamente 45 a aproximadamente 65% a las temperaturas de cristalización altas (35° C) y bajas (0° C) probadas.

Experimentos posteriores respaldaron estos hallazgos. La FIG. 6 muestra una superficie que representa el contenido de isómero FDKP, medido como % de trans FDKP, en función de la relación disolvente:anti-disolvente (TFA:GAA) y temperatura de cristalización. En los intervalos probados en estos experimentos, los valores para % de trans FDKP variaron de 59-75%. Los datos sugieren que el isómero trans de FDKP está dentro del intervalo deseado a una relación baja de disolvente (0,43) y altas temperaturas de cristalización (25° C). Los valores pronosticados para el % de isómero trans de FDKP en esta área de la superficie de respuesta son de 58-60%. Estas observaciones sugieren que el uso de una temperatura de cristalización de 25° C podría ser ventajoso.

Ejemplo 2. Medición del isómero trans de FDKP

La relación de isómero cis/trans de FDKP se determinó usando HPLC. Se preparó una muestra de FDKP a una concentración de ~0,15 mg/ml en tampón de formiato de amonio 0,1 M. La muestra se sonicó y se transfirió a un vial de HPLC para su análisis. El volumen de inyección utilizado fue de 20 µl. Se observaron tiempos de retención de 31,7 y 33,3 minutos (FDKP cis y trans, respectivamente) utilizando los siguientes parámetros de HPLC:

Columna: Phenomenex LUNA Phenyl-Hexyl

Tamaño de partícula: 3 mm

Longitud de columna: 15 cm

Diámetro interno de columna: 3,0 mm

Fase móvil A: agua/ácido trifluoroacético, 1000:1 (v:v)

Fase móvil B: metanol/tetrahidrofurano/ácido trifluoroacético, 900:100:1 (v:v:v)

Volumen de inyección: 20 µl

Velocidad de flujo: 0,3 ml por minuto

Tiempo de ejecución: 90 minutos

Temperatura de columna: 30 ± 3° C.

Temperatura de muestra: 8 ± 3° C.

Detector: UV 254 nm

Tabla 5. Gradiente de elución de muestra de FDKP

Tiempo (min)	% de A	% de B	Velocidad de flujo (ml/min)	Comentarios
0	95	5	0,3	condiciones de inicio
75	53,5	46,5	0,3	gradiente lineal
76	20	80	0,3	mantenimiento isocrático
77	95	5	0,3	vuelta a lo inicial
90	95	5	0,3	reequilibrar

Ejemplo 3. Análisis de tamaño de partícula geométrico de formulaciones emitidas por la caracterización de la mediana del diámetro geométrico volumétrico (VMGD)

- 5 La difracción láser de formulaciones de polvo seco emitidas por inhaladores de polvo seco es una metodología común empleada para caracterizar el nivel de desaglomeración sometido a un polvo. La metodología indica una medida del tamaño geométrico en lugar del tamaño aerodinámico como ocurre en las metodologías de impacto estándar de la industria. Típicamente, el tamaño geométrico del polvo emitido incluye una distribución volumétrica caracterizada por la mediana del tamaño de partícula, VMGD. Es importante destacar que los tamaños geométricos de las partículas emitidas se distinguen con mayor resolución en comparación con los tamaños aerodinámicos proporcionados por los métodos de impacto. Se prefieren tamaños más pequeños y dan como resultado una mayor probabilidad de que las partículas individuales se entreguen al tracto pulmonar. Por lo tanto, las diferencias en la desaglomeración del inhalador y el rendimiento final pueden ser más fáciles de resolver con la difracción. En estos experimentos, los inhaladores se probaron con difracción láser a presiones análogas a las capacidades inspiratorias reales del paciente para determinar la efectividad del sistema de inhalación para desaglomerar las formulaciones en polvo. Específicamente, las formulaciones incluían polvos de dicetopiperazina cohesivos con un ingrediente activo cargado de insulina y sin él. Estas formulaciones en polvo poseían áreas superficiales, relaciones de isómeros e índices de Carr característicos. En la Tabla 6 se informa sobre el VMGD y la eficiencia del vaciado del contenedor durante la prueba. Los polvos de FDKP tienen un índice de Carr aproximado de 50 y el polvo de TI tiene un índice de Carr aproximado de 40.

Tabla 6

Sistema de inhalación	polvo	% de trans	SSA	Caída de presión (kPa)	Tamaño de la muestra	% de CE	VMGD (micras)
DPI 2	FDKP	56	55	4	15	92,5	6,800
MedTone®	FDKP	56	55	4	30	89,5	21,200
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	30	98,0	4,020
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	20	97,0	3,700
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	20	98,4	3,935
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	20	97,8	4,400
MedTone ®	FDKP + activo	56	45	4	10	86,1	9,280
MedTone ®	FDKP + activo	56	45	4	10	92,3	10,676
DPI 2	FDKP + activo	56	45	2	7	92,9	4,364
DPI 2	FDKP + activo	56	45	2	7	95,1	4,680
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	7	97,0	3,973
DPI 2	FDKP + activo	56	45	4	7	95,5	4,250
DPI 2	FDKP + activo	56	56	4	10	99,6	6,254
DPI 2	FDKP + activo	56	14	4	10	85,5	4,037
MedTone ®	FDKP + activo	56	56	4	20	89,7	12,045
MedTone ®	FDKP + activo	56	14	4	20	37,9	10,776
DPI 2	FDKP + activo	54	50	4	10	97,1	4,417

DPI 2	FDKP + activo	54	44	4	10	96,0	4,189
DPI 2	FDKP + activo	56	35	4	10	92,0	3,235
DPI 2	FDKP + activo	50	34	4	10	93,2	5,611
DPI 2	FDKP + activo	66	33	4	10	79,0	4,678
DPI 2	FDKP + activo	45	42	4	10	93,2	5,610
DPI 2	FDKP + activo	56	9	4	10	78,9	5,860

Los datos en la Tabla 6 muestran una mejora en la desaglomeración de polvo en los inhaladores identificados como DPI 2 en comparación con el sistema de inhaladores MEDTONE®. Las formulaciones de dicetopiperazina con áreas de superficie que van desde 14 - 56 m²/g demostraron eficiencias de vaciado superiores al 85% y VMGD de menos de 7 micras. Del mismo modo, las formulaciones que poseían una relación de isómeros que variaba de 45 - 66% de trans demostraron una actuación mejorada sobre el dispositivo mencionado. Sin embargo, vale la pena señalar que incluso con el inhalador más eficiente con un contenido de trans del 66%, hubo una reducción en el vaciado del cartucho que indica una bajada (disminución) en el rendimiento aerodinámico a medida que el contenido del isómero trans se aleja de los intervalos divulgados en este documento. Por último, también se demostró que la actuación del sistema inhalador con formulaciones caracterizadas por índices de Carr de 40-50 mejoró con respecto al dispositivo mencionado. En todos los casos, los valores de VMGD informados fueron inferiores a 7 micras.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como el peso molecular, condiciones de reacción, etc., utilizados en la especificación y las reivindicaciones deben entenderse modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente especificación y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretendan obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o esté claramente contradicho en el contexto. La recitación de intervalos de valores en este documento solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento tiene la intención meramente de iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ningún lenguaje en la especificación debería interpretarse como que indica un elemento esencial no reivindicado para la práctica de la invención.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a las alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o."

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgados en este documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser referido y reclamado individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en este documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden ser incluidos o eliminados de un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce dicha inclusión o eliminación, se considera que la especificación contiene el grupo modificado tal que cumple con la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en este documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones en esas realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. El inventor espera que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores tienen la intención de que la invención se practique de otra manera que la específicamente descrita en este documento. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del tema mencionado en las reivindicaciones adjuntas a este, según lo

permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto.

Las realizaciones específicas divulgadas en este documento pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones utilizando consistentemente o consistentemente en lenguaje. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea como se presenta o agregado por enmienda, el término de transición "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados y a aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas. Las realizaciones de la invención así reivindicadas se describen inherentemente o expresamente y se habilitan en este documento.

Los párrafos siguientes además describen aspectos y realizaciones de la invención:

1. Una composición de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que comprende un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%.

2. La composición de FDKP de acuerdo con el párrafo 1, en donde dicho contenido de isómero trans es de aproximadamente 50% a aproximadamente 65%.

3. La composición de FDKP de acuerdo con el párrafo 1, en donde dicho contenido de isómero trans es de aproximadamente 53% a aproximadamente 63%.

4. Micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que comprenden la composición de FDKP del párrafo 1.

5. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 4, en donde dicho contenido de isómero trans es de aproximadamente 50% a aproximadamente 65%.

6. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 4, en donde dicho contenido de isómero trans es de aproximadamente 53% a aproximadamente 63%.

7. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 4, que además comprenden un fármaco o un agente activo.

8. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 7, en donde dicho fármaco o agente activo es un péptido o proteína.

9. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 8, en donde dicho péptido es una hormona endocrina.

10. Micropartículas de FDKP de acuerdo con el párrafo 9, en donde dicha hormona endocrina es insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, glucagón, péptido 1 similar al glucagón, oxintomodulina, un fragmento análogo o activo de dicha hormona endocrina.

11. Las micropartículas del párrafo 4, en donde el fármaco está presente en una cantidad mayor que 0,01 % en peso de las micropartículas.

12. Un polvo seco que comprende las micropartículas del párrafo 4.

13. Un polvo seco que comprende las micropartículas del párrafo 7.

14. Un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con el sistema endocrino que comprende administrar a una persona que lo necesite una formulación de polvo seco que comprende micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que comprenden un contenido de isómero trans de FDKP de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% y una hormona endocrina adecuada para tratar dicha enfermedad o trastorno.

15. El método del párrafo 14, en donde la hormona endocrina es insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, glucagón, péptido 1 similar al glucagón, oxintomodulina, o un análogo de dicha hormona endocrina.

16. El método del párrafo 14, en donde la enfermedad relacionada con el sistema endocrino es diabetes.

17. Un método de obtención de micropartículas adecuada para administración pulmonar como un polvo seco que comprende:

a) sintetizar el compuesto FDKP que tiene un contenido de isómero trans FDKP de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%;

b) disolver el compuesto FDKP en una solución que tiene un pH básico para formar una solución de FDKP;

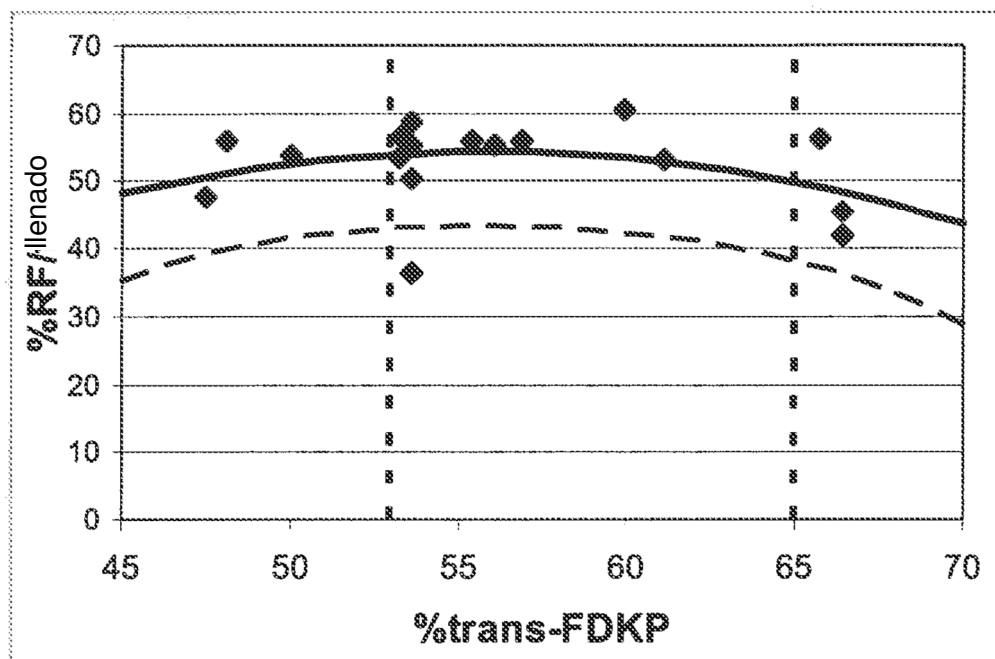
c) proporcionar una solución de un ácido volátil, y

- d) mezclar las soluciones juntas en un mezclador de alto cizallamiento para producir dichas micropartículas en una suspensión.
18. El método del párrafo 17, que además comprende determinar el contenido de isómero trans del FDKP.
- 5 19. El método del párrafo 18, en donde la etapa de determinar el contenido del isómero trans en el FDKP se realiza usando cromatografía líquida de alta presión.
20. El método del párrafo 17, que además comprende mezclar dichas micropartículas con una solución que comprende un fármaco.
21. El método del párrafo 17, en donde el fármaco es una hormona endocrina.
- 10 22. El método del párrafo 21, en donde el fármaco es insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, glucagón, péptido 1 similar al glucagón o un análogo de dicho fármaco.
23. Un método para sintetizar una dicetopiperazina que tiene un contenido de isómero trans de aproximadamente 45% a aproximadamente 65% que comprende:
- a) saponificar un éster de una dicetopiperazina en una mezcla de agua y un disolvente miscible en agua a un pH básico; y
- 15 b) recrystalizar la dicetopiperazina en una mezcla de reacción que comprende ácido trifluoroacético y ácido acético glacial en una relación resultante que varía de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7.
24. El método del párrafo 23, en donde el disolvente miscible en agua es un alcohol, tetrahidrofurano, dioxano y acetonitrilo.
25. El método del párrafo 24, en donde el alcohol es metanol, etanol, o isopropanol.
- 20 26. El método del párrafo 25, en donde el metanol está en una relación agua:metanol que oscila de 1:1 a aproximadamente 3:1.
27. El método del párrafo 23, que además comprende la etapa de determinar el contenido de isómero trans de la dicetopiperazina.
- 25 28. El método del párrafo 23, en donde la dicetopiperazina es de la fórmula 2,5-diceto-3,6-bis(N-X-4-aminobutil)piperazina, en donde X se selecciona del grupo que consiste en fumarilo, succinilo, maleilo y glutarilo.
29. El método del párrafo 23, en donde la dicetopiperazina es 2,5-diceto-3,6-bis(N- fumaril-4-aminobutil)piperazina.
30. El método del párrafo 23, en donde la mezcla de reacción en la etapa de recrystalización se mantiene durante un periodo de aproximadamente 4 horas o mayor que 4 horas.

REIVINDICACIONES

1. Micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que comprenden un contenido de isómero *trans* de FDKP de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%, en donde el comportamiento aerodinámico de las micropartículas está mejorado en comparación con micropartículas de FDKP que tienen un contenido de isómero *trans* fuera de dicho contenido de isómero *trans* de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%.
5
2. Un polvo seco para inhalación, que comprende las micropartículas de la reivindicación 1.
3. El polvo seco de la reivindicación 2, que además comprende un fármaco o un agente activo.
4. El polvo seco de la reivindicación 3, en donde el fármaco o agente activo es una molécula pequeña o un péptido.
5. El polvo seco de la reivindicación 4, en donde el péptido es insulina.
- 10 6. El polvo seco de la reivindicación 5, en donde la concentración de insulina es de aproximadamente 3 U/mg a aproximadamente 4 U/mg.
7. El polvo seco de las reivindicaciones 3 a 5, en donde las micropartículas tienen un contenido de fármaco de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%.
- 15 8. El polvo seco de la reivindicación 3, en donde el fármaco o el agente activo se selecciona del grupo que consiste en un agente vasoactivo, un agente neuroactivo, una hormona, un antibiótico, un antiviral, un agente citotóxico y un anticoagulante.
9. El polvo seco de la reivindicación 8, en donde el fármaco o el agente activo es una prostaglandina, tal como PG-12.
10. Un sistema de inhalación que comprende un inhalador de polvo seco y el polvo seco de las reivindicaciones 3 a 8.
- 20 11. El sistema de inhalación de la reivindicación 10, en donde el inhalador de polvo seco produce fracciones respirables en el llenado (RF/llenado) de una dosis de polvo mayor que 40% en una única inhalación, preferiblemente mayor que 50%, mayor que 60% o mayor que 70%.
12. El sistema de inhalación de la reivindicación 10, que además comprende un cartucho de dosis unitaria configurado estructuralmente para contener hasta 30 mg del polvo seco.
- 25 13. Una formulación de polvo seco que comprende micropartículas de fumaril dicetopiperazina (FDKP) que comprenden un contenido de isómero *trans* de FDKP de aproximadamente 45% a aproximadamente 65%; y una hormona endocrina adecuada para tratar una enfermedad o trastorno relacionada con el sistema endocrino para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionada con el sistema endocrino, en donde el comportamiento aerodinámico de las micropartículas está mejorado en comparación con micropartículas de dicetopiperazina que tienen un contenido de isómero *trans* fuera de dicho contenido de isómero *trans* de aproximadamente 45% a
30 aproximadamente 65%.
14. La formulación de polvo seco para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicha hormona endocrina es insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, glucagón, péptido 1 similar al glucagón, oxintomodulina o un análogo de dicha hormona endocrina.
- 35 15. La formulación de polvo seco para uso de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en donde la enfermedad relacionada con el sistema endocrino es diabetes.

FIG. 1



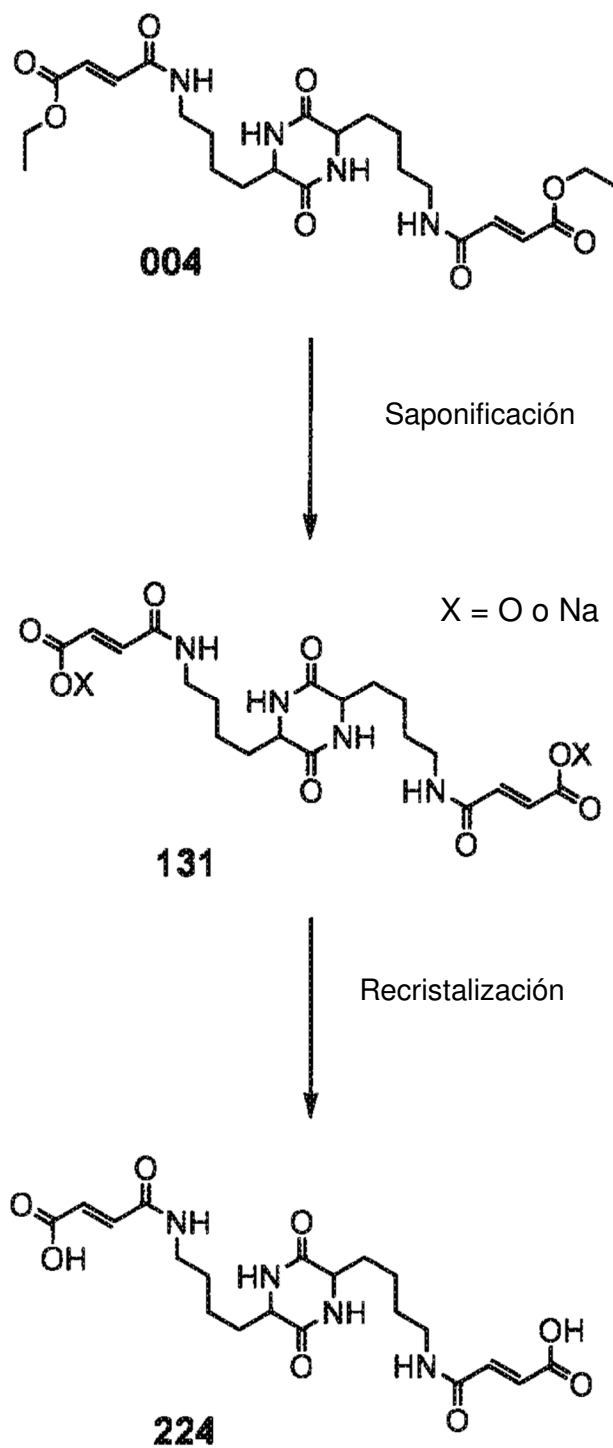


FIG. 2

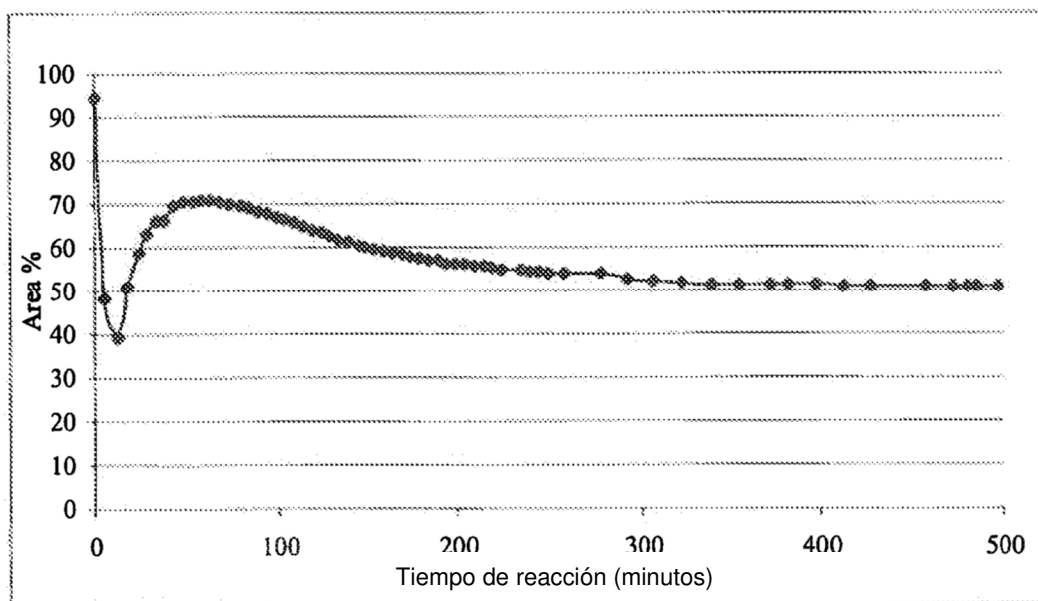


FIG. 3

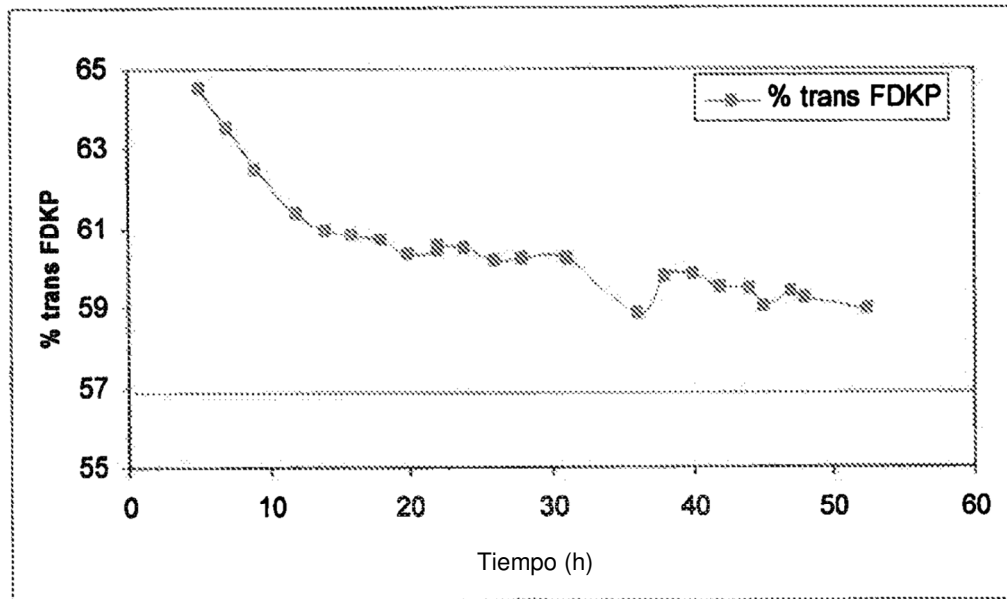


FIG. 4

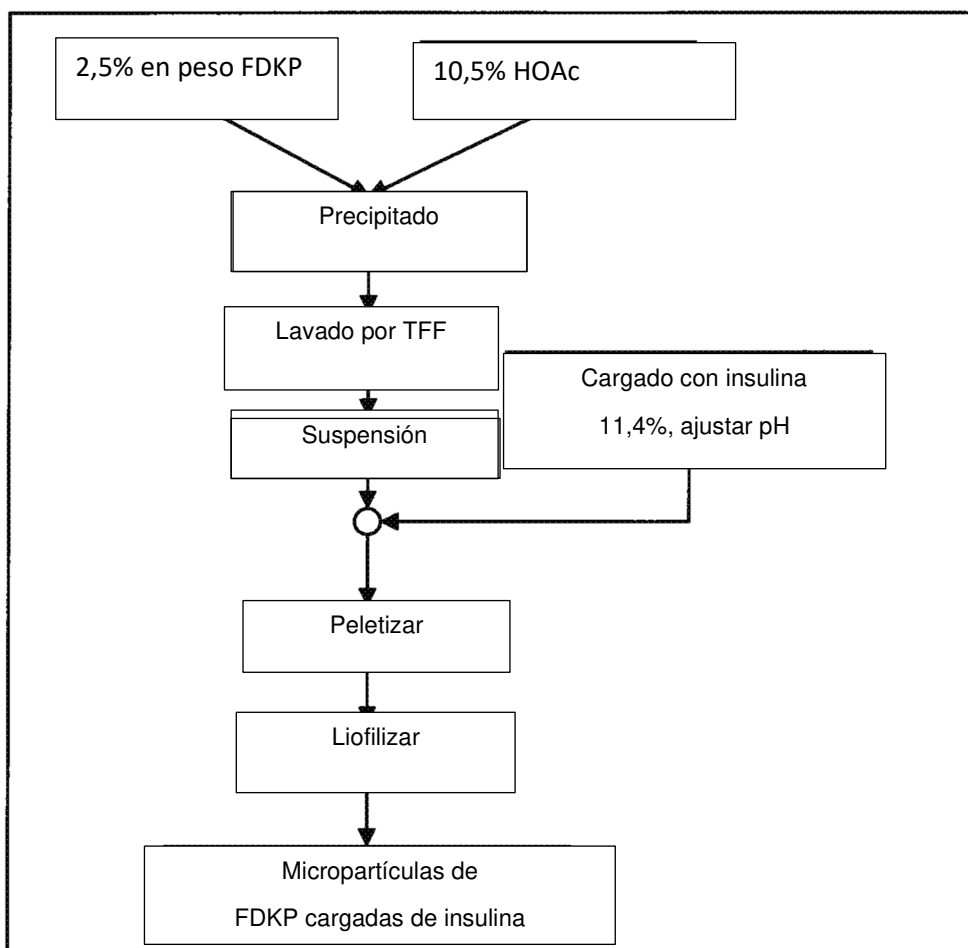


FIG. 5

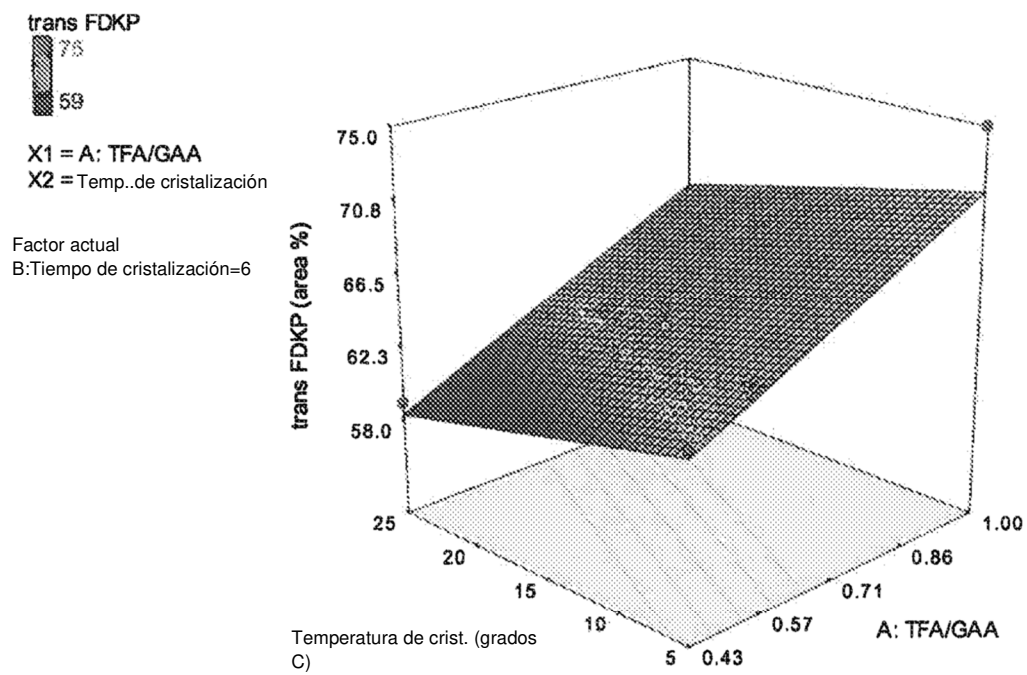


FIG. 6