



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 083 T2** 2006.12.28

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 438 955 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 083.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 009 645.5**

(96) Europäischer Anmeldetag: **02.07.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.07.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **07.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.12.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/127** (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

A61K 38/13 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

675654 **03.07.1996** **US**

731605 **16.10.1996** **US**

(73) Patentinhaber:

**Research Development Foundation, Carson City,
Nev., US**

(74) Vertreter:

Meissner, Bolte & Partner GbR, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Waldrep, Clifford J., The Woodlands Texas 77381,
US; Knight, Vernon, Houston Texas 77027, US;
Black, Melanie B, The Woodlands Texas 77381, US**

(54) Bezeichnung: **Hochdosierte liposomale Aerosolformulierung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Gebiete der biochemischen Pharmakologie und der medizinischen Chemie. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung hochdosierte Aerosolformulierungen aus Budesonid.

BESCHREIBUNG DES EINSCHLÄGIGEN STANDES DER TECHNIK

[0002] In der Lunge sind viele verschiedene Erkrankungen unter Verwendung von Aerosolabgabesystemen erfolgreich behandelt worden, die dazu dienen, Medikamente direkt auf die Lungenoberfläche aufzubringen. Für eine derartige Abgabe hat man eine Vielzahl von Vorrichtungen entwickelt (z.B. Inhalatoren mit bemessener Dosis und Inhalatoren für Trockenpulver). Strahlzerstäuber wurden klinisch für die Aerosolabgabe von wasserlöslichen Medikamenten und Suspensionen von feinst zerkleinerten Stoffen verwendet, bei wasserunlöslichen, hydrophoben Verbindungen ist deren Verwendung jedoch begrenzt.

[0003] Durch die Entwicklung von Liposomenformulierungen, die mit der Aerosolabgabe kompatibel sind, können weitere Medikamente mit Strahlzerstäubern verabreicht werden. Die Verwendung von Liposomen für die Aerosolabgabe hat viele Vorteile. Dazu gehören die Kompatibilität mit Wasser, die verzögerte Freisetzung in der Lunge, die die Beibehaltung von therapeutischen Werten des Medikaments ermöglicht; und außerdem erleichtern Liposomen die intrazelluläre Zuführung, insbesondere an alveoläre Makrophagen.

[0004] Die Wirksamkeit einer örtlichen, topischen Therapie mittels Aerosolen wird durch die Menge des Medikaments bestimmt, die den Stellen einer Erkrankung in der Lunge zugeführt wird; und es gibt einige unterschiedliche Schlüsselp Parameter, die die Zufuhrmenge und somit die therapeutische Wirksamkeit von Aerosolformulierungen bestimmen. Zum Beispiel stellen die Gestaltung und Abänderung des Zerstäubers, die Arbeitsbedingungen (z.B. die Strömungsrate) und das Vorhandensein einer Hilfsausrüstung (Schlauch, Verbindungen, Mundstücke, Gesichtsmasken und dergleichen) wichtige Variable dar.

[0005] Folglich kann der Wirkungsgrad des Aerosolausstoßes durch eine passende Ergänzung der geeigneten Zerstäubervorrichtung verbessert werden. Eine ungeeignete Ergänzung der Vorrichtung und/oder nicht perfekte Parameter können die inhalierten Dosen, die Stellen der Zuführung und das therapeutische Ergebnis beeinflussen.

[0006] Die Formulierung des Medikaments stellt ebenfalls einen kritischen Faktor dar, der den Wirkungsgrad des Aerosolausstoßes und die aerodynamischen Eigenschaften von Medikament-Liposomen regelt. Es wurde festgestellt, daß der Wirkungsgrad des Ausstoßes von Medikament-Liposomen durch die Verwendung von Liposomen verbessert werden kann, die mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen formuliert sind (siehe Waldrep et al., J. of Aerosol Med. 7:1994 (1994) und Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97:205-12 (1993)).

[0007] Ein weiteres Verfahren zur Erhöhung des Aerosolausstoßes von Medikament-Liposomen besteht in der Erhöhung der Vorratskonzentrationen von Medikament und Phospholipid. Das Zerstäuben einiger Medikament-Liposomenformulierungen mit mehr als 50 mg/ml führt zum Verstopfen der Zerstäuberdüsen; es wurden sogar unbeladene Liposomenformulierungen mit bis zu 150 mg/ml erfolgreich zerstäubt (siehe Thomas, et al., Chest 99:1268-70 (1991)).

[0008] Zudem wird die Aerosolleistung (Ausstoß und Partikelgröße) teilweise von den physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Viskosität und Oberflächenspannung, beeinflusst. Diese Variablen beeinflussen die maximalen Medikament-Liposomen-Konzentrationen, die mit der Aerosolabgabe mittels Strahlzerstäubern kompatibel sind.

[0009] Entzündungshemmende Glucocorticoide werden seit mehr als 40 Jahren für die Behandlung von Asthma und anderen schweren entzündlichen Erkrankungen der Lunge verwendet. Seit kurzem wird eine Therapie mit Glucocorticoid-Aerosolen in zunehmendem Maße als Verabreichungsweg angewendet. Gegenwärtig gibt es einige verschiedene, obwohl strukturell ähnliche, topisch aktive Glucocorticoide – z.B. Beclomethason, Budesonid, Flunisolid, Triamcinolonacetonid und Dexamethason – die in Inhalatoren mit einer bemessenen Dosis oder Inhalatoren für Trockenpulver zur Aerosolbehandlung von Asthma und anderen entzündlichen Erkrankungen zur Verfügung stehen.

[0010] Obwohl systemische Komplikationen, wie eine Störung der hypothalamisch-hypophysären Achse, eine Kataraktbildung und eine Wachstumshemmung, bei mit inhalierten Glucocorticoiden behandelten Asth-

matikern selten auftreten, sind örtliche Nebenwirkungen in Form von Candidiasis und Dysphonie häufiger, so daß die Verwendung zusätzlicher Zwischenstücke erforderlich wird. Gegenwärtig sind in den Vereinigten Staaten von Amerika keine Glucocorticoidformulierungen für die Verabreichung durch Zerstäubung zugelassen, obwohl in Europa und Kanada Suspensionen von feinst zerkleinertem Beclomethason und Budesonid verwendet werden.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft konzentrierte hochdosierte Aerosolformulierungen aus Budesonid-Liposomen, die beim Erreichen der Partikelgröße im optimalen Bereich des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers (MMAD) mit 1 µm bis 3 µm einen maximalen Aerosolausstoß liefern. Im Stand der Technik gibt es keine derartigen Aerosolformulierungen aus Liposomen. Die vorliegende Erfindung erfüllt den Bedarf und die Forderung, die auf diesem Fachgebiet schon lange bestehen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine hochdosierte pharmazeutische Liposomen-Aerosolzusammensetzung anzugeben, die etwa 12 bis 30 mg/ml der pharmazeutischen Verbindung Budesonid und etwa 130 bis 375 mg von Phospholipid/ml einer zugrunde liegenden Vorratskonzentration enthält, wobei die Partikelgröße des Liposoms im Bereich von 1,0 µm bis 3,0 µm liegt, und zwar anhand des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers gemessen.

[0013] Bei einer Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine hochdosierte Budesonid-Liposomen (Bud)-Aerosolzusammensetzung vorgesehen, die bis zu etwa 15 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

[0014] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine hochdosierte Budesonid-Liposomen-Aerosolzusammensetzung angegeben, die bis zu etwa 15 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 225 mg eines Dilauroylphosphatidylcholin (DLPC)/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

[0015] Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform gemäß der Erfindung, ist eine hochdosierte Budesonid-Liposomen-Aerosolzusammensetzung vorgesehen, die bis zu etwa 12,5 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 200 mg eines Dilauroylphosphatidylcholin (DLPC)/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist. Andere Phospholipide können das DLPC bei der hochdosierten Budesonid-Liposomen-Formulierung ersetzen.

[0016] Die vorliegende Erfindung gibt somit eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen an, die etwa 12 bis 30 mg/ml der pharmazeutischen Zusammensetzung in bis zu etwa 130 bis 375 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

[0017] Andere und weitere Aspekte, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung von derzeit bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung, die zum Zwecke der Erläuterung angegeben sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] Damit die Zusammenhänge, wie die oben erwähnten Merkmale, Vorteile und Ziele der Erfindung erreicht werden, im einzelnen verstanden werden können, wird auf die spezielle Beschreibung der Erfindung, die oben kurz zusammengefaßt ist, Bezug genommen, die im Zusammenhang mit bestimmten Ausführungsformen erfolgt, die im einzelnen in den beiliegenden Zeichnungen erläutert sind. Diese Zeichnungen bilden einen Teil der Beschreibung. Es ist jedoch selbstverständlich, daß die beiliegenden Zeichnungen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung erläutern.

[0019] [Fig. 1](#) zeigt das Profil der Aerosolverteilung von hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Budesonid-DLPC-Liposomen, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10 l/min zerstäubt wurden, wie es mit dem Andersen-Kaskadenimpaktor bestimmt wurde. Die Werte (Durchschnittswert ± Standardabweichung) geben den anteiligen Prozentsatz des gesamten Cyclosporins A, das in jeder Stufe des Impaktors gewonnen wurde, mit der zugehörigen Größentrennung in µm an (n = 3 Analysen). Die massegemittelten aerodynamischen Durchmesser (MMAD) und die geometrischen Standardabweichungen (GSD) wurden mit einer Kurve der logarithmischen Wahrscheinlichkeit berechnet.

[0020] [Fig. 2](#) zeigt das Budesonid, das aus hochdosierten und niedrigdosierten Formulierungen von Budesonid-DLPC-Liposomen inhaliert wurde, die mit einem Zerstäuber Aerotech II mit einer Strömungsrate von 10

l/min zerstäubt wurden, wie es mit einem Simulationsmodell der menschlichen Lunge bei einem Wechselvolumen (TV) von 500 ml und 15 Atemzügen pro Minute (BPM) bestimmt wurde. Die Werte geben das Budesonid an, das zu unterschiedlichen Zerstäubungszeitpunkten mit Filtern, die an einem Harvard-Respirator angebracht waren, der bei einem Wechselvolumen (TV) von 500 ml und einer Rate von 15 Atemzügen pro Minute (BPM) eingestellt worden war, aus Aerosolproben aufgefangen wurde.

[0021] [Fig. 3](#) zeigt die entzündungshemmende Wirkung einer hohen Dosis von Bud-DLPC auf Leukocyten einer bronchiolaralveolären Spülung (BAL) der Lunge als Reaktion auf eine Anregung mit LPS (Endotoxin).

[0022] [Fig. 4](#) zeigt eine Gradientenanalyse über Perkoll von Bud-DLPC-Liposomen.

[0023] [Fig. 5](#) zeigt den DLPC-Aerosolausstoß (mg/min) von zerstäubten unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit Wasser getestet und standardisierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und Probenpaare wurden bei 4 bis 5 und 6 bis 7 Minuten der Zerstäubung in Aufprallvorrichtungen AGI-4 aufgefangen. Die DLPC-Konzentrationen wurden durch HPLC-Analyse bestimmt. Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem ursprünglichen DLPC-Gehalt der Liposomen (mg/ml) graphisch aufgetragen.

[0024] [Fig. 6](#) zeigt den Massenauswurf (g/min) von zerstäubten unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit Wasser getestet und standardisierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und der Masseauswurf wurde nach 10 min Zerstäubung mit einer analytischen Waage bestimmt. Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem ursprünglichen DLPC-Gehalt der Liposomen (mg/ml) graphisch aufgetragen.

[0025] [Fig. 7](#) zeigt den CsA- und Bud-Aerosolausstoß (mg/min) von zerstäubten CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen. Die Aerosole wurden mit Wasser getestet und standardisierten Zerstäubern Aerotech II erzeugt (anfängliches Ausgangsvolumen 5 ml; Strömungsrate 10 l/min), und Probenpaare wurden bei 4 bis 5 und 6 bis 7 Minuten der Zerstäubung in Aufprallvorrichtungen AGI-4 aufgefangen. Die Medikamentenkonzentrationen wurden durch HPLC-Analyse aus aliquoten Probenmengen bestimmt, die ebenfalls auf den DLPC-Gehalt analysiert wurden ([Fig. 1](#)). Die aufgeführten Werte sind für Formulierungen repräsentativ, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurden, und sind gegenüber dem anfänglichen Medikamentengehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen.

[0026] [Fig. 8](#) zeigt eine Analyse der Viskosität (Zentipoise) von unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen (anfängliches Ausgangsvolumen 10 ml; Raumtemperatur). Die aufgeführten Werte sind der Durchschnittswert von 10 Beobachtungen bei jeder Formulierung, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurde, und sind gegenüber dem anfänglichen DLPC-Gehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen.

[0027] [Fig. 9](#) zeigt eine Analyse der Oberflächenspannung (dyn/cm) von unbeladenen DLPC-, CsA-DLPC- und Bud-DLPC-Liposomenformulierungen mit zunehmenden Konzentrationen (anfängliches Ausgangsvolumen 7 ml; Raumtemperatur). Die aufgeführten Werte sind der Durchschnittswert von 10 Beobachtungen für jede Formulierung, die bei jeder angegebenen Konzentration getestet wurde, und sind gegenüber dem anfänglichen DLPC-Gehalt des Liposoms (mg/ml) graphisch aufgetragen. Es wurde auch die Viskosität der Proben analysiert.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0028] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, den Wirkungsgrad bei der Abgabe einer hochdosierten Aerosolzusammensetzung aus Liposomen einer pharmazeutischen Verbindung zu verbessern. Bei einer Reihe von Versuchen wurde festgestellt, daß der Medikamentenausstoß bei einem Aerosol durch die Verwendung von Liposomen, die mit niedrigen Phasenübergangstemperaturen formuliert sind, wie DLPC (das Seitenketten aus gesättigten Fettsäuren mit 12 Kohlenstoffatomen enthält), verbessert werden kann.

[0029] Es wurde auch festgestellt, daß bestimmte Zerstäuber den Aerosolausstoß von Medikament-Liposomen im gewünschten Größenbereich des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers (MMAD) von 1

bis 3 µm verbessern. Die in diesen früheren Untersuchungen angewendete Konzentration von Cyclosporin A betrug 1,0 mg bei 7,5 mg DLPC/ml der zugrundeliegenden Lösung im Vorrat.

[0030] Untersuchungen bei der vorliegenden Erfindung haben auch ergeben, daß Glucocorticoid-Budesonid stabile Liposomen erzeugt, die in wirksamer Weise zerstäubt werden können und Aerosole im Bereich von 1 bis 3 µm MMAD erzeugen. Bei dieser Vorratskonzentration wäre das typische Inhalationsintervall, das erforderlich ist, um eine tägliche Dosis für Asthma aus dem AT II-Zerstäuber zu liefern, etwa 15 Minuten. Dies wäre klinisch durchführbar und praktisch zu realisieren.

[0031] Boehringer-Ingelheim hat Glucocorticoid-Liposomen in einer Zerstäubereinrichtung getestet. Die Konzeption ihrer Einrichtung war für die Abgabe von 100 bis 200 µg Glucocorticoid pro 20 µl bei einer Betätigung ausgelegt. Eine einfache mathematische Umrechnung ergibt, daß 5000 bis 10000 µg/ml in dem Reservoir der Einrichtung erforderlich wären. Bei diesen Experimenten mit der angegebenen Einrichtung wurde Budesonid in einem Ethanol-Träger getestet.

[0032] Auf der Basis von früheren Erfahrungen, um die notwendige Konzentration einer Liposomen-Formulierung zu erreichen, wurde eine konzentrierte und viskose Suspension erzeugt. Bei vorherigen Experimenten mit Budesonid wurde ein Verhältnis von 1:25 (Budesonid zu DLPC im Gewichtsverhältnis) verwendet. Auf der Basis des erforderlichen hohen DLPC-Gehaltes wurden verschiedene Budesonid-DLPC-Verhältnisse untersucht, und das Verhältnis von 1:15 wurde als geeignet ermittelt.

[0033] Die Formulierung wurde dann gesteigert, zunächst auf 5 mg Budesonid : 75 mg DLPC pro ml, und schließlich auf 10 mg Budesonid : 150 mg DLPC pro ml. Eine Steigerung mit anderen Glucocorticoiden (Beclomethason-Dipropionat oder Flunisolid) war schwieriger aufgrund von unstabilen Formulierungen. Die 10 mg Budesonid-150 mg DLPC Formulierung war stabil und konnte mit dem AT II Zerstäuber in wirksamer Weise zerstäubt werden.

[0034] [Fig. 1](#) zeigt, daß eine erhöhte Konzentration zu größeren Aerosolpartikeln führt, so daß der MMAD-Wert von 1,2 µm bis auf 2,0 µm bei dem hochdosierten Budesonid-DLPC ansteigt. [Fig. 2](#) zeigt, daß nach einer einzigen 15-minütigen Inhalation dieser hochdosierten Budesonid-Formulierung etwa 6 mg des Budesonids inhaliert würden oder das 6-fache der höchsten klinischen täglichen Dosis. Die Relation zwischen dem Aerosolausstoß des niedrigdosierten und hochdosierten Budesonid-DLPC ist nicht proportional.

[0035] Ein repräsentatives „hochdosiertes“ Budesonid-DLPC-Liposomenaerosol liegt im Bereich von etwa 12,5 mg Budesonid/225 mg DLPC pro ml. Andere Phospholipide können das DLPC in der hochdosierten Budesonid-Liposomen-Formulierung gemäß der vorliegenden Erfindung ersetzen. Diese hochdosierte Aerosolformulierung von Budesonid-DLPC-Liposomen ist klinisch nützlich bei der Behandlung von bestimmten Entzündungs-Lungenkrankheiten, wie Asthma und interstitieller Fibrose, sowie bei immunologisch vermittelten Lungenkrankheiten, wie zum Beispiel der Abstoßung eines Alлотransplantats, Bronchiolitis obliterans, Allergie und Hyperempfindlichkeiten. Dies würde sich als nützlich erweisen bei der Therapie von Kindern, Erwachsenen und älteren Patienten, und zwar mit verschiedenen Zerstäubersystemen.

[0036] Die nachstehenden Beispiele werden angegeben, um verschiedene Ausführungsformen der Erfindung zu erläutern.

BEISPIEL 1

Liposomenformulierung: Herstellung von hochdosierten Medikament-Liposomen

[0037] Für eine Formulierung von hochdosierten Budesonid-DLPC-Liposomen wurde das optimale Verhältnis zwischen Medikament und Lipid bestimmt, indem verschiedene Formulierungen bei Verhältnissen von Budesonid-DLPC von 1:1 bis 1:20 getestet wurden. Das Verhältnis (auf das Gewicht bezogen) von 1:15 wurde für eine hochdosierte Budesonid-DLPC-Formulierung als optimal ausgewählt. Die hochdosierte Formulierung wird hergestellt, indem 10 bis 150 mg Budesonid mit 150 bis 2250 mg DLPC gemischt werden (wie es vorstehend für Cyclosporin A-DLPC beschrieben ist).

[0038] Das Medikament/das DLPC wurden unter Rühren in 20 ml tert.-Butanol gemischt, wobei in einem warmen Raum bei 37 °C gearbeitet wurde. Nach dem Mischen wurde das Medikament/Lipid-Gemisch in Glasampullen pipettiert, schnell eingefroren und danach über Nacht gefriergetrocknet, um tert.-Butanol zu entfernen, so daß ein Pulvergemisch zurückblieb.

[0039] Multilamellare Liposomen wurden hergestellt, indem 10 ml hochreines Wasser oberhalb der Phasenübergangstemperatur (T_c) bei 25 °C zugesetzt wurden, so daß eine abschließende übliche Medikamentenkonzentration von 1 bis 15 mg Budesonid : 15 bis 225 mg DLPC pro ml Lösung bereitgestellt wurde. Das Gemisch wurde bei diskontinuierlichem Mischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so daß multilamellare vesikuläre Liposomen hergestellt wurden. Für die Bestimmung der Medikamentenkonzentration durch HPLC wurden aliquote Mengen entnommen.

[0040] In einer anderen Ausführungsform kann diese Liposomenformulierung durch Rotationsverdampfung hergestellt werden. [Fig. 4](#) zeigt die Gradientenanalyse über Perkoll von Bud-DLPC-Liposomen (siehe O'Riordan et al., J. of Aerosol Med., in einer Veröffentlichung (1996)). Nach dem Quellen waren die multilamellaren vesikulären Budesonid-DLPC-Liposomen einige Wochen bei Raumtemperatur stabil. Sterile Präparate waren über Monate stabil. Als Konservierungsmittel kann Benzalkoniumchlorid (10 mg/l) zugesetzt werden.

BEISPIEL 2

Liposomen-Aerosole: Behandlung mit einem Aerosol aus Medikament-Liposomen

[0041] Für die Herstellung von Aerosolen aus Medikament-Liposomen wurde der Zerstäuber Aerotech II (CIS-USA, Bedford USA) verwendet, obwohl auch andere handelsübliche Zerstäuber verwendet werden können. Der ATII ist ein wirksamer Zerstäuber mit hohem Ausstoß, der gezeigt hat, daß er Aerosole von Liposomen im optimalen Größenbereich von 1 bis 3 µm MMAD für die Abgabe an die Lungenperipherie produzieren kann (siehe Vidgren, et al., Int'l of Pharmaceutics 115:209-16 (1994)).

[0042] Dem Zerstäuber wurde Trockenluft aus einem Vorrat zugeführt, und seine interne Trockenluftaufnahme über einen regulierten Durchflußmesser betrug 10 l/min. Ein anfängliches Vorratsvolumen von 5 ml ist für 15 bis 20 Minuten Aerosol ausreichend. Längere Behandlungszeiträume würden das Nachfüllen des Vorrats erfordern.

BEISPIEL 3

Partikelgrößenverteilung eines Aerosols aus Medikament-Liposomen

[0043] Die aerodynamische Messung der Partikelgröße von Aerosolen aus Medikament-Liposomen erfolgte, wie es bei Waldrep et al., J. of Aerosol Med. 7:1994 (1994) beschrieben ist, wobei ein Probennehmer für die Partikelgrößenbestimmung in einer nichtpraktikablen Umgebung, Andersen 1 ACFM (Graseby Andersen Instruments Inc., Atlanta, GA), als Simulator für die menschliche Lunge verwendet wurde (Andersen). Die vom Zerstäuber ATII erzeugten Aerosole aus Medikament-Liposomen wurden mit einer Vakuumpumpe (1 ACFM) aufgefangen, indem man sie bei jedem Versuch in einem üblichen Intervall für das Probenziehen von 0,5 Minuten auf acht Aluminiumkaskaden aufprallen ließ.

[0044] Medikamentenkonzentrationen in den Aerosoltropfen mit einer Größe von 0 µm bis 10 µm wurden in jeder Kaskade aufgefangen (0 = 9,0 µm bis 10,0 µm; 1 = 5,8 µm bis 9,0 µm; 2 = 4,7 µm bis 5,8 µm; 3 = 3,3 µm bis 4,7 µm; 4 = 2,1 µm bis 3,3 µm; 5 = 1,1 µm bis 2,1 µm; 6 = 0,65 µm bis 1,1 µm; 7 = 0,43 µm bis 0,65 µm) und nach dem Eluieren mit 10 ml Ethanol oder Methanol und durch HPLC-Analyse bestimmt. Eine künstliche Verengung gemäß USP, die an der Einlaßöffnung des Impaktors angebracht war, diente dazu, einige wenige Aerosolpartikel zu entfernen, die größer als 10 µm waren. Die letzte Stufe verwendete einen Sammelfilter aus Glasfasern.

[0045] Nachdem die Medikamentenkonzentrationen für jede Kaskade durch HPLC bestimmt worden waren, wurden der massegemittelte aerodynamische Durchmesser (MMAD) und die geometrische Standardabweichung (GSD) der Medikament-Liposomen auf einer Skala der logarithmischen Wahrscheinlichkeit mit dem wirksamen Trenndurchmesser als Ordinate und dem kumulativen Prozentsatz unterhalb des Größenbereichs (anhand der Konzentration) als Abszisse berechnet (KaleidaGraph 3.0).

[0046] Der MMAD und die GSD werden anhand des Medikamentengehalts der Liposomen bestimmt, die in der Gruppe von Tropfen verteilt sind, aus denen das Aerosol besteht (siehe Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97:205-12 (1993)). Statt der Liposomengröße bestimmte die Gruppe von Tropfen den MMAD und die GSD. Die Gültigkeit dieser Methode für die Berechnung des MMAD und der GSD wurde unabhängig davon mit dem Laser Aerosol Particle Sizer, Modell 3300 TSI bestätigt.

BEISPIEL 4

Schätzung der inhalierten Dosis

[0047] Für die Bestimmung der geschätzten inhalierten Dosis von Bec-DLPC-Liposomen wurden zerstäubte Proben in einem System zur Simulation der menschlichen Lunge aufgefangen, wie es bei Smaldone et al., Am Rev Respir Dis 143:727-37 (1991) beschrieben ist. Mit einem Harvard Respirator wurden Aerosolproben aus dem Zerstäuber ATII (Strömungsrate 10 l/min) auf Whatman-Filtern GF/F aufgefangen, wobei 15 Atemzüge pro Minute bei Wechselvolumina von 500 ml angewendet wurden.

[0048] Dieses grundsätzliche Wechselvolumen von 500 für Männer (450 für Frauen) wurde aus einem Nomo-gramm bestimmt, das für die Atemfrequenz, das Gewicht und das Geschlecht eingestellt worden war. Die Aerosolproben wurden innerhalb eines Zerstäubungszeitraums von 15 Minuten aufgefangen. Die auf den Filtern abgelagerte Menge von Cyclosporin A oder Budesonid wurde nach dem Herauslösen durch HPLC-Analyse bestimmt.

BEISPIEL 5

Analyse des Medikaments durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC): Analyse von Budesonid

[0049] Die HPLC-Analyse diente mehreren Zwecken, um folgendes zu bestimmen: den Budesonidgehalt von Liposomenformulierungen, den Wirkungsgrad beim Einkapseln und den Budesonidgehalt von Aerosolproben, die mit dem Lungensimulator erhalten worden waren. Die Budesonidkonzentrationen wurden durch HPLC-Analyse mit dem automatischen Probennehmer Waters WISP 717 und einer Säule Waters Nova-Pak C18 (3,9 × 150 mm) bei Raumtemperatur bestimmt.

[0050] Die Messung des Peaks erfolgte bei 238 nm mit einem variablen Detektor für UV/sichtbare Wellenlänge bei quantitativer Erfassung mit einem Millennium 2010 Chromatography Manager von Waters, Version 2.15. Die für diese Untersuchungen verwendete mobile Phase war Ethanol/Wasser mit 50:50 bei einer Strömungsrate von 0,6 ml/min (siehe Andersson & Ryrfeldt, J Pharm Pharmacol 36:763-65 (1984)). Die Proben für die Analyse wurden direkt in Ethanol gelöst (um die Liposomen zu lösen). Medikamentenstandards wurden aus Ethanolstammlösungen hergestellt, die bei -80 °C aufbewahrt wurden.

BEISPIEL 6

Medikamentenanalyse durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC): DLPC-Analyse

[0051] Es wurde eine Modifikation des HPLC-Protokolls von Grit und Commelin, Chem. & Phys. of Lipids 62:113-22 (1992) angewendet. Ein automatischer Probeninjektor 717 WISP von Waters und eine Amino-Säule Spherisorb S5 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm) wurde mit Acetonitril, Methanol und 10 mM Ammonium/Trifluoressigsäure, pH = 4,8 (64 : 28 : 8, Vol.: Vol.: Vol.) als mobile Phase verwendet. Die Peaks wurden mit einem Verdampfungs-Massendetektor (SEDEX 55, Sedre, Frankreich) erfaßt und mit dem Millennium 2010 Chromatography Manager von Waters, Version 2.15 mengenmäßig erfaßt. Die Proben für die Analyse wurden direkt in Ethanol oder Methanol gelöst (um die Liposomen zu lösen).

BEISPIEL 7

Lungenmodelle für den Medikament-Test bei Mäusen Untersuchung einer akuten Entzündung: LPS (Bronchiolare Spültechnik)

[0052] Ein gram-negatives Zellwand-Lipopolysaccharid (LPS) diente dazu, bei Mäusen reproduzierbar eine akute Lungenentzündung hervorzurufen. Ein 10-minütiger Einwirkungszeitraum des Aerosols E. coli 055:B5 LPS (Sigma), das durch den Zerstäuber PBsj 1600 (Vorratskonzentration 100 µg/ml, zugeführte Dosis 60 ng) erzeugt worden war, leitete eine starke phlogistische Reaktion ein, die durch die Ansammlung von PMN in den Alveolen als Reaktion auf die Wirkung von chemotaktischen Cytokinen bestimmt wurde (bei 3 Stunden nachweisbar; maximale Reaktion bei 6 Stunden nach dem Stimulus).

[0053] Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Einfluß des LPS-Aerosols wurden die Mäuse durch Anästhesie mit Methoxyfluran getötet und man ließ das Blut durch die abdominale Aorta ablaufen. Die Luftröhre wurde chirurgisch freigelegt, und es wurde eine Kanüle mit einem PE50-Schlauch gelegt (Außendurchmesser

0,965 mm, Clay Adams). Unter Verwendung eines Gesamtvolumens von 2,0 ml ausgeglichener Hank'scher Salzlösung (HBSS; Ca/Mg-frei mit EDTA) wurden die Lungen fünfmal mit einem Volumen von etwa 1,0 ml gespült.

[0054] Die Ausbeute lag typischerweise bei einer Gewinnung von 85 % des Spülfluids. Die resultierenden Leukocyten wurden mit einem Hämocytometer gezählt, cytozentrifugiert und gefärbt. Aus der unterschiedlichen Anzahl wurden die Effekte des Medikamenteffs anhand der Abnahme der Anzahl der Leukocyten und anhand der verringerten Anzahl von PMN und/oder gegenüber Myeloperoxidase positiven Zellen im Verhältnis zu den residenten Makrophagen und/oder gegenüber Myeloperoxidase negativen Zellen festgestellt.

[0055] Diese Analyse diente als Standard, um die biologische Aktivität eines Aerosolsystems aus Medikament-Liposomen durch die Abnahme des akuten entzündlichen zellulären Einflusses auf die Luftwege zu testen. [Fig. 3](#) zeigt den entzündungshemmenden Einfluß von hochdosiertem Bud-DLPC auf Leukocyten einer bronchiolaralveolären Spülung (BAL) der Lunge als Reaktion auf eine Anregung mit LPC (Endotoxin).

BEISPIEL 8

Cytologie: Lungenspülung

[0056] Die Zell-Präps (Spülung, Thymocyten, Lymphknoten oder Splenocyten) wurden mit einem Hämocytometer gezählt, auf Objektträger cytozentrifugiert (wobei das Miles Cyto-Tek verwendet wurde) und mit Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa oder einer Leukocyten-Peroxidase-Färbung gefärbt, wobei dies von der Präparierung abhängt. Die unterschiedliche Anzahl wurde durch mikroskopische Beobachtung, in Öl eingetaucht, bestimmt. Die biologischen Effekte des Aerosolsystems aus Medikament-Liposomen wurden anhand der Verringerung der Gesamtzahl der Leukocyten und anhand der verringerten Anzahl von PMN oder gegenüber Myeloperoxidase positiven Zellen im Verhältnis zu den residenten Makrophagen festgestellt.

BEISPIEL 9

Physikalisch-chemische Analyse:

Oberflächenspannung und Viskosität:

[0057] Die Oberflächenspannung (dyn/cm) wurde mit einem Tensiomat (Modell 21, Fisher Scientific, Indiana, PA) gemessen. Ein Platiniridiumring mit bekannter Abmessung wurde bei genau geregelten Bedingungen von der Oberfläche der zu testenden Flüssigkeit angehoben. Die vom Gerät abgelesenen "scheinbaren" Werte wurden mit einem Korrekturfaktor F multipliziert, der die Abmessungen des Meßrings, die Dichte der Flüssigkeit und andere Variable berücksichtigt (entsprechend den Vorschriften des Herstellers). Die Viskositätsmessungen erfolgten mit dem Kugelfallviskosimeter von Gilmont (Gilmont Instruments, Barrington, IL). Die Viskosität in Zentipoise wurde bei Raumtemperatur bestimmt.

Größenmessungen der Medikament-Liposomen

[0058] Die Partikelgröße der Medikament-Liposomenlösungen wurden durch quasielastische Lichtstreuung mit dem Größenmeßgerät für Submikronpartikel Nicomp Modell 370 (Programmversion 5.0, Nicomp Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA) gemessen. Die in Wasser dispergierten Proben der Medikament-Liposomen wurden nach den Vorschriften des Herstellers analysiert, und die Werte wurden als nach der Intensität gewichtete Vesikelgröße angegeben. Der mittlere Partikeldurchmesser der Medikament-Liposomen wurde zuerst von Proben des Vorrats, nach 10 Minuten Zerstäubung, und bei Aerosolproben gemessen, die mit der Aufprallvorrichtung AGI-4 gewonnen worden waren, wie es bei Waldrep et al., Int'l J. of Pharmaceutics 97:205-12 (1993) beschrieben ist.

[0059] Die Ergebnisse in [Fig. 5](#) (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) zeigen, daß ein erhöhter Aerosolausstoß von DLPC-Liposomen von bis zu 170 mg/ml bei einer Verringerung des Ausstoßes bei höheren Konzentrationen vorliegt. Eine Ausweitung dieser Daten auf CsA-DLPC-Liposomen erzielte ähnliche Ergebnisse bei einem maximalen Aerosolausstoß von Liposomen mit 21,3 mg CsA :160 mg DLPC/ml ([Fig. 5](#)). Bei Bud-DLPC-Liposomen wurde der maximale Aerosolausstoß von DLPC bei einer Formulierung nachgewiesen, die aus 12,5 mg Bud : 187,5 mg DLPC/ml bestand. Eine Analyse des Austrags des flüssigen Trägers aus dem Zerstäuber, die in [Fig. 6](#) gezeigt ist (als DLPC graphisch aufgetragen) zeigt einen von der Konzentration abhängigen, geringeren Ausstoß, der durch die Masse bestimmt wird, die pro Minute als Aerosol gesprüht wird.

[0060] Bei zunehmenden Liposomenkonzentrationen gibt es eine ähnliche begleitende Zunahme des Aerosol ausstoßes bis zu einem kritischen Punkt ([Fig. 7](#)) (als Medikamentenkonzentration graphisch aufgetragen). Messungen des Ausstoßes des als Aerosol gesprühten Medikaments aus CsA und Bud durch HPLC-Analyse zeigten maximale Konzentrationen für die Zerstäubung ([Fig. 7](#)). Bei CsA-DLPC-Liposomen lag der maximale Ausstoß bei 21,3 mg CsA : 160 mg/ml. Bei Bud-DLPC lag das Maximum bei 12,5 mg Bud : 187,5 mg DLPC. Die physikalisch-chemischen Analysen dieser Liposomenformulierungen zeigten eine parallele Zunahme der Viskosität (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) ([Fig. 8](#)).

[0061] Die Ergebnisse für DLPC, Bud-DLPC und CsA-DLPC waren ähnlich. Die Viskosität der Bud-DLPC-Formulierungen betrug etwa 20 % weniger als die des unbeladenen DLPC allein. Die Viskosität von CsA-DLPC war durchweg die niedrigsten und zwischen 16 mg CsA/120 mg DLPC und 24 mg CsA/180 mg DLPC/ml unveränderlich. Diese Ergebnisse legen nahe, daß es für jede Formulierung eine maximale Viskosität gibt, die mit dem Ausstoß des zerstäubten Aerosols kompatibel ist; oberhalb dieses Schwellenwertes gibt es bei steigenden Medikament-Liposomen-Konzentrationen keinen zusätzlichen Ausstoß.

[0062] Die Ergebnisse in [Fig. 9](#) (als DLPC-Konzentration graphisch aufgetragen) zeigen, daß die Zugabe von CsA und Bud zu DLPC-Liposomen zu einer Verringerung der Oberflächenspannung der Formulierung führt. Die Verringerung der Oberflächenspannung war bis zu einem Punkt konzentrationsabhängig, wobei sie bei etwa 100 mg DLPC/ml ein Plateau erreichte. Es gab keinen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Aerosol ausstoß der Liposomenformulierungen und der Oberflächenspannung. Mit zunehmender Konzentration der Liposomenformulierungen wurde jedoch zwischen der gemessenen Oberflächenspannung und Viskosität ein umgekehrter Zusammenhang festgestellt.

[0063] Die Analyse von Formulierungen von Medikament-Liposomen vor dem Zerstäuben durch quasielastische Lichtstreuung zeigte einen anfänglichen heterogenen Größenbereich von etwa 2,2 µm bis 11,6 µm (das liegt bei oder in der Nähe der oberen Genauigkeitsgrenze des Nicomp 370). Nach dem Zerstäuben wurden bei jeder Formulierung minimale Unterschiede nachgewiesen. Der Größenbereich der Liposomen im Vorrat des Zerstäubers betrug 294 nm bis 502 nm, und Aerosolproben, die mit der Aufprallvorrichtung AGI-4 aufgefangen wurden, lagen im Bereich von 271 nm bis 555 nm.

[0064] Hochdosierte Formulierungen von Medikament-Liposomen, die aus 10 mg Bud 150 mg DLPC und CsA 20 mg : DLPC 150 mg bestanden, wurden für weitere Aerosoluntersuchungen ausgewählt. Eine Analyse mit dem Andersen-Kaskadenimpaktor zeigte Werte von 2,0 µm MMAD/1,5 GSD für Bud-DLPC und 2,0 µm/1,8 für CsA-DLPC (Tabelle 2). Eine Analyse dieser Formulierungen in einem Modell zur Simulation der menschlichen Lunge bei 15 BPM und einem Wechselvolumen von 500 ml zeigte, daß ein 3-minütiger Inhalationszeitraum erforderlich wäre, um eine tägliche Dosis von Bud in Liposomen von 1000 µg zu inhalieren, bis zu 5000 µg könnten in 12 Minuten inhaliert werden (Tabelle 2).

[0065] Die Ergebnisse der Inhalation von CsA-DLPC im Modell zur Simulation einer Lunge zeigten, daß bei hochdosiertem CsA-DLPC 4 Minuten erforderlich wären, um 5000 µg zerstäubtes CsA in Liposomen zu inhalieren; 11,5 Minuten wären erforderlich, um 15000 µg CsA zu inhalieren (Tabelle 2). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Kapazität der Liposomen für die Verabreichung eines Medikaments als Aerosol.

Tabelle 2

Aerosolanalyse und inhalierte Konzentrationen von zerstäubten hochdosierten Formulierungen von Bud-DLPC- und CsA-DLPC-Liposomen

| <u>Bud 10 mg – DLPC 150 mg</u> | <u>1000 µg Dosis</u> | <u>5000 µg Dosis</u> |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|
| 2,0 µm MMAD* | 3 Minuten | 12 Minuten |
| 1,5 GSD | Inhalation # | Inhalation # |
| | | |
| <u>CsA 20 mg – DLPC 150 mg</u> | <u>5000 µg Dosis</u> | <u>15000 µg Dosis</u> |
| 2,0 µm MMAD* | 4 Minuten | 11,5 Minuten |
| 1,8 GSD | Inhalation # | Inhalation # |

* Andersen-Kaskadenaufprallvorrichtung (Durchschnittswert von 3 Bestimmungen)

Modell zur Simulation einer menschlichen Lunge (15 BPM/500 ml TV), die Dosierung wurde durch lineare Regressionsanalyse berechnet (Bud-DLPC n = 3; CsA-DLPC n = 2 Analysen).

[0066] Die vorliegende Erfindung ist somit auf eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen gerichtet, die bis zu etwa 15 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist. Am meisten bevorzugt weist die hochdosierte Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen bis zu etwa 15 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration auf.

[0067] Für die erfindungsgemäße Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen liegt die Partikelgröße, anhand des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers gemessen, im Bereich von etwa 1,0 µm bis etwa 2,0 µm. Im allgemeinen hat in der Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen das Verhältnis von Budesonid zu Phospholipid Werte von etwa 1 bis etwa 15. Repräsentative Beispiele von Phospholipid sind oben angegeben.

[0068] Typischerweise kann die Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen verwendet werden, um immunologisch vermittelte und entzündliche Lungenkrankheiten zu behandeln. Repräsentative Beispiele von immunologisch vermittelten und entzündlichen Lungenkrankheiten sind oben angegeben. Budesonid hemmt sowohl Immunantworten als auch Entzündungen. Diese Lungenkrankheiten können auch beide Komponenten haben.

[0069] Die vorliegende Erfindung zielt ferner auf die Behandlung eines Individuums, das eine immunologisch vermittelte Lungenkrankheit besitzt, und umfaßt den Schritt der Verabreichung einer pharmakologisch akzeptablen Dosis einer hochdosierten Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen an das Individuum. Die Herstellung von geeigneten pharmazeutischen Zusammensetzungen und Konzentrationen für die Verabreichung ergeben sich ohne weiteres für den Fachmann auf diesem Gebiet aus den vorstehend gegebenen Lehren.

[0070] Die Erfindung richtet sich auch auf eine hochdosierte Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen, die bis zu etwa 15 mg/ml Budesonid in bis zu etwa 225 mg von Dilauroylphosphatidylcholin/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration aufweist.

Patentansprüche

1. Hochdosierte Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen, die folgendes aufweist:
12 bis 30 mg/ml Budesonid in 130 bis 375 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration, wobei die Partikelgröße dieses Liposoms im Bereich von 1,0 bis 3,0 µm liegt, und zwar anhand des massegemittelten aerodynamischen Durchmessers gemessen.
2. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 1, die folgendes aufweist:
12,5 mg/ml Budesonid in 225 mg eines Phospholipids/ml zugrundeliegender Vorratskonzentration.
3. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 1, wobei das Verhältnis zwischen Budesonid und Phospholipid 1 zu 15 beträgt.
4. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 1, wobei das Phospholipid ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Phosphatidylcholin aus Eigelb, Phosphatidylcholin aus hydrierten Sojabohnen, Dimyristoylphosphatidylcholin, Dilauroylphosphatidylcholin, Dioleypalmitoylphosphatidylcholin und Dipalmitoylphosphatidylcholin besteht..
5. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 1 für die Verwendung bei der Behandlung einer immunologisch vermittelten und entzündlichen Lungenerkrankung.
6. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 5, wobei die immunologisch vermittelte Lungenerkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus einer Allotransplantatabstoßung, Bronchiolitis obliterans, Allergie, Überempfindlichkeiten und Asthma besteht.
7. Aerosolzusammensetzung von Budesonid-Liposomen nach Anspruch 2, wobei das Phospholipid Dilauroylphosphatidylcholin ist.

roylphosphatidylcholin ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

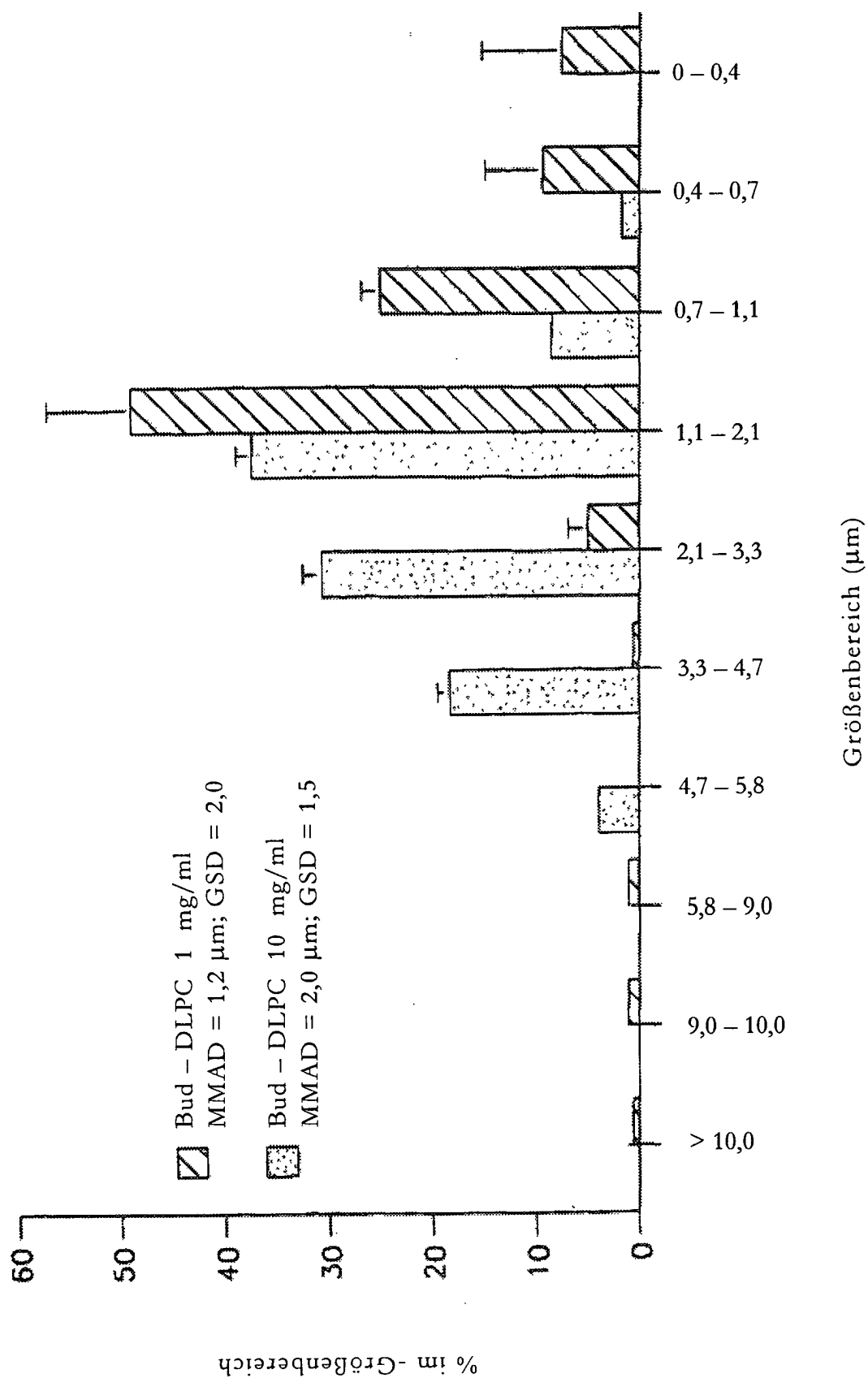


FIG. 1

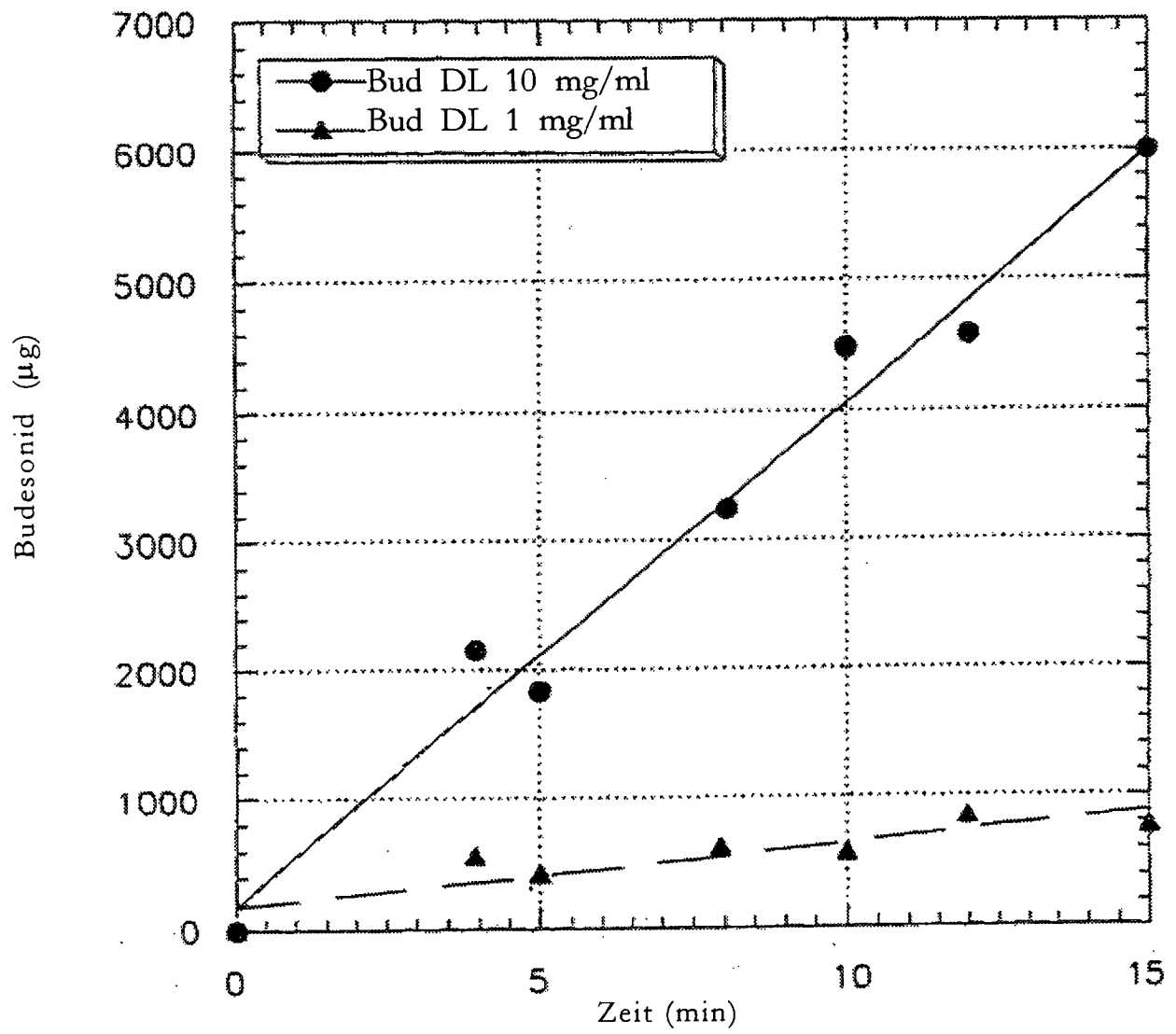


FIG. 2

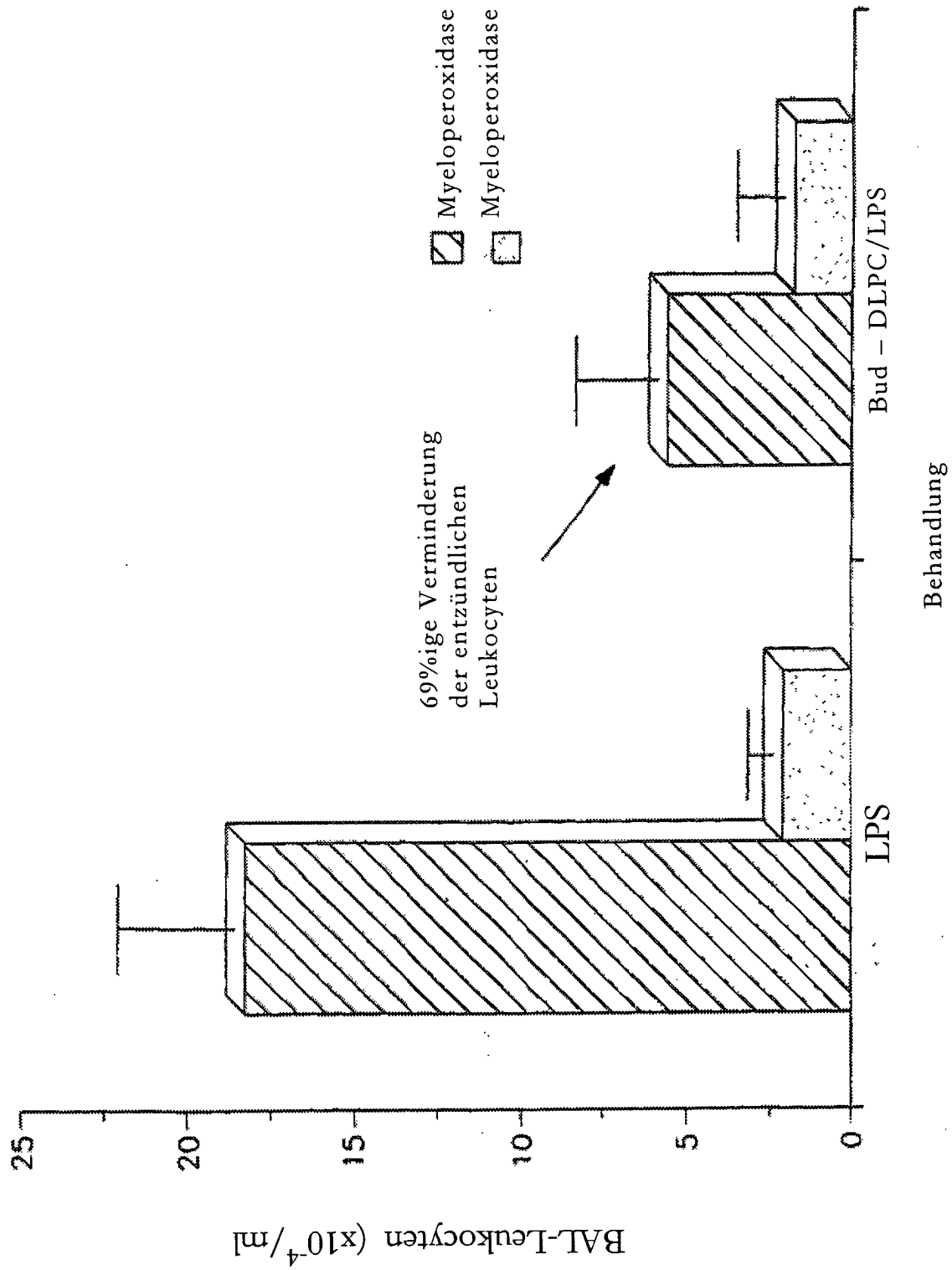


FIG. 3

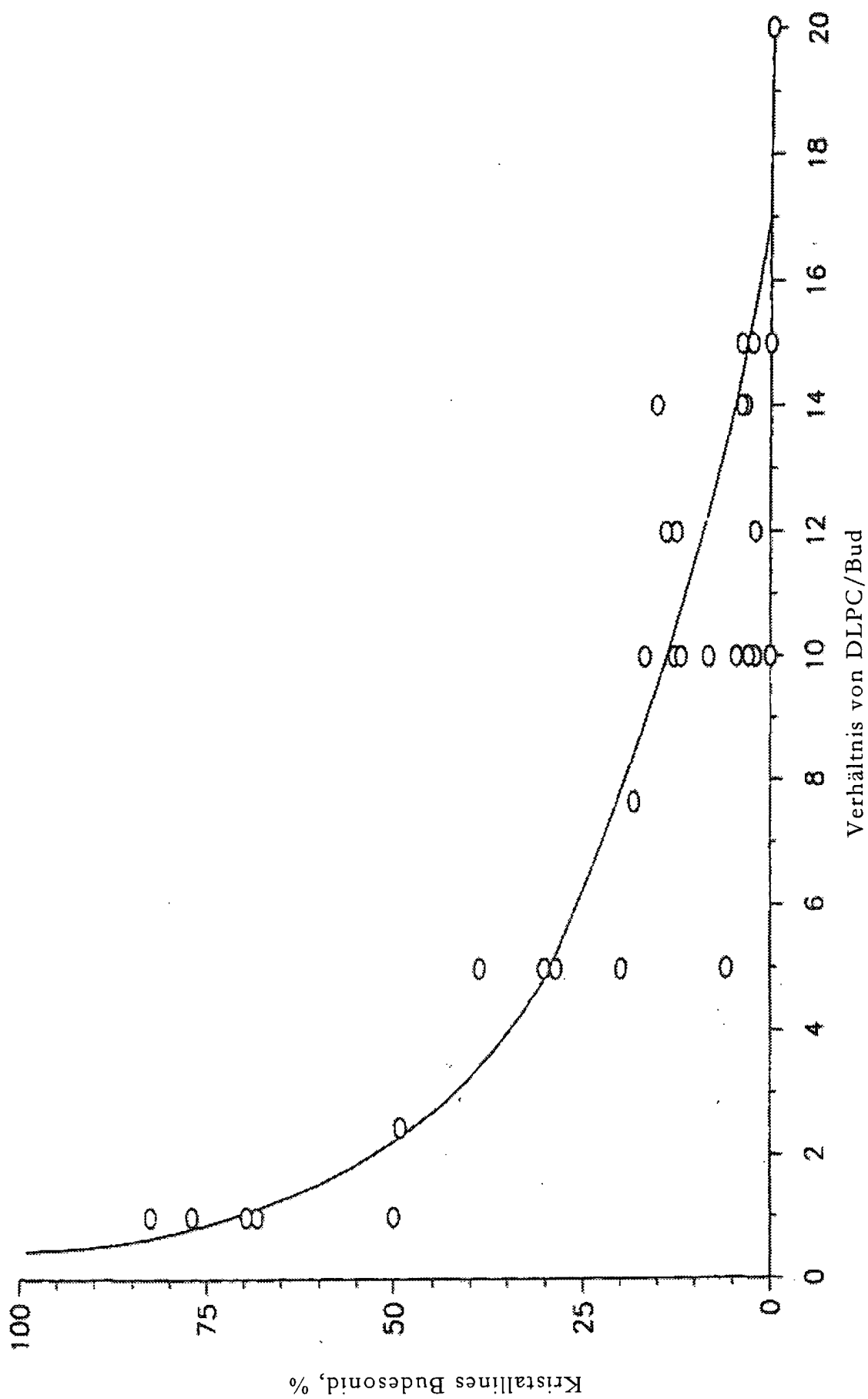


FIG. 4

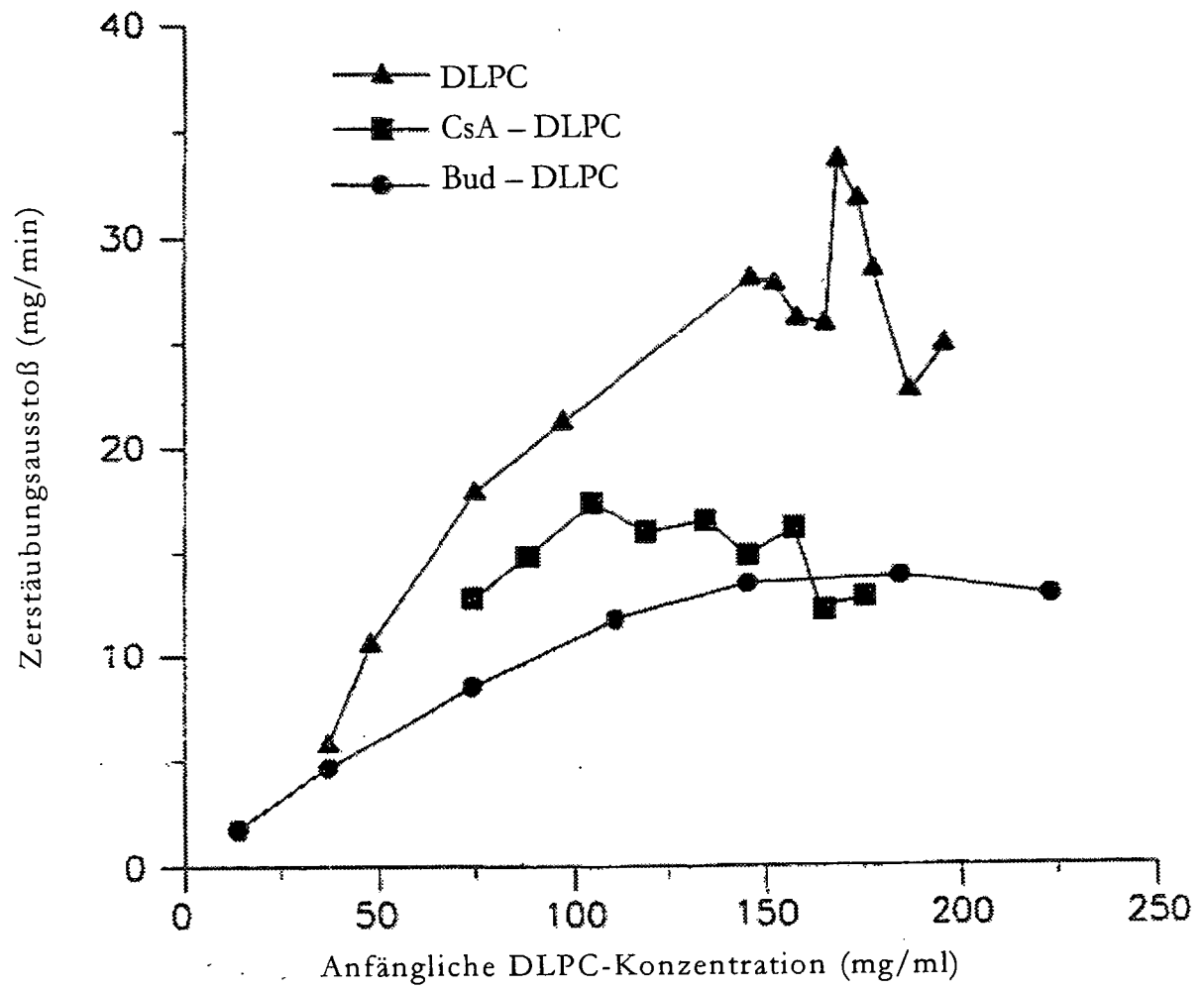


FIG. 5

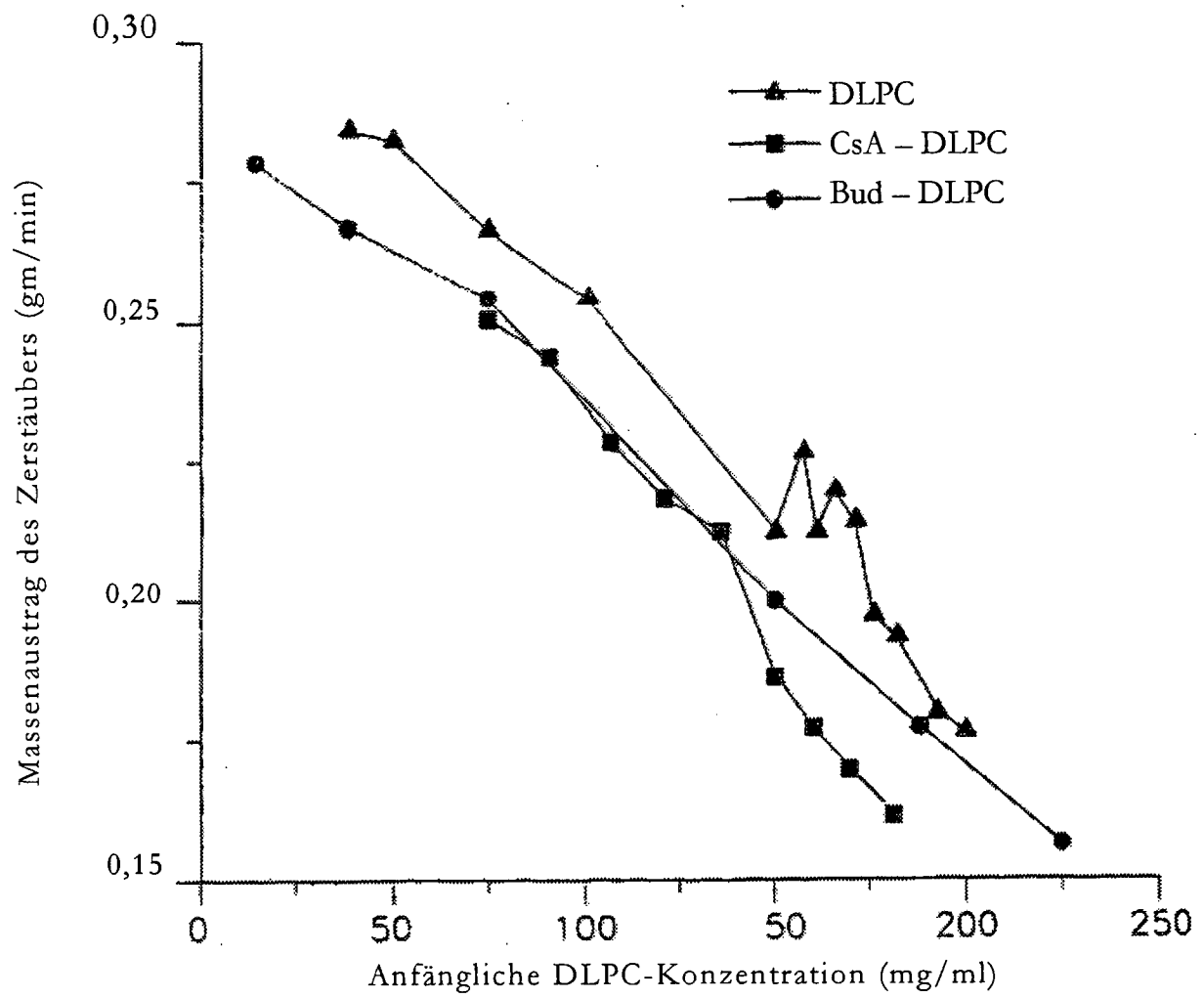


FIG. 6

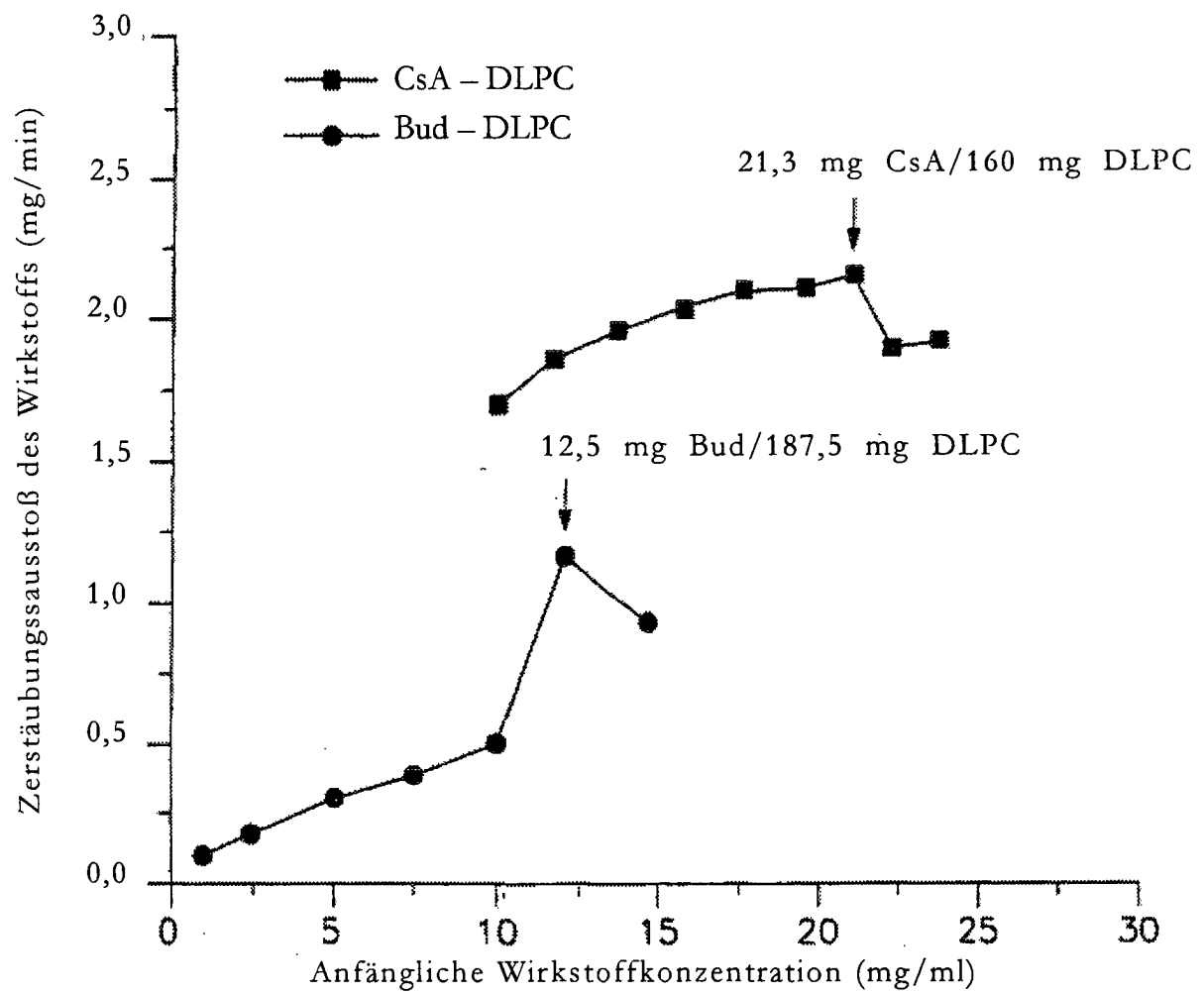


FIG. 7

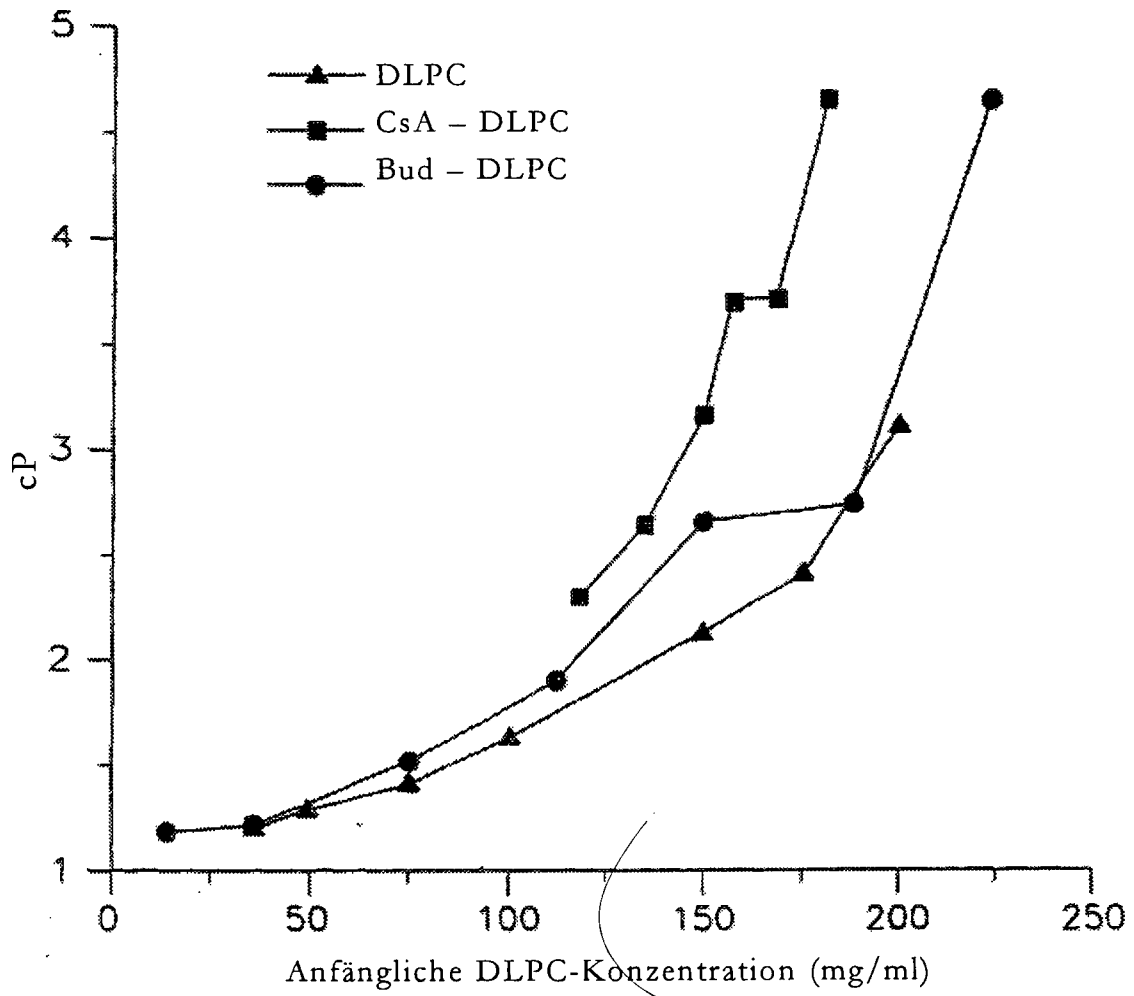


FIG. 8

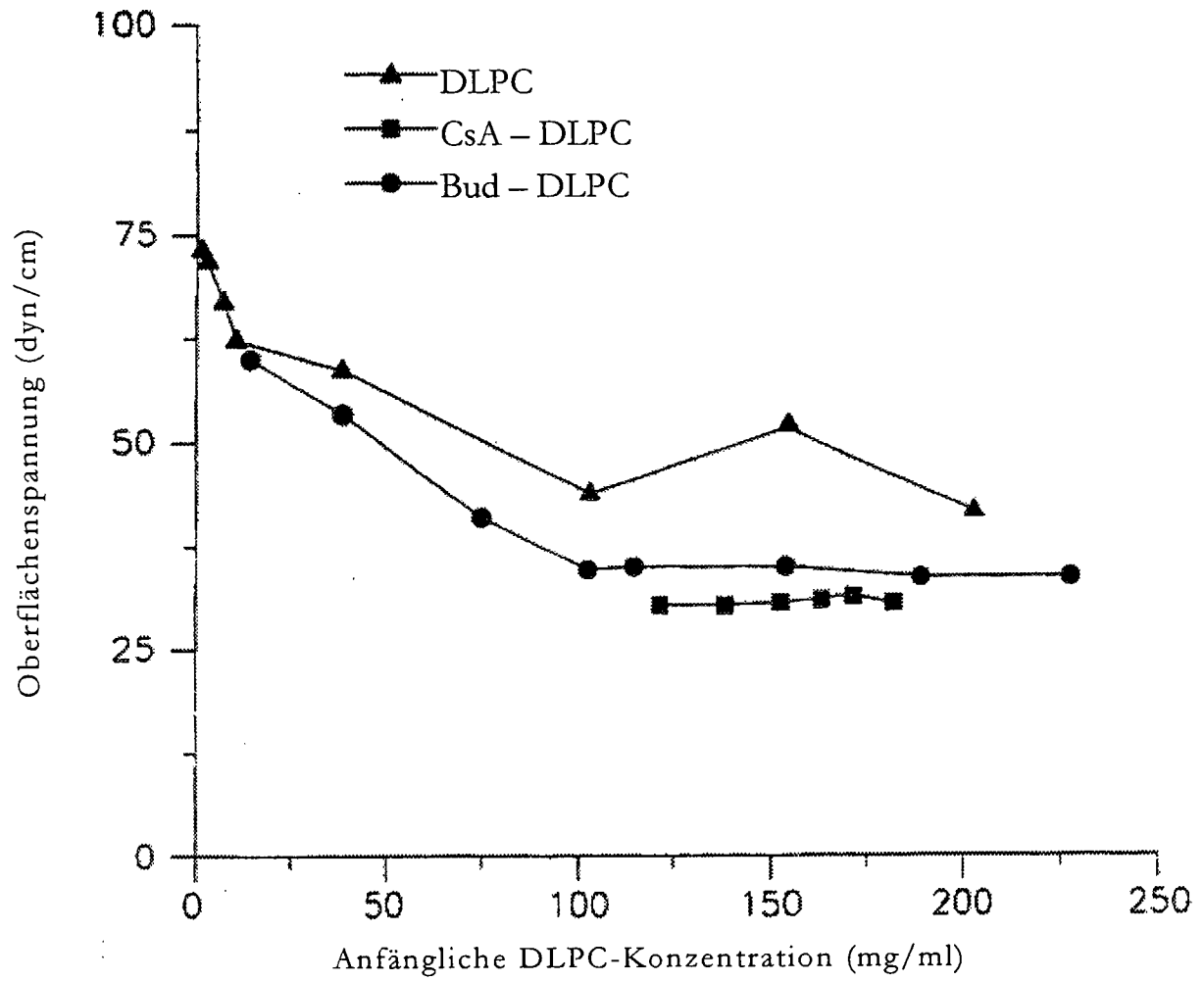


FIG. 9