



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 289 308**

(51) Int. Cl.:

**B01D 11/04** (2006.01)

**B01J 13/02** (2006.01)

**B01J 2/00** (2006.01)

**B01J 2/04** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03742125 .2**

(86) Fecha de presentación : **20.06.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1551523**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.07.2005**

(54) Título: **Partículas obtenidas por extracción con fluido supercrítico de emulsión.**

(30) Prioridad: **03.07.2002 US 393904**  
**07.02.2003 US 445944**  
**25.04.2003 US 423492 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2008**

(73) Titular/es: **Ferro Pfanstiehl Laboratories, Inc.**  
**1219 Glenn Rock Avenue**  
**Waukegan, Illinois 60085, US**

(72) Inventor/es: **Chattopadhyay, Pratibhash;**  
**Shekunov, Boris, Y.;**  
**Seitzinger, Jeffrey, S. y**  
**Huff, Robert, W.**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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**

Partículas obtenidas por extracción con fluido supercrítico de emulsión.

**5 Antecedentes****1. En referencia a solicitudes relacionadas**

Esta patente reivindica prioridad con respecto a la Solicitud de Patente Provisional con N° de serie 60/393.904, presentada el 3 de julio de 2002, y la Solicitud de Patente Provisional con N° de serie 60/445.944 presentada el 7 de febrero de 2003.

**2. Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a un método para producir partículas por extracción con disolvente usando un fluido supercrítico, en el que un soluto se disuelve en un disolvente para formar una solución, y la solución se dispersa en un líquido inmiscible o parcialmente miscible para formar una emulsión, y el disolvente se extrae de la emulsión.

**20 3. Descripción de la técnica relacionada**

Las partículas se producen convencionalmente formando una solución del material deseado en un disolvente orgánico, que después se emulsiona con grandes cantidades de agua. El material deseado se precipita después en la emulsión en forma de partículas finas por evaporación del disolvente o por extracción usando otro disolvente orgánico. La retirada del disolvente orgánico de las micelas de la emulsión conduce a supersaturación, que a su vez da como resultado la precipitación del material deseado en forma de partículas finas.

Este proceso tiene diversos inconvenientes. En primer lugar, el proceso transcurre a una velocidad extremadamente lenta, superando varias horas en la mayoría de los casos. Asegurar niveles de disolvente residual bajos requiere tiempos de evaporación indeseablemente largos. En segundo lugar, los procesos de extracción con disolvente orgánico son difíciles de aumentar de escala y requieren el uso de una gran cantidad de disolvente, que da como resultado una gran corriente residual. Adicionalmente han surgido preocupaciones en los últimos años sobre posibles efectos medioambientales y sobre la salud que surgen del uso de ciertos disolventes que son difíciles de retirar completamente y en ocasiones quedan retenidos como material residual en el producto final.

El documento US 6.183.783 se refiere al campo de la microencapsulación de sustancias activas. Se refiere a un proceso para preparar microcápsulas del tipo que comprende una sustancia activa recubierta con una capa de polímero por la técnica denominada de fluido supercrítico.

**40 Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un método de producción de partículas de soluto mediante extracción con fluido supercrítico del disolvente de gotas de emulsión de acuerdo con la reivindicación 1. El disolvente usado en un proceso de acuerdo con la invención para formar las gotas de emulsión puede recuperarse y reciclarse.

La anterior y otras características de la invención se describen más completamente en este documento en la siguiente descripción, que muestra también en detalle ciertas realizaciones ilustrativas de la invención siendo estas indicativas.

**50 Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama esquemático de un aparato usado en un método de acuerdo con la invención;

La Figura 2 es un gráfico de la distribución del tamaño volumétrico de partículas de poli estireno obtenido usando un método como se define en el Ejemplo 1(a);

La Figura 3 es una micrografía TEM de partículas EUDRAGIT RS (EU) producidas en el Ejemplo 2(a);

La Figura 4 es un gráfico de la distribución del tamaño volumétrico de partículas EU producidas en el Ejemplo 2(f);

La Figura 5 es un gráfico de la distribución del tamaño volumétrico de partículas EU producidas en el Ejemplo 2(h);

La Figura 6 es una micrografía SEM de partículas de ácido poli láctico/glicólico (PLGA) producidas en el Ejemplo 3(a);

La Figura 7 es un gráfico de distribución del tamaño volumétrico de partículas de PLGA producidas en el Ejemplo 3(e);

La Figura 8 es un gráfico de la distribución del tamaño volumétrico de partículas de PLGA producidas en el Ejemplo 3(f);

La Figura 9 es una micrografía SEM de partículas de PLGA producidas en el Ejemplo 3(h);

La Figura 10 es un gráfico de la distribución de tamaño volumétrico de partículas de PLGA producidas en el Ejemplo 3(i);

La Figura 11 es una micrografía de barrido electrónico de partículas de acetato de colesterol (CA) producidas en el Ejemplo 4(a);

La Figura 12 es un gráfico del tamaño de partícula frente a la concentración de CA;

La Figura 13 es un gráfico de distribución del tamaño volumétrico de partículas de CA producidas en el Ejemplo 4(a);

Las Figuras 14(a), 14(b) y 14(c) son gráficos multidimensionales del tamaño medio de partícula frente a la concentración de CA y de acetato de etilo;

La Figura 15 es una micrografía SEM de nanopartículas de CA producidas en el Ejemplo 4(j);

La Figura 16 es un gráfico de la distribución del tamaño medio en número de partículas de tripalmitina producidas en el Ejemplo 5(a), y

La Figura 17 es un gráfico de la distribución del tamaño medio en volumen de partículas de tripalmitina producidas en el Ejemplo 5(a).

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para producir partículas a partir de extracción con fluido supercrítico de emulsiones ("PSFEE"). Para formar las partículas, se disuelve un soluto en un disolvente orgánico adecuado para formar una solución. La solución se dispersa después en un líquido acuoso para formar una emulsión; el soluto no es soluble en el líquido acuoso. La emulsión incluye por lo tanto una fase discontinua que contiene el soluto (en solución) y una fase acuosa continua. El disolvente se extrae de la fase discontinua, y el soluto precipita en el fluido para formar una suspensión de partículas en la fase continua (es decir, el fluido inmiscible).

Con referencia a la Figura 1, se muestra un aparato 100 para usar con un método de acuerdo con la invención. El aparato 100 incluye un recipiente 110, una fuente de fluido supercrítico 112, una fuente de emulsión 114, y primera y segunda salidas 120, 122. El recipiente 110 es preferiblemente cilíndrico definiendo un eje 128, y tiene paredes laterales 130 y un primer y segundo extremo 132, 134. El eje 128 es preferiblemente vertical y los extremos 132, 134 están orientados de manera que el primer extremo 132 está hacia abajo y el segundo extremo 134 está hacia arriba, uno respecto al otro. Las paredes laterales 130 y los extremos 132, 134 tienen una superficie interna continua 136 que define una cámara de extracción 138.

Una frita 144, preferiblemente de acero inoxidable que tiene un tamaño de poro de menos de 0,5 micrómetros, se dispone dentro de la cámara 138 y recubre la superficie interna en el primer extremo 132. La fuente de fluido supercrítico 112 comunica con la cámara 138 a través de la frita 144, y suministra el fluido supercrítico a su través. La frita 144 permite que el fluido supercrítico se burbujee a través de la emulsión en forma de gotas finas maximizando de esta manera el contacto entre el fluido supercrítico y la emulsión.

La fuente de emulsión 114 comunica con la cámara 138 a través de una entrada 146. En realizaciones alternativas, una entrada que incluye una boquilla comunica a través de la pared lateral 130. La boquilla preferiblemente tiene una o una pluralidad de aberturas de pequeño diámetro. La boquilla pulveriza la emulsión hacia un espacio de cabeza 142 para formar gotas de emulsión relativamente pequeñas comparadas con el simple bombeo de una corriente de emulsión a través de la entrada 146. Como alternativa, puede disponerse un lecho de relleno dentro de la cámara de extracción 138, preferiblemente adyacente al primer extremo 132 para recubrirlo. Si está presente, el lecho de relleno potencia la mezcla entre la emulsión y el fluido supercrítico. La cámara 138 tiene un volumen libre o espacio de cabeza 142 que está sustancialmente no obstruido.

Un regulador de contrapresión 162 comunica con la primera salida 120, y una válvula de liberación 168 comunica con la segunda salida 122. El regulador de contrapresión 162 es preferiblemente un regulador de tipo 26-1700, que está disponible en el mercado en Tescom, EE.UU. (Elk River, MN). El regulador de contrapresión 162 controla la velocidad del flujo del disolvente cargado con fluido supercrítico que sale de la cámara de extracción 138, y mantiene de esta manera una presión P1 en la cámara de extracción 138 en un intervalo predeterminado de presiones. La válvula de liberación 168 se usa por seguridad, y es una válvula disponible en el mercado convencional y es intercambiable con otras válvulas disponibles en el mercado.

El soluto es preferiblemente una sustancia que es insoluble o ligeramente soluble en agua. Por lo tanto, el método es particularmente adecuado para producir muchas composiciones farmacéuticas, ya que muchas de las cuales son insolubles, o ligeramente solubles en agua y se suministran a pacientes en forma de suspensiones coloidales acuosas. Se estima que aproximadamente el 40% de todas las composiciones farmacéuticas disponibles en el mercado son insolubles o ligeramente solubles en agua, y por lo tanto son particularmente adecuadas para la producción por un método de acuerdo con la presente invención. Como alternativa, las partículas húmedas concentradas pueden obtenerse haciendo pasar las suspensiones coloidales a través de un filtro de alta presión que comunica con la cámara de extracción 138. Las partículas húmedas concentradas pueden secarse después mediante técnicas de secado por congelación o secado al vacío para obtener un polvo seco.

La invención, sin embargo, no se limita al uso con productos farmacéuticos y tiene una aplicación útil para otras industrias. Por consiguiente, los solutos alternativos adecuados incluyen, por ejemplo, materiales biológicamente activos, agentes medicinales, materiales nutricionales, proteínas, péptidos, alcaloides, alquiloides, extractos animales y/o vegetales, antígenos, ácidos nucleicos, antibióticos, vitaminas, lípidos, polímeros, precursores poliméricos, pigmentos, toxinas, insecticidas, materiales víricos, adyuvantes de diagnóstico, compuestos químicos agrícolas, colorantes, explosivos, pinturas, cosméticos, enzimas y catalizadores.

El líquido o disolvente soluble en fluido supercrítico que forma la fase discontinua es un disolvente orgánico, y por lo tanto es inmiscible o solo parcialmente miscible con agua. Los disolventes orgánicos adecuados preferidos que son inmiscibles en agua incluyen por ejemplo tolueno, ciclohexano y alcanos superiores. Los disolventes orgánicos que son parcialmente inmiscibles en agua incluyen, por ejemplo, acetato de etilo, acetato de propilo y 2-butanona.

El líquido insoluble en el fluido supercrítico que forma la fase continua es preferiblemente agua. Se entiende de forma natural que soluble en agua, agua y acuoso son términos ejemplares de fluidos disolventes polares, así como insoluble en agua, disolvente orgánico, aceite y similares son términos ejemplares de fluidos disolventes no polares. Por lo tanto, un fluido polar y un fluido no polar pueden sustituirse por agua o soluble en agua y aceite por insoluble en agua respectivamente, de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente y como se ha analizado anteriormente en este documento, se usa un tensioactivo para formar una emulsión estable. El tensioactivo usado en la invención no es crítico y puede usarse cualquiera de los tensioactivos convencionales usados para formar micro-emulsiones y macro-emulsiones de aceite en agua (o/w), de aceite en aceite (o/o), de agua en aceite (w/o) o de fase múltiple (w/o/w, etc.). Un tensioactivo particularmente adecuado es monooleato de polioxietilen sorbitano, tal como TWEEN-80, que está disponible en el mercado en ICI Americas, Inc. (Bridgewater, NJ). Preferiblemente, el tensioactivo usado en la invención tendrá un HLB adecuado para preparar una emulsión estable.

El tamaño de las micelas de la emulsión puede depender de la velocidad de agitación o del grado de homogeneización del emulsionante y la concentración del tensioactivo o disolvente o soluto. Generalmente, un mayor grado de homogeneización, mayores concentraciones de tensioactivos y menores concentraciones de soluto y disolvente tienden a producir micelas más pequeñas. El emulsionante es preferiblemente un dispersador, una bocina ultrasónica, microfluidizador, mezcladora estática, molino coloidal, molino de energía fluida, mezcladora de turbina o una técnica de emulsión espontánea.

Preferiblemente, se emplea un tensioactivo para formar un equilibrio termodinámico entre el disolvente en las gotas de emulsión y una fase acuosa en suspensión. El fluido supercrítico extrae el disolvente de las gotas de emulsión dando como resultado la precipitación del soluto en forma de partículas finas. Las partículas se forman debido a supersaturación según el fluido supercrítico extrae el disolvente de la emulsión. El tensioactivo presente en la emulsión estabiliza las partículas poco después de la formación evitando de esta manera el crecimiento de partículas debido a aglomeración.

En una realización preferida de la invención, la emulsión incluye un soluto insoluble en agua, por ejemplo un fármaco. El soluto se disuelve en un disolvente orgánico insoluble o parcialmente soluble en agua. La solución de disolvente orgánico que lleva el fármaco se emulsiona después en un medio acuoso junto con uno o más estabilizadores o tensioactivos. Los estabilizadores pueden añadirse a la fase de disolvente orgánico, o como alternativa a la fase acuosa o a ambas fases de manera que aumenta la estabilidad de la emulsión. Se prefiere que las emulsiones sean estables durante el procesado para aumentar la uniformidad de las partículas formadas por el proceso. Sin embargo, la precipitación de partículas puede conseguirse usando emulsiones estables o inestables. El uso de tensioactivos es, por lo tanto, opcional y sirve para proporcionar estabilidad y para aumentar la uniformidad de las partículas. El tensioactivo puede utilizarse también para inhibir la aglomeración entre partículas durante la formación de partículas, después de la formación de partículas o tanto durante como después.

El fluido supercrítico es preferiblemente dióxido de carbono supercrítico ("CO<sub>2</sub>"). Sin embargo, los fluidos supercríticos preferibles alternativos adecuados incluyen agua, trifluorometano, óxido nitroso, dimetil éter, alcanos C1-C6 de cadena lineal o ramificada, alquenos, alcoholes y combinaciones de los mismos. Los alcanos y alcoholes preferibles incluyen etano, etanol, propano, propanol, butano, butanol, isopropano, isopropanol y similares. En realizaciones alternativas de la presente invención, el fluido supercrítico incluye materiales en estado casi supercrítico, por ejemplo, gas comprimido o licuado.

Durante el funcionamiento, la emulsión se carga en la cámara de extracción 138. El fluido supercrítico se burbujea a la cámara de extracción para que entre en contacto con la emulsión. El fluido supercrítico extrae o disuelve el disolvente de las micelas/gotas de la emulsión. La retirada del disolvente de las micelas provoca supersaturación y hace precipitar el soluto en la fase continua, por ejemplo, agua. El disolvente y un fluido supercrítico se separan y recuperan del producto de cabeza, quedando el soluto atrapado o suspendido en la fase acuosa en forma de sólidos discretos. La suspensión acuosa de partículas de soluto en agua puede recogerse por despresurización de la cámara de extracción después de la retirada del disolvente de la emulsión.

En otra realización preferida, la emulsión se pulveriza en la cámara de extracción usando una boquilla capilar para formar gotas de emulsión en el espacio de cabeza. En realizaciones alternativas, la boquilla usada en el proceso de pulverización es una boquilla coaxial o una boquilla ultrasónica, o un equivalente comercial conocido de las mismas. El fluido supercrítico se introduce en la cámara de extracción para que entre en contacto con las gotas de emulsión. Una superficie vibratoria o mezcladora (por ejemplo, una mezcladora de tipo propulsor) puede situarse en la cámara de extracción, y hacerse funcionar para potenciar o aumentar el área de contacto entre la emulsión y el fluido supercrítico.

Durante el funcionamiento, el fluido supercrítico extrae o disuelve el disolvente de las gotas. La retirada del disolvente de las gotas provoca la supersaturación del soluto en el disolvente, y como resultado, el soluto precipita en la fase continua. Cada gota de emulsión puede producir una o más partículas. El número de partículas por gota de emulsión puede controlarse controlando parámetros tales como el tamaño de gota, concentración de la emulsión y concentración de soluto, así como la selección de condiciones de operación y tipo de disolvente, soluto y fluido supercrítico.

Preferiblemente, el disolvente y el fluido supercrítico se separan y recuperan del producto de cabeza, mientras que el soluto queda atrapado o suspendido en la fase continua o acuosa en forma de partículas sólidas discretas. El disolvente residual que se disuelve en el fluido supercrítico puede retirarse de la cámara purgando con CO<sub>2</sub> limpio. Una vez que el disolvente residual se ha retirado, la cámara se despresuriza de manera que puede recogerse la suspensión acuosa de partículas.

Se cree que la transferencia de masa entre la fase disolvente en las gotas y la fase supercrítica provoca la supersaturación del soluto en el disolvente. La supersaturación conduce a la precipitación del soluto en forma de partículas finas en la fase continua. La velocidad de transferencia entre la fase orgánica y la fase supercrítica puede seleccionarse de manera que la transferencia sea extremadamente rápida. En los casos en los que la emulsión se inyecta al fluido supercrítico, la velocidad de transferencia de masa se potencia debido al movimiento de pequeñas gotas dentro del medio del fluido supercrítico. Además, pueden añadirse moléculas de tensioactivo para evitar el crecimiento de partículas después de la precipitación estabilizando los pequeños núcleos formados. Las partículas obtenidas usando dicho proceso típicamente están en un intervalo de diámetro medio de nanómetros a unos pocos micrómetros.

Las partículas que tienen una alta pureza se obtienen filtrando las suspensiones acuosas usando ultrafiltración o centrifugación a alta velocidad. Esta realización alternativa de la invención puede usarse para la precipitación de una amplia variedad de materiales que son sustancialmente insolubles en la fase continua, por ejemplo agua.

En una realización alternativa preferida, la emulsión se prepara usando una solución que contiene un disolvente parcialmente soluble en agua y agua. El disolvente se satura con agua y el agua se satura con el disolvente. Se forma un equilibrio termodinámico entre el disolvente en las gotas de emulsión y una fase acuosa de suspensión. Aparte de actuar como antidisolvente, el fluido supercrítico extrae el disolvente disuelto en la fase acuosa. La extracción altera el equilibrio termodinámico entre el disolvente orgánico en las gotas y la fase acuosa, dando como resultado una rápida transferencia de masa del disolvente orgánico desde las gotas y hacia la fase acuosa. Las partículas se forman debido a supersaturación según el fluido supercrítico extrae el disolvente de la emulsión.

La velocidad de extracción con disolvente puede afectar al tamaño de la partícula formada. Generalmente, cuanto más rápida es la velocidad de extracción, menores son las partículas que se forman. La extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico tiene una velocidad de extracción relativamente rápida comparado con las velocidades de extracción de otras técnicas convencionales y, de esta manera, ayuda a la formación de partículas relativamente pequeñas. Los diámetros de partículas obtenidos por un método de acuerdo con la invención están típicamente en el intervalo de nanómetros, o en el intervalo de micrómetros de un solo dígito, con una distribución de tamaño de partícula estrecha. En particular, las partículas se producen teniendo un tamaño en un intervalo de 0,1 nanómetros a 1,0 milímetros. Más particularmente, las partículas se producen teniendo un tamaño en un intervalo de 0,1 micrómetros a 400 micrómetros y más preferiblemente en un intervalo de 1 nanómetro a 500 nanómetros. Por consiguiente, seleccionando parámetros tales como disolvente, soluto y tipo de fluido supercrítico así como otros parámetros de proceso puede determinarse el tamaño de las partículas.

La presente invención es particularmente adecuada para producir nano o micro partículas de un soluto que es sustancialmente insoluble en agua y que es capaz de disolverse en un disolvente orgánico adecuado que es generalmente inmiscible con agua. Dichas partículas son útiles en diferentes industrias, por ejemplo en la industria farmacéutica para el procesado y trituración de partículas de fármaco, encapsulación de fármacos y preparación de formulaciones, en la industria de pinturas para preparar nanopartículas de pigmentos y también para recubrimiento de pigmentos; y en la industria electrónica para preparar nanopartículas de materiales inorgánicos u orgánicos.

## ES 2 289 308 T3

Los métodos de acuerdo con la invención pueden realizarse como un proceso discontinuo o como un proceso continuo. En el proceso continuo, la suspensión líquida resultante de partículas sólidas se retira de la cámara de extracción a aproximadamente la misma velocidad que la emulsión se suministra a la cámara de extracción. El fluido supercrítico que lleva el disolvente se retira de la cámara de extracción a aproximadamente la misma velocidad que el fluido supercrítico se suministra a la cámara de extracción. La presión en la cámara de extracción se mantiene preferiblemente a aproximadamente un valor de presión constante o en un intervalo estrecho de valores de presión.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar métodos y realizaciones de acuerdo con la invención y, como tales, no deben considerarse como imposiciones limitantes sobre las reivindicaciones. A menos que se especifique otra cosa, todos los ingredientes están disponibles en el mercado a partir de suministradores químicos habituales tales como Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO) y/o Fisher Scientific International, Inc. (Hanover Park, IL).

#### Ejemplo 1

##### Ejemplo 1(a)

*Producción de partículas de poliestireno mediante un método de acuerdo con la invención usando un disolvente orgánico insoluble en agua*

##### *Preparación de emulsión de poliestireno (PS)*

Inicialmente, 0,25 gramos de poliestireno (PS) y 0,2 gramos de SPAN-80 (tensioactivo) se disolvieron en 20 gramos de tolueno para formar una solución. Esta solución se añadió después a 200 gramos de agua que contenía 0,3 gramos de TWEEN-80 (tensioactivo) para formar una mezcla. La mezcla se emulsionó usando un dispersador durante 10 minutos a 6.000 rpm para formar la Emulsión 1(a).

##### *Producción de partículas de PS*

En el Ejemplo 1(a), una alícuota de 4,0 ml de Emulsión 1(a) se cargó en una cámara de extracción que tenía un volumen de 10 ml. Se introdujeron lana de vidrio y perlas en el volumen muerto de la cámara de extracción para evitar que el líquido sea arrastrado durante la extracción, y para minimizar la re-precipitación de tolueno residual durante la despresurización. Después se burbujeó CO<sub>2</sub> supercrítico en la cámara de extracción a través de una frita de acero inoxidable de 0,5  $\mu$ m en el fondo de la cámara de extracción. La cámara de extracción se mantuvo a una presión de 80 bar y a una temperatura de 45 grados centígrados (°C) y a un caudal de 0,7 mililitros por minuto (ml/min) de CO<sub>2</sub>. La cantidad de tolueno extraído de la cámara se midió usando un detector de UV/VIS con matriz de fotodiodos. Casi todo el tolueno se extrajo de la Emulsión 1(a) en 90 minutos (se determinó que el tolueno residual era de 20 partes por millón (ppm)). La cámara de extracción se despresurizó y se obtuvo una suspensión de partículas coloidales acuosas.

##### *Análisis de partículas de PS*

El análisis de la morfología de las partículas de PS en la suspensión coloidal acuosa obtenida se realizó usando Microscopía Electrónica de Transmisión. El análisis de la distribución de tamaño se realizó usando Dispersión de Luz Dinámica (DLS). A partir de la Micrografía Electrónica de Transmisión (TEM), se determinó que en todos los casos las partículas de poliestireno estaban en forma de partículas esféricas aisladas que tenían un tamaño casi uniforme en el intervalo de nanómetros. A partir de los resultados de DLS, el tamaño medio de las partículas producidas en el Ejemplo 1(a) tenía una media volumétrica de 276 nanómetros (nm) y una media en número de 145 nm con una polidispersidad de 0,26. El gráfico en la Figura 2 ilustra la distribución del tamaño volumétrico, en nanómetros, de las partículas de poliestireno producidas en el Ejemplo 1(a).

##### Ejemplos 1(b) - 1(f)

*Efecto de la presión y la temperatura sobre el tamaño de partícula de PS*

Los Ejemplos 1(b) - 1(f) se realizaron para determinar el efecto de la presión y temperatura sobre el tamaño de las partículas de poliestireno producidas por un método de acuerdo con la invención. Específicamente, los Ejemplos 1(b) - 1(f) se produjeron a diferentes valores de presión y temperatura usando la Emulsión 1(b) como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

##### *Preparación de la emulsión de PS*

La Emulsión 1(b) se preparó de la misma manera que la Emulsión 1(a), excepto como se detalla a continuación. Inicialmente, 0,21 gramos de poliestireno y 0,2 gramos de SPAN-80 (tensioactivo) se disolvieron en 20 gramos de tolueno para formar una solución. Esta solución se añadió después a 200 gramos de agua que contenía 0,3 gramos de TWEEN-80 (tensioactivo) para formar una mezcla. Esta mezcla se emulsionó usando un homogeneizador disponible en el mercado (modelo MY110) a 82,7 MPa (12.000 psi) de presión (3 pasos) para formar la Emulsión 1(b). La

distribución de tamaño de los tamaños de gota se obtuvo usando DLS. El tamaño medio de gota de la emulsión era de 184 nm, con una desviación típica de 34 nm.

#### *Producción de partículas de PS*

Las partículas de PS para los Ejemplos 1(b) - 1(f) se produjeron de la misma manera que las partículas del Ejemplo 1(a), excepto como se muestra en la Tabla 1.

La presión y temperatura se varió para determinar el efecto de la presión y temperatura sobre el tamaño de las partículas de PS (véase Tabla 1).

#### *Análisis de partículas de PS*

El análisis de la distribución de tamaño de las partículas obtenidas a partir de estos experimentos se realizó usando DLS. Los resultados del análisis de DLS se presentan en la Tabla 1. La Tabla 1 muestra que los tamaños de partícula para los Ejemplos 1(b) - 1(f) se reducen respecto al Ejemplo 1(a). Aumentando el grado de homogeneización en el Ejemplo 1(b) da como resultado gotas de emulsión más pequeñas, que a su vez conducen a tamaños de partícula más pequeños después de la precipitación.

TABLA 1

*Tamaño medio de partículas de PS obtenidas a diferentes valores de presión y temperatura para los Ejemplos 1(b) - 1(f) usando la Emulsión 1(b)*

| Ej. N° | Presión<br>(bar) | Temperatura<br>(°C) | Tamaño medio de partícula (nm) |                              |
|--------|------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|
|        |                  |                     | Media en Número<br>(% Desv)    | Media en Volumen<br>(% Desv) |
| 1(b)   | 80               | 45                  | 33,3 (59,5%)                   | 95,5 (59,5%)                 |
| 1(c)   | 80               | 55                  | 53,7 (44,6%)                   | 111,1 (44,6%)                |
| 1(d)   | 90               | 45                  | 39,6 (52,3%)                   | 102,9 (52,3%)                |
| 1(e)   | 100              | 45                  | 36,8 (55,9%)                   | 104,4 (55,9%)                |
| 1(f)   | 80               | 35                  | 49,4 (44,8%)                   | 100,2 (44,8%)                |

#### *Ejemplo 2*

Generalmente, los Ejemplos 2(a)-2(m) ilustran la producción de partículas de EUDRAGIT RS (EU) por un método de acuerdo con la invención usando un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua. Específicamente, los Ejemplos 2(a)-2(d) ilustran el efecto de la concentración de tensioactivo sobre el tamaño de partícula de EU, los Ejemplos 2(e)-2(h) ilustran el efecto de la concentración de disolvente sobre el tamaño de partícula de EU, los Ejemplos 2(i)-2(m) ilustran el efecto de la concentración del soluto en la solución sobre el tamaño de partícula de EU.

#### *Ejemplos 2(a)-2(e)*

#### *Efecto de la concentración de tensioactivo sobre el tamaño de partícula de EU*

#### *Preparación de emulsión de EUDRAGIT (EU)*

Inicialmente, se preparó una solución de EU disolviendo EUDRAGIT RS (EU) al 5% (p/p<sub>EA</sub>) en una primera parte (20 gramos) de solución de acetato de etilo saturada con agua (EA) para formar una solución EU. Esta solución EU se añade después a una segunda parte (180 gramos) de solución de EA saturada con agua que contenía tensioactivo de alcohol polivinil (PVA) para formar una mezcla. Por consiguiente, las concentraciones resultantes fueron EA al 10% p/p del total, agua al 90% p/p del total, EU al 5% p/p del total y PVA al 1% p/p de agua. La mezcla se emulsionó usando un dispersador durante 2 minutos a 3.000 rpm para formar la Emulsión 2.

Aunque la Emulsión 2 la emulsión convencional usada en el Ejemplo 2, la concentración de PVA se varió en los Ejemplos 2(a)-2(d), véase la Tabla 2. La concentración de disolvente se varió en los Ejemplos 2(e)-2(h), véase la

Tabla 3. La concentración de EU en solución se varió en los Ejemplos 2(i)-2(m), véase la Tabla 4. Todos los demás parámetros se mantuvieron constantes.

#### *Producción de partículas de EUDRAGIT*

Para los Ejemplos 2(a)-2(d), se cargaron alícuotas de 4,0 ml de Emulsión 2, que tenían concentraciones de tensioactivo diferentes, en una cámara de extracción que tenía un volumen de 10 ml. Se introdujeron lana de vidrio y perlas dentro del volumen muerto de la cámara de extracción para evitar el arrastre de líquido durante la extracción, y para minimizar la re-precipitación del tolueno residual durante la despresurización.

Se burbujeó CO<sub>2</sub> supercrítico a través de una frita de acero inoxidable de 0,5  $\mu$ m en el fondo de la cámara de extracción y hacia la cámara de extracción preparada. Se usó un caudal de 1 ml/min de dióxido de carbono. La temperatura y presión se mantuvieron constantes a 80 bares y 35°C respectivamente.

La cantidad de EA extraído de la cámara se midió usando un detector UV/VIS con matriz de fotodiodos. Casi todo el EA se extrajo de la emulsión en 30-40 minutos. La cámara de extracción se despresurizó y se obtuvo una suspensión coloidal acuosa de partículas poliméricas de EU.

#### *Análisis de partículas de EUDRAGIT*

El análisis de la morfología de las partículas en la suspensión coloidal acuosa obtenida a partir de los Ejemplos 2(a)-2(d) se realizó usando un microscopio electrónico de transmisión (TEM). Cuando sea aplicable, el radio hidrodinámico de las partículas se midió usando un instrumento de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). La Figura 3 es una micrografía TEM de las partículas de EUDRAGIT RS producidas en el Ejemplo 2(a). El aumento de la TEM en la Figura 3 es de aproximadamente 200.000 y las partículas de EU tienen diámetros en el intervalo de nanómetros.

Inesperadamente, aumentar la concentración de tensioactivo dio como resultado un aumento en la media en número de partículas de EU. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

*El efecto de la concentración de tensioactivo sobre el tamaño de partículas de EU*

| Ej. N° | Tensioactivo<br>% (p/p<br>aceite) | Media en<br>Número<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) | Media en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) |
|--------|-----------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 2(a)   | 0,5                               | 72                         | 52                        | 633                         | 451                       |
| 2(b)   | 1                                 | 40                         | 25                        | 247                         | 151                       |
| 2(c)   | 2                                 | 66                         | 40                        | 400                         | 242                       |
| 2(d)   | 5                                 | 151                        | 58                        | 309                         | 118                       |

#### *Ejemplos 2(e)-2(h)*

#### *Efecto de la concentración de disolvente sobre el tamaño de partícula*

#### *Preparación de emulsión de EU y producción de partículas*

Los Ejemplos 2(e)-2(h) se prepararon de la misma manera que los Ejemplos 2(a)-2(d) excepto como se indica en la Tabla 3. La proporción de solución de EU a agua, o concentración de la emulsión, se varió para determinar el efecto de la concentración de la solución en agua sobre el tamaño de partícula. La producción de partículas de EU se realizó de la misma manera que en los Ejemplos 2(a)-2(d).

#### *Análisis de las partículas de EU*

El análisis del tamaño y la morfología de las partículas de EU producidas en los Ejemplos 2(e)-2(h) se realizó de la misma manera descrita en los Ejemplos 2(a)-2(d), es decir, usando TEM y DLS, respectivamente. Según aumenta la concentración de aceite (solución de EU) en la emulsión, aumenta el tamaño de partícula de EU. Esto se indica

## ES 2 289 308 T3

mediante los resultados mostrados en la Tabla 3. Las Figuras 4-5 son gráficos de distribución del tamaño volumétrico de partículas de EU producidas en los Ejemplos 2(f) y 2(h), respectivamente.

TABLA 3

*El efecto de la concentración de aceite en la emulsión sobre el tamaño de partícula de EU*

| Ej. 2 | Aceite<br>%(p/p) | Agua<br>%(p/p) | Media en<br>Número<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) | Media en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) |
|-------|------------------|----------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 2(e)  | 10               | 90             | 40                         | 25                           | 147                         | 90                           |
| 2(f)  | 20               | 80             | 99                         | 52                           | 456                         | 240                          |
| 2(g)  | 30               | 70             | 74                         | 43                           | 436                         | 254                          |
| 2(h)  | 40               | 60             | 70                         | 42                           | 416                         | 244                          |

Ejemplos 2(i)-2(m)

*Efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño de partícula*

*Preparación de emulsión de EU y producción de partículas*

Los Ejemplos 2(i)-2(m) se prepararon de la misma manera que los Ejemplos 2(e)-2(h), excepto como se indica en la Tabla 4. La proporción de EU en solución se varió para determinar el efecto de la concentración de EU en la solución sobre el tamaño de partícula. La producción de partículas de EU se realizó de la misma manera que los Ejemplos 2(a)-2(e).

*Análisis de partículas de EU*

El análisis del tamaño y la morfología de las partículas de EU se realizaron de la misma manera descrita en los Ejemplos 2(a)-2(d) usando DLS y TEM, respectivamente. Los resultados de los experimentos de precipitación usando emulsiones que tenían diferentes concentraciones de EUDRAGIT RS se muestran en la Tabla 4. Inesperadamente, un aumento en el contenido de polímero en la solución hace disminuir el tamaño de partícula de EUDRAGIT RS.

TABLA 4

*El efecto de la concertación de EU en solución sobre el tamaño de partícula de EU*

| Ej. 2 | % de<br>polímero<br>(p/p aceite) | Media en<br>número<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) | Media en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) |
|-------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 2(i)  | 1,25                             | 48                         | 29                        | 205                         | 121                       |
| 2(j)  | 5                                | 40                         | 25                        | 147                         | 90                        |
| 2(k)  | 10                               | 35                         | 20                        | 101                         | 57                        |
| 2(l)  | 20                               | 53                         | 34                        | 294                         | 187                       |
| 2(m)  | 30                               | 36                         | 21                        | 115                         | 65                        |

## Ejemplo 3

El Ejemplo 3 determina las características de la precipitación de micro y nanopartículas de ácido poli láctico/glicólico (PLGA) usando disolventes orgánicos parcialmente solubles en agua de acuerdo con la presente invención. PLGA se acepta generalmente como que es un polímero biodegradable. En particular, los Ejemplos 3(a)-3(d) ilustran el efecto de la variación de la concentración del disolvente en una emulsión sobre el tamaño de partícula. Los Ejemplos 3(e)-3(g) ilustran el efecto de la concentración de polímero en emulsión sobre el tamaño de partícula. El Ejemplo 3 (h) ilustra la precipitación de nano partículas de polímero, y el Ejemplo 3(i) ilustra el efecto de la precipitación de partículas de PLGA sin burbujear CO<sub>2</sub> a través de la emulsión.

## Ejemplos 3(a)-3(d)

*Efecto de la variación de la concentración de disolvente**Preparación de emulsión de PLGA*

Las Emulsiones 3(a)-3(d) se prepararon teniendo diferentes concentraciones de EA y concentraciones de PVA y PLGA constantes como se muestra en la Tabla 5. El ácido poli láctico/glicólico (PLGA) se disolvió en agua saturada con acetato de etilo (EA) para formar una solución en las proporciones mostradas en la Tabla 5. La solución se añadió a una cantidad medida de alcohol polivinílico (PVA) en solución acuosa al 0,5% (p/p) para formar una mezcla. La mezcla se emulsionó usando un dispersador durante 3 minutos a 5.000 rpm para formar las emulsiones 3(a)-3(d), respectivamente.

*Producción de partículas de PLGA*

Las partículas en los Ejemplos 3(a)-3(d) se prepararon de la siguiente manera. Alícuotas de 4,5 ml de las Emulsiones 3(a)-3(d) se cargaron individualmente en una cámara de extracción. Las partículas de PLGA se produjeron de una manera similar respecto a las partículas producidas en el Ejemplo 2, excepto lo siguiente: la cámara de extracción se mantuvo a una presión y temperatura de operación constantes. El caudal de CO<sub>2</sub> a través de la cámara de extracción se mantuvo a una velocidad constante. Específicamente, se empleó una presión de 80 bar, una temperatura de 45°C y un caudal de 1 ml/min de CO<sub>2</sub>. La cantidad de disolvente extraído de la cámara se midió usando un detector de UV/VIS con matriz de fotodiodos. Una vez completada la extracción de EA la cámara de extracción se despresurizó y se obtuvo una suspensión coloidal acuosa de partículas.

*Análisis de partículas de PLGA*

En todos los Ejemplos 3(a)-3(d), casi todo el EA se extrajo de las emulsiones después de 60 minutos, y el EA residual se determinó que tenía menos de 100 ppm en todos los casos. Las partículas se lavaron y filtraron para retirar el PVA de las suspensiones acuosas antes del análisis.

El análisis de la morfología de las partículas de PLGA en la suspensión coloidal acuosa obtenida se realizó usando Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La Figura 6 es una micrografía SEM de partículas de PLGA obtenidas del Ejemplo 3(a). La escala es 1 micrómetro, por lo que las partículas de PLGA son micrométricas, no aglomeradas, de forma esférica y tienen una distribución de tamaño estrecha. El análisis de distribución de tamaño se realizó usando Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Los resultados de los experimentos de precipitación usando emulsiones que tenían diferentes concentraciones de disolvente o de EA se muestran en la Tabla 5. Aumentar el porcentaje relativo de EA en la emulsión dio como resultado inesperadamente una disminución de la media en número y la media en volumen de las partículas de PLGA.

TABLA 5

*Tamaños de partículas de PLGA obtenidas a partir de emulsiones que tienen diferentes concentraciones de EA*

| Ej. N° | EA (% p/p total) | Media en número (nm) | Desviación Típica (nm) | Media en Volumen (nm) | Desviación Típica (nm) |
|--------|------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 3(a)   | 10               | 408                  | 222                    | 1.178                 | 642                    |
| 3(b)   | 20               | 234                  | 141                    | 1.088                 | 653                    |
| 3(c)   | 30               | 263                  | 138                    | 857                   | 451                    |
| 3(d)   | 40               | 303                  | 142                    | 725                   | 339                    |

## Ejemplos 3(e)-3(g)

*Efecto de las variaciones en PLGA de la concentración de polímero**Preparación de emulsión de PLGA*

Las Emulsiones 3(e)-3(g) se prepararon de la misma manera que las Emulsiones 3(a)-3(d) excepto que las siguientes emulsiones se prepararon de manera que tenían diferentes concentraciones de PLGA y concentraciones constantes de PVA y EA como se muestra en la Tabla 6.

*Producción de partículas de PLGA*

La producción de partículas en los Ejemplos 3(e)-3(g) se realizó de una manera similar a la manera usada en los Ejemplos 3(a)-3(d).

*Análisis de las partículas de PLGA*

El análisis de tamaño y morfología de partículas de PLGA producidas en los Ejemplos 3(e)-3(g) se realizó de la misma manera descrita en los Ejemplos 3(a)-3(d) usando DLS y SEM, respectivamente. Los resultados de los experimentos de precipitación usando emulsiones que tenían diferentes concentraciones de PLGA se muestran en la Tabla 6. Las Figuras 7-8 son gráficos de distribución de tamaño volumétrico de partículas de PLGA producidas en los Ejemplos 3(e) y 3(f), respectivamente. Los diámetros están en el intervalo de nanómetros.

TABLA 6

*Efecto de diferentes concentraciones de PLGA sobre el tamaño de partícula*

| Ej. N° | PLGA<br>% p EA | Media en<br>número<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) | Media en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) |
|--------|----------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 3(e)   | 5              | 408                        | 222                       | 1.178                       | 642                       |
| 3(f)   | 10             | 723                        | 444                       | 2.279                       | 1.399                     |
| 3(g)   | 20             | 467                        | 207                       | 1.848                       | 1.324                     |

## Ejemplo 3(h)

*Efecto de la homogeneización de la emulsión sobre el tamaño de partícula**Preparación de emulsión de ácido poli láctico/glicólico (PLGA)*

4,01 gramos de ácido poli láctico/glicólico (PLGA) se disolvieron en 40,1 gramos de agua saturada con acetato de etilo (EA). La solución se añadió a 160 gramos de alcohol polivinílico (PVA) al 0,5% (p/p) en solución acuosa para formar una mezcla. La mezcla se emulsionó usando un dispersador durante 3 minutos a 5.000 rpm y después se homogeneizó a 96,5 MPa (14.000 psi) (3 pasos) usando un Microfluidizador disponible en el mercado (modelo M110-L) para formar la Emulsión 3(h).

*Producción de partículas de PLGA*

Una alícuota de 4,0 ml de la Emulsión 3(h) se cargó en una cámara de extracción. Las partículas de PLGA se produjeron de una manera similar respecto a las partículas producidas en el Ejemplo 3(a). La cámara de extracción se mantuvo a una presión y temperatura de operación constantes. El caudal del CO<sub>2</sub> a través de la cámara de extracción se mantuvo a una velocidad constante. Específicamente, se emplearon una presión de 80 bar, una temperatura de 45°C y un caudal de 1 ml/min de CO<sub>2</sub>. La cantidad de disolvente extraído de la cámara se midió usando un detector UV/VIS con matriz de fotodiodos. Una vez completada la extracción de EA la cámara de extracción se despresurizó y se obtuvo una suspensión coloidal acuosa de partículas.

*Análisis de partículas de PLGA*

El análisis de tamaño y morfología de la suspensión coloidal acuosa de partículas obtenidas del Ejemplo 3(h) se realizó usando un microscopio electrónico de barrido (SEM). El diámetro hidrodinámico de las partículas de PLGA

se midió usando un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS). El análisis por DLS de las partículas obtenidas del Ejemplo 3(h) mostró que el volumen medio y el diámetro medio en número de las partículas obtenidas era 217 nm y 117 nm, respectivamente. La Figura 9 es una micrografía de las nanopartículas producidas en el Ejemplo 3(h).

5 Los resultados ilustran que la homogeneización y el tamaño de gota afectan al tamaño de la partícula resultante. Por consiguiente, el control sobre el tamaño de partícula puede obtenerse seleccionando parámetros tales como velocidad del rotor, fuerza de cizalla, tipo de cizalla, tiempo de homogeneización, permutaciones diversas de los parámetros y similares.

10 Ejemplo 3(i)

*Efecto de una interfaz única o reducida sobre el tamaño de partícula de PLGA*

15 El Ejemplo 3(i) se realiza de la misma manera que el Ejemplo 3(g) y también usa la Emulsión 3(g), sin embargo, en lugar de burbujear CO<sub>2</sub> en la cámara de extracción a través de una frita y adicionalmente a través de la emulsión, el CO<sub>2</sub> supercrítico se introdujo en la parte superior de la cámara de extracción, y el CO<sub>2</sub> se retiró también desde la parte superior sin hacerlo pasar a través de la emulsión. Es decir, el CO<sub>2</sub> supercrítico entró en contacto con la emulsión a lo largo de un área superficial interfacial sencilla o reducida y no burbujeo a través, o se disolvió a través, de la emulsión.

20 *Análisis de partículas de PLGA*

El análisis de las partículas de PLGA se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 3(h). La media volumétrica promedio de las partículas de PLGA era de 2.408 nanómetros (nm) y la media en número era de 656 nanómetros (nm). La Figura 10 es un gráfico de la distribución del tamaño volumétrico de las partículas de PLGA producidas en el Ejemplo 3(i), estando el diámetro medio en el intervalo de nanómetros.

Ejemplo 4

30 Nanopartículas de acetato de colesterol (un esteroide insoluble en agua) se precipitan de acuerdo con una realización preferida de la presente invención. En los siguientes ejemplos la emulsión de CA se inyecta a la cámara de extracción, que contiene CO<sub>2</sub> supercrítico usando una boquilla fina.

*Preparación de emulsión de acetato de colesterol (CA)*

35 En los Ejemplos 4(a)-4(c) una cantidad medida de acetato de colesterol (CA) se disolvió en 10,0 gramos de agua saturada con EA para formar una solución. Esta solución se añadió después a 90,0 gramos de una solución acuosa saturada con EA de PVA al 1% (p/p de agua) para formar una mezcla. La mezcla se homogeneizó usando un dispersador a 5.000 rpm durante 3 minutos para formar las Emulsiones 4(a)-4(c) como se muestra en la Tabla 7.

40 *Producción de partículas de acetato de colesterol (CA)*

45 Las nanopartículas de CA se prepararon usando un aparato similar al aparato 100 mostrado en la Figura 1, siendo una diferencia que la emulsión se pulveriza en la cámara a través de una boquilla que se extiende a través de una pared lateral en lugar de a través de la entrada 146. Un componente del aparato usado consistía en una cámara de precipitación que tenía un volumen de 10 mililitros. Las Emulsiones 4(a)-4(c) se inyectaron a la cámara de precipitación usando una bomba de HPLC. La cámara de precipitación se mantiene a una temperatura constante usando una camisa calefactora. Los parámetros de presión y temperatura fueron 100 bar y 40°C, respectivamente.

50 El método de los Ejemplos 4(a)-4(c) se realizó de una manera continua. La cámara de precipitación se presurizó con dióxido de carbono supercrítico hasta la presión de operación deseada a la temperatura de operación deseada. El caudal de dióxido de carbono a través de la célula de precipitación se mantuvo constante a 16 ml/min. La emulsión preparada en el ejemplo 1 se inyectó a la cámara de precipitación a un caudal constante de 1,0 ml/min a través de una boquilla de 50 micrómetros. Según la emulsión se inyectaba hacia la cámara de precipitación se atomizaba en pequeñas gotas. Desde las gotas, EA se extraía continuamente por el dióxido de carbono supercrítico desde las gotas. 55 Debido a la extracción del EA, las partículas de soluto precipitaban en solución.

El flujo de emulsión hacia la cámara de precipitación se mantuvo durante 10 minutos después de los cuales el exceso de EA residual se lavó de la cámara de precipitación purgándolo con dióxido de carbono reciente durante 120-180 minutos. Después se permitió que la cámara de precipitación se despresurizara lentamente hasta que alcanzó 60 presión ambiente y la suspensión acuosa de las partículas de CA se recogió y analizó.

*Análisis de partículas de acetato de colesterol (CA)*

65 El análisis de las partículas obtenidas en el Ejemplo 4(a)-4(c) se determinó usando DLS. El análisis de la morfología en la partícula de CA se realizó usando SEM, como se muestra mediante la micrografía SEM en la Figura 11. Las partículas parecen uniformes y tienen una forma pequeña esférica o cilíndrica. Las partículas de CA tienen una distribución de tamaño estrecha. Hay un aumento del tamaño de partículas de CA con un aumento en la concentración de CA en la emulsión. En los Ejemplos 4(a)-4(c), la relación entre el tamaño medio de partícula y el contenido de CA

se muestra gráficamente en la Figura 12, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. La Figura 13 es un gráfico de distribución del peso volumétrico de las partículas de CA producidas en el Ejemplo 4(a).

TABLA 7

*Parámetros para la producción de partículas de CA en las que se varía la concentración de CA*

| Ej. Nº | CA<br>%(p/p<br>EA) | EA<br>%(p/p<br>Total) | PVA<br>%(p/p<br>H <sub>2</sub> O) | Media<br>en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) | Media<br>en<br>Número<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) |
|--------|--------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 4(a)   | 0,7                | 10                    | 1,0                               | 313                            | 137                          | 116                           | 51                           |
| 4(b)   | 2                  | 10                    | 1,0                               | 617                            | 339                          | 125                           | 69                           |
| 4(c)   | 5                  | 10                    | 1,0                               | 1.344                          | 948                          | 176                           | 124                          |

Ejemplos 4(d)-4(f)

*Efecto de diferentes densidades de CO<sub>2</sub>*

*Preparación de emulsión de CA*

Las Emulsiones 4(d)-4(f) se prepararon de una manera similar a la manera en que se preparó la Emulsión 4(b).

*Producción de partículas de acetato de colesterol (CA)*

Las partículas de los Ejemplos 4(d)-4(f) se prepararon de una manera similar a la manera en la que se prepararon los Ejemplos 4(a)-4(c), excepto por las diferentes densidades de dióxido de carbono como se muestra en la Tabla 8.

*Análisis de partículas de acetato de colesterol (CA)*

Se consiguió un tamaño de partícula generalmente uniforme independiente de los cambios en la densidad de dióxido de carbono supercrítico. Por consiguiente, la uniformidad de partículas puede conseguirse y mantenerse con una preocupación reducida por las densidades de fluido supercrítico. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

*Parámetros para la producción de partículas de CA en las que se varía la densidad de CO<sub>2</sub>*

| Ej. Nº | Densidad<br>de CO <sub>2</sub><br>g/ml | Media en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) | Media en<br>Número<br>(nm) | Desviación<br>Típica (nm) |
|--------|----------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 4(d)   | 0,628                                  | 617                         | 339                       | 125                        | 69                        |
| 4(e)   | 0,839                                  | 641                         | 358                       | 124                        | 69                        |
| 4(f)   | 0,485                                  | 631                         | 332                       | 151                        | 80                        |

Ejemplos 4(g)-4(k)

*Efecto de las concentraciones de solvente y disoluto sobre el tamaño de partícula*

*Producción de partículas de acetato de colesterol (CA)*

Los Ejemplos 4(g)-4(k) se prepararon de la misma manera que el Ejemplo 3(a), excepto como se indica a continuación. En el Ejemplo 4(g)-4(k), las Emulsiones 4(g)-4(k) se prepararon como se indica en la Tabla 9. La concentración

de CA y la concentración de EA se variaron para determinar el efecto de la concentración de disolvente y soluto sobre el tamaño de partícula. Las Emulsiones 4(g)-4(k) se homogeneizaron usando un microfluidizador disponible en el mercado (por ejemplo, modelo M110-L) a una presión de 99,95 MPa (14,5 kpsi) y en 3 pasos. Se añadió PVA al 0,5% p/p en H<sub>2</sub>O. Para los Ejemplos 4(g)-4(k), se usaron las Emulsiones 4(g)-4(k) correspondientes.

#### *Análisis de partículas de acetato de colesterol (CA)*

Los tamaños de las partículas de CA de los Ejemplos 4(g)-4(k) se muestran en la Tabla 9. Las Figuras 14(a), 14(b) y 14(c) son gráficos multi-dimensionales de tamaño volumétrico de partícula (medio o promedio) (en nanómetros) frente a la concentración (en porcentaje p/p total) de CA y EA para los Ejemplos 4(g)-4(k).

TABLA 9

*Concentración de ingredientes en los Ejemplos 4(g)-4(k)*

| Ej. N° | Acetato de<br>colesterol<br>%(p/p EA) | EA<br>%(p/p) | Media<br>en<br>Volumen<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) | Media<br>en<br>Número<br>(nm) | Desviación<br>Típica<br>(nm) |
|--------|---------------------------------------|--------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 4(g)   | 2                                     | 20           | 315                            | 78                           | 249                           | 61                           |
| 4(h)   | 3                                     | 30           | 404                            | 167                          | 176                           | 72                           |
| 4(i)   | 1                                     | 30           | 253                            | 55                           | 210                           | 46                           |
| 4(j)   | 3                                     | 10           | 179                            | 95                           | 52                            | 28                           |
| 4(k)   | 1                                     | 10           | 177                            | 95                           | 52                            | 28                           |

#### *Ejemplo 5*

##### *Preparación de emulsión de Tripalmitina*

En el Ejemplo 5(a), una Tripalmitina al 5% p/p (lípidos) se disolvió en 20,0 gramos de cloroformo. Se usó fosfatidil colina al 5% p/p como tensioactivo y se disolvió en cloroformo. La solución de Tripalmitina se añadió después a 180,0 g de agua que contenía 0,25 g de glicolato sódico para formar una mezcla. La mezcla se homogeneizó usando un dispersador a 5.000 rpm para 1 paso a 500 bar, y después 3 pasos a 1.300 bar usando un microfluidizador disponible en el mercado (modelo M110-L) para formar la Emulsión 5(a).

##### *Producción de partículas de Tripalmitina*

La Emulsión 5(a) se procesó sustancialmente de la misma manera que en los Ejemplos anteriores. La presión de operación era de 80 bar, y la temperatura de operación era de 35°C. El caudal de dióxido de carbono era de 1 ml/min.

##### *Análisis de partículas de Tripalmitina*

Las partículas de Tripalmitina se produjeron, recogieron y analizaron sustancialmente de la misma manera que en los Ejemplos anteriores. Los resultados se muestran en la Tabla 10. La Figura 15 es una micrografía SEM de nanopartículas de CA producidas en el Ejemplo 5(a). La Figura 16 es un gráfico de distribución del tamaño medio en número de partículas de Tripalmitina producidas en el Ejemplo 5(a), y la Figura 17 es un gráfico de distribución del tamaño medio en volumen de las mismas partículas. Las Figuras 16-17 muestran ambas distribuciones en tamaño medio en número y volumen en un intervalo que es menor de 50 nanómetros.

TABLA 10

*Resultados de la producción de partículas de Tripalmitina*

| Ej. N° | Media en<br>Volumen (nm) | Desviación<br>Típica (nm) | Media en<br>Número (nm) | Desviación<br>Típica (nm) |
|--------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 5(a)   | 39,6                     | 31,5                      | 20,4                    | 16,3                      |

El proceso y las realizaciones descritas en este documento son ejemplos de estructuras, sistemas y métodos que tienen elementos correspondientes a los elementos de la invención citada en las reivindicaciones. Esta descripción escrita puede permitir a los especialistas en la técnica realizar y usar realizaciones que tienen elementos alternativos que corresponden igualmente a los elementos de la invención citados en las reivindicaciones. El alcance de la invención incluye, por lo tanto, otras estructuras, sistemas y métodos que no difieren del lenguaje literal de las reivindicaciones, e incluye adicionalmente otras estructuras, sistemas y métodos con diferencias no sustanciales respecto al lenguaje literal de las reivindicaciones.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para producir partículas, que comprende:

5 poner en contacto una emulsión con un fluido supercrítico, teniendo la emulsión una fase acuosa continua y una fase discontinua, comprendiendo la fase discontinua un disolvente orgánico que tiene un soluto disuelto en su interior, siendo el soluto insoluble en la fase continua y el disolvente en la fase discontinua siendo soluble en el fluido supercrítico; y

10 extraer el disolvente de la fase discontinua de la emulsión y en el fluido supercrítico para precipitar el soluto y formar así partículas de soluto suspendidas en la fase continua.

2. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fase discontinua es un disolvente no polar.

15 3. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el soluto comprende un material biológicamente activo o un fármaco.

4. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el soluto comprende un polímero.

20 5. En el método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el polímero es un polímero biodegradable.

6. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas de soluto están suspendidas en la fase continua en un proceso continuo.

25 7. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas tienen un diámetro medio de 0,1 nanómetros a 1,0 milímetros.

30 8. En el método de acuerdo con la reivindicación 7 en el que las partículas tienen un diámetro medio de 0,1 micrómetros a 400 micrómetros.

9. En el método de acuerdo con la reivindicación 8 en el que las partículas tienen un diámetro medio de 1 nanómetro a 500 nanómetros.

35 10. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la emulsión comprende adicionalmente un tensioactivo.

11. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el fluido supercrítico comprende dióxido de carbono.

40 12. En el método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el soluto se selecciona entre el grupo compuesto agentes medicinales, materiales nutricionales, proteínas, péptidos, alcaloides, alquiloides, extractos animales y/o vegetales, antígenos, ácidos nucleicos, antibióticos, vitaminas, lípidos, polímeros, precursores poliméricos, pigmentos, toxinas, insecticidas, materiales víricos, adyuvantes de diagnóstico, compuestos químicos agrícolas, colorantes, explosivos, pinturas, cosméticos, enzimas y catalizadores.

45 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las partículas son esféricas.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fase continua es agua.

50 15. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la fase discontinua comprende un disolvente no polar o un disolvente orgánico parcialmente soluble en agua.

55 16. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una concentración de soluto en el disolvente para obtener un tamaño de partícula deseado, en el que un aumento en la concentración de soluto da como resultado un aumento en el tamaño de partícula, y una disminución en la concentración de soluto da como resultado una disminución en el tamaño de partícula.

60 17. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar una concentración de la fase discontinua en la fase continua para obtener un tamaño de partícula deseado, en el que un aumento en la concentración de la fase discontinua da como resultado un aumento en el tamaño de partícula, y una disminución de la concentración de la fase discontinua da como resultado una disminución en el tamaño de partícula.

65 18. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de inyectar la emulsión en el fluido supercrítico para formar gotas de emulsión, conteniendo las gotas partes de las fases continua y discontinua, en el que las partículas se precipitan y se suspenden en la fase continua en las gotas después de la etapa de extracción del disolvente de la fase discontinua.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar un tamaño de gota de la emulsión para obtener un tamaño de partícula deseado, en el que un aumento en el tamaño de gota da como resultado un aumento en el tamaño en partícula, y una disminución en el tamaño de gota da como resultado una disminución en el tamaño de partícula.

5

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18 en el que la emulsión se inyecta a través de una boquilla de manera que la emulsión se pulveriza en un volumen del fluido supercrítico, y la boquilla es una boquilla capilar, una boquilla coaxial o una boquilla ultrasónica.

10

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que la etapa de contacto comprende hacer funcionar una mezcladora para aumentar el área de contacto entre las gotas de emulsión y el fluido supercrítico, siendo la mezcladora una superficie vibratoria o una mezcladora con propulsor, y aumentando de esta manera la velocidad de transferencia de masa del disolvente desde las gotas de emulsión al fluido supercrítico.

15

22. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar un tamaño de gota de la fase discontinua en la emulsión para obtener un tamaño de partícula deseado, en el que un aumento en el tamaño de gota de la fase discontinua da como resultado un aumento en el tamaño de partícula, y una disminución del tamaño de gota en la fase discontinua da como resultado una disminución en el tamaño de partícula.

20

23. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la etapa de contacto comprende bombear la emulsión y el fluido supercrítico a una cámara, poner en contacto la emulsión y el fluido supercrítico juntos a lo largo del límite interfacial que tiene un área superficial reducida, en el que el disolvente se extrae de la fase discontinua al fluido supercrítico a través de un límite interfacial, y retirar el fluido supercrítico y el disolvente de la cámara, con lo que el fluido supercrítico no se burbuja a través de la emulsión para extraer el disolvente.

25

24. El método de acuerdo con la reivindicación 26 en el que la etapa de formar la emulsión se realiza usando un microfluidizador, una bocina ultrasónica, un dispersador, una mezcladora estática, un molino coloidal, un molino de energía de fluido, una mezcladora de turbina, o una técnica de emulsión espontánea.

30

25. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente las etapas de filtrar las partículas suspendidas para formar una torta concentrada de partículas, y secar por congelación la torta para obtener partículas secas.

35

26. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el fluido supercrítico está en un estado supercrítico y está compuesto esencialmente por dióxido de carbono, agua, trifluorometano, óxido nitroso, dimetil éter, alcano C1-C6 de cadena lineal o ramificada, alqueno, alcohol o combinaciones de los mismos.

40

45

50

55

60

65

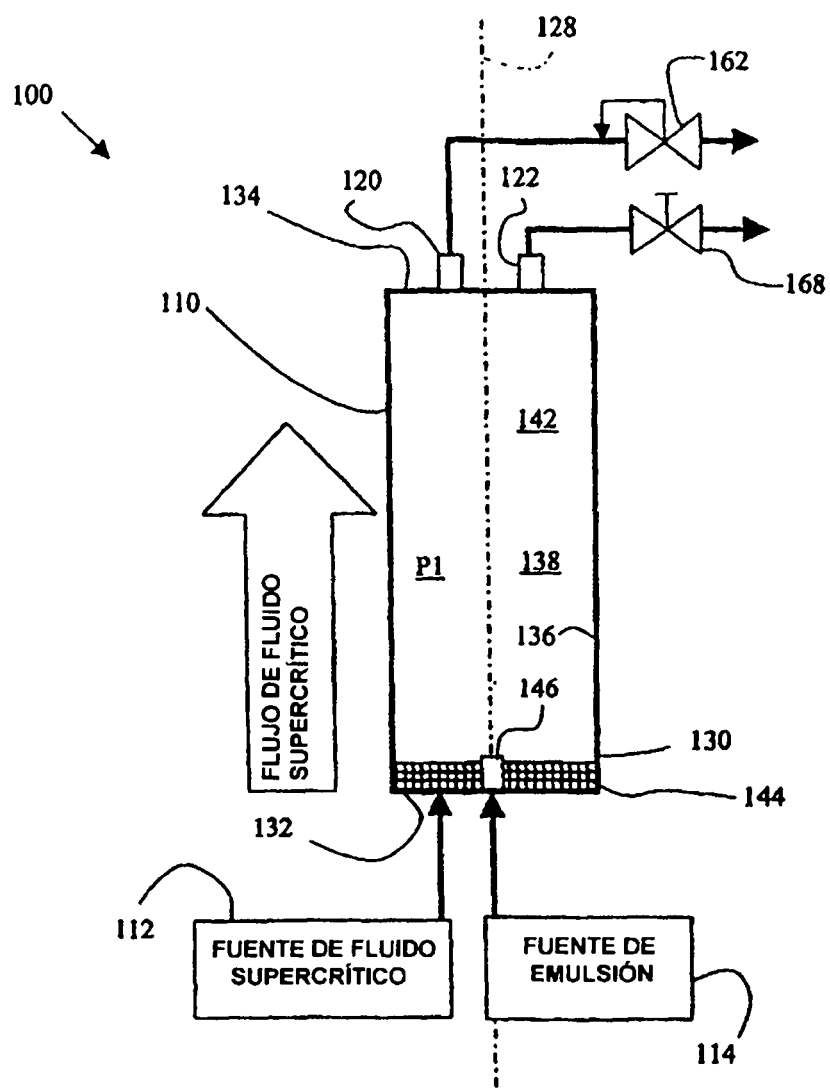


Fig. 1

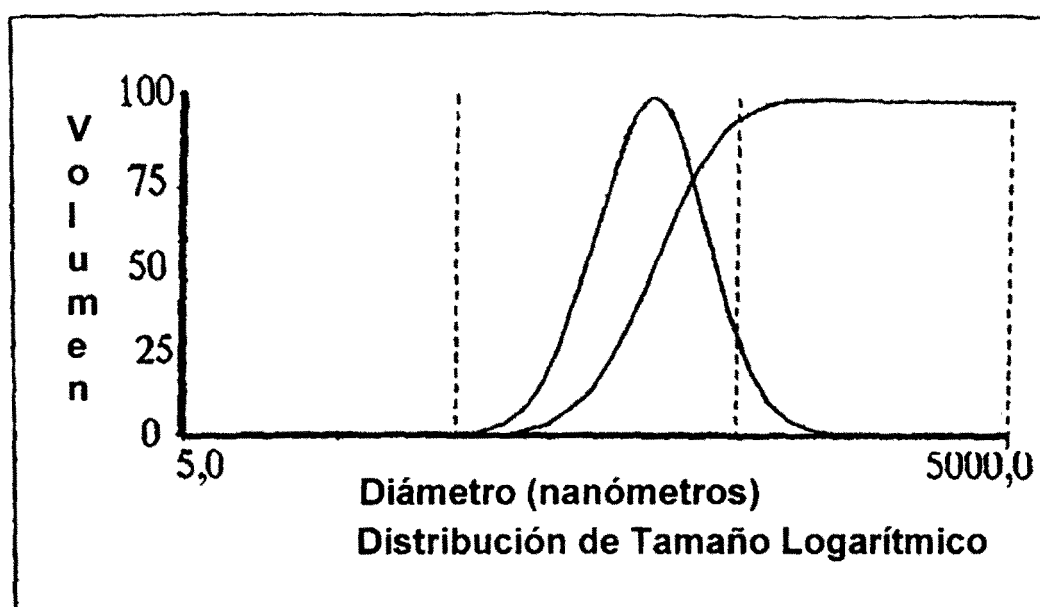


Fig. 2



Fig. 3

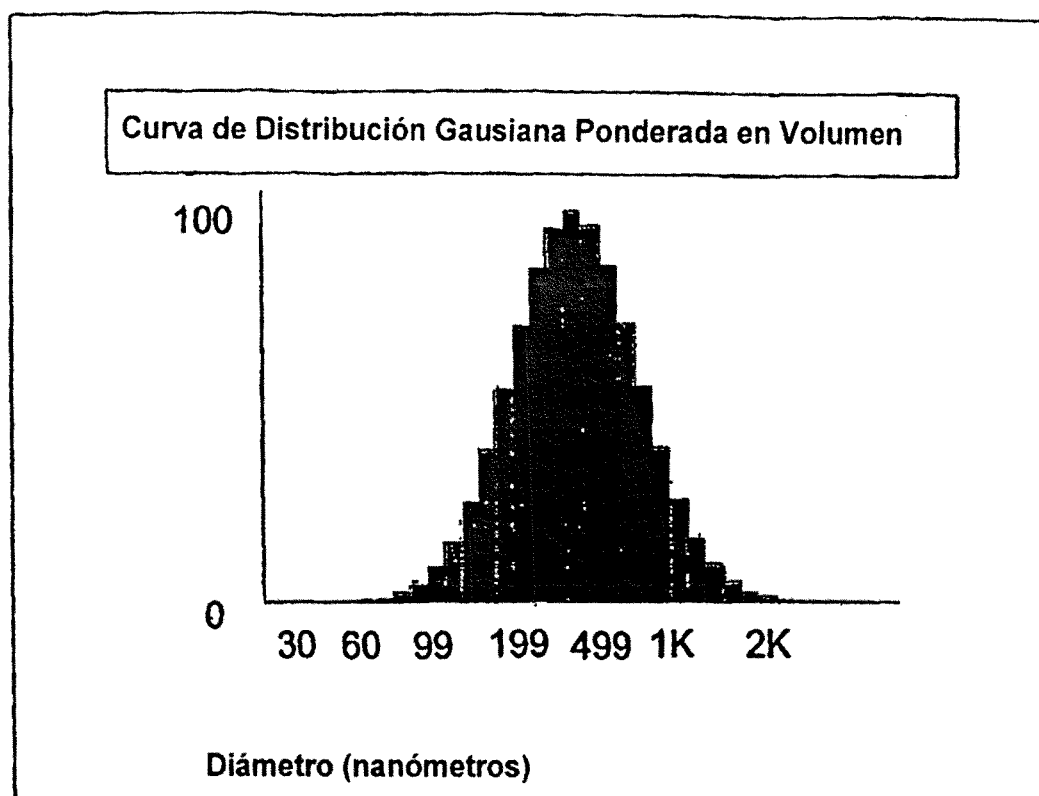


Fig. 4

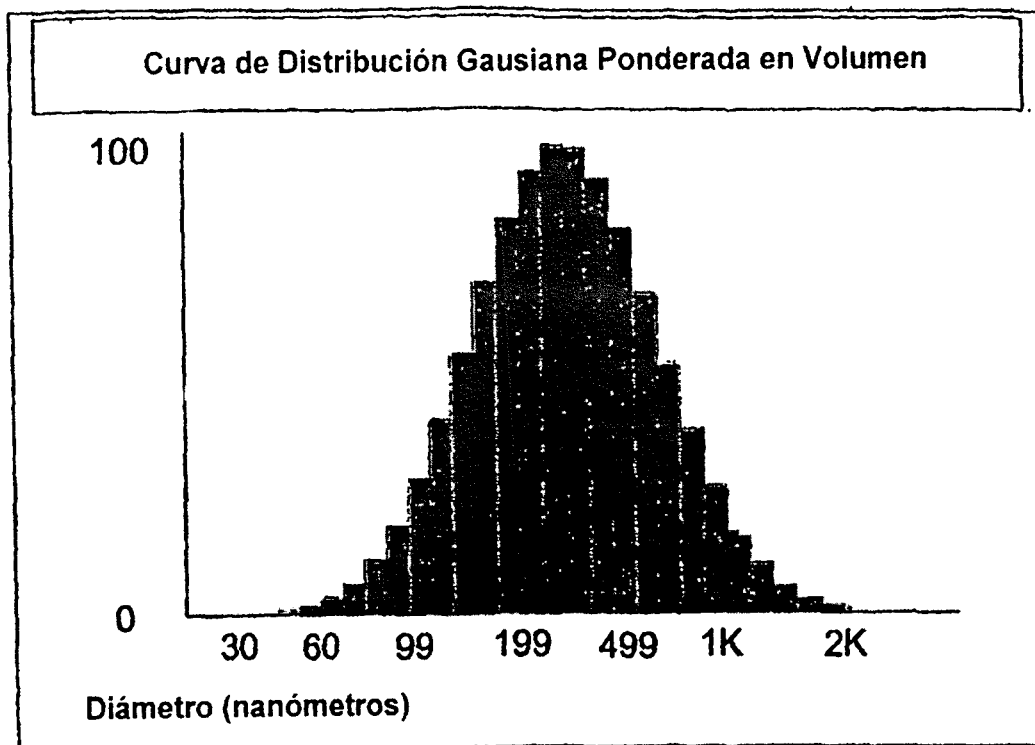


Fig. 5

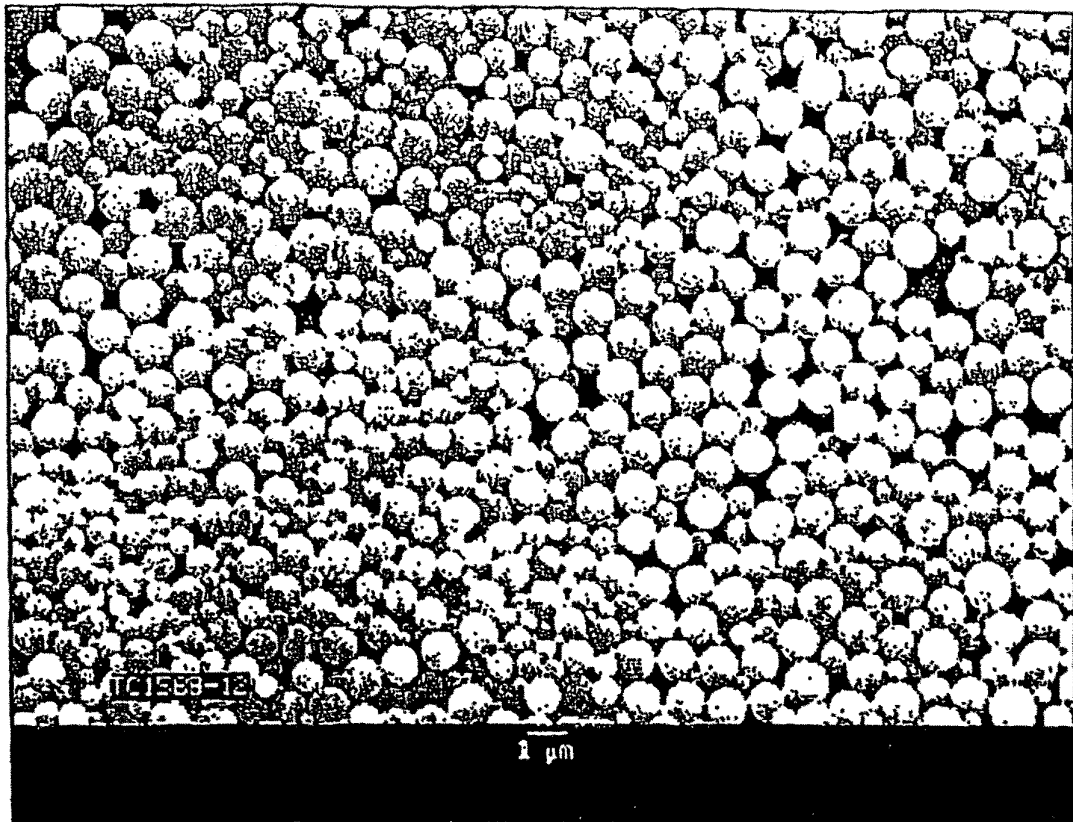


Fig. 6

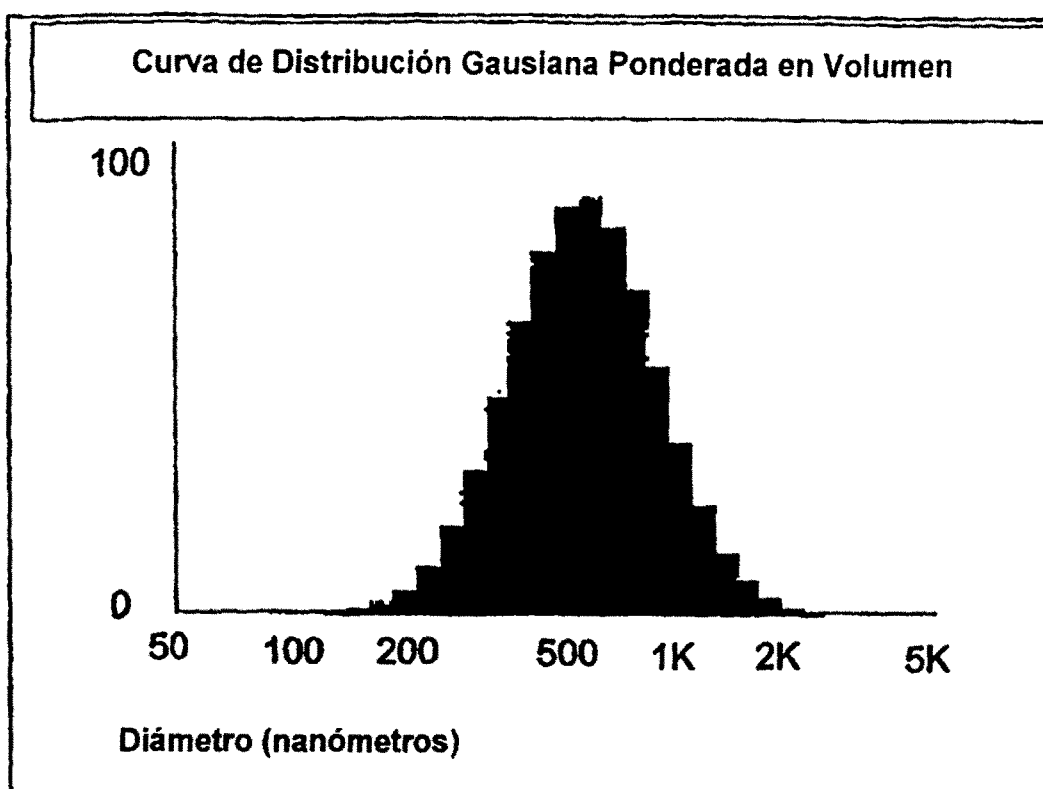


Fig. 7

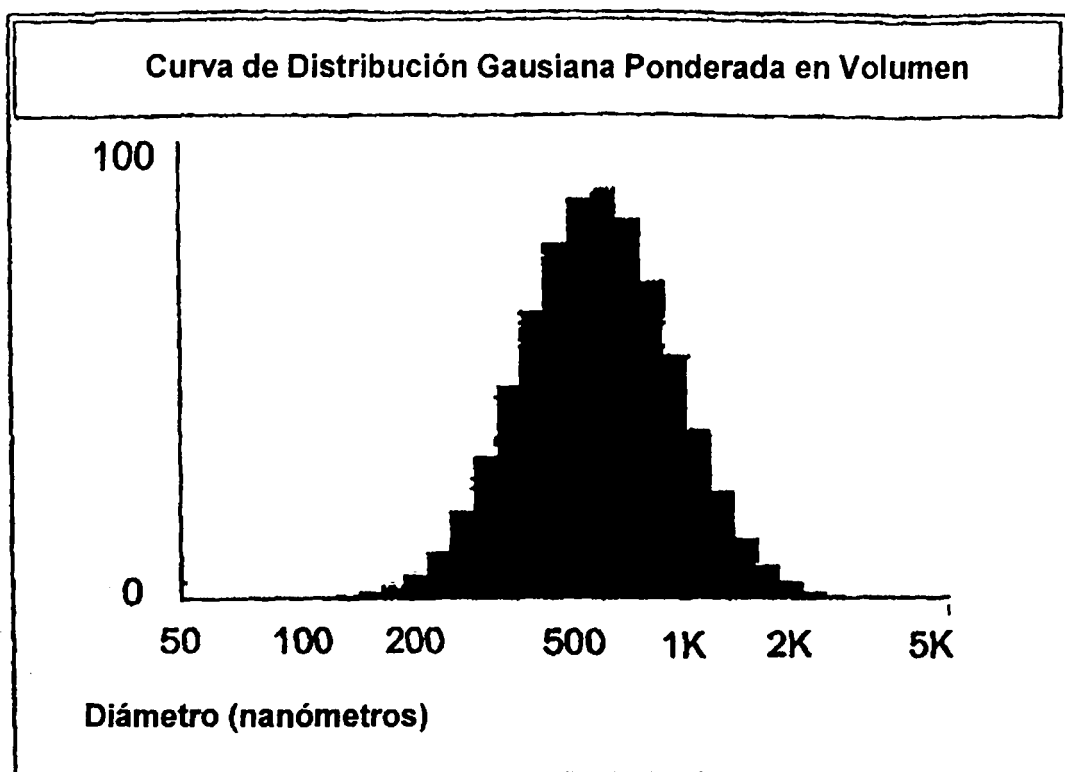


Fig. 8

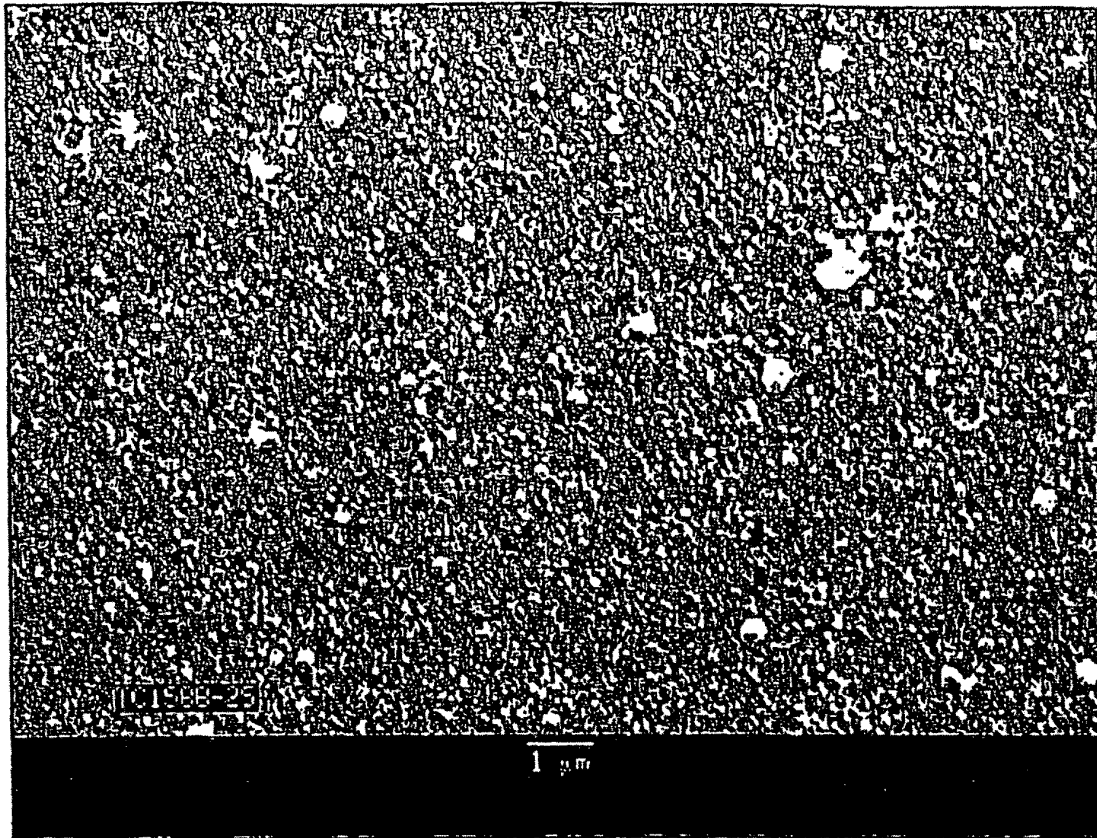


Fig. 9

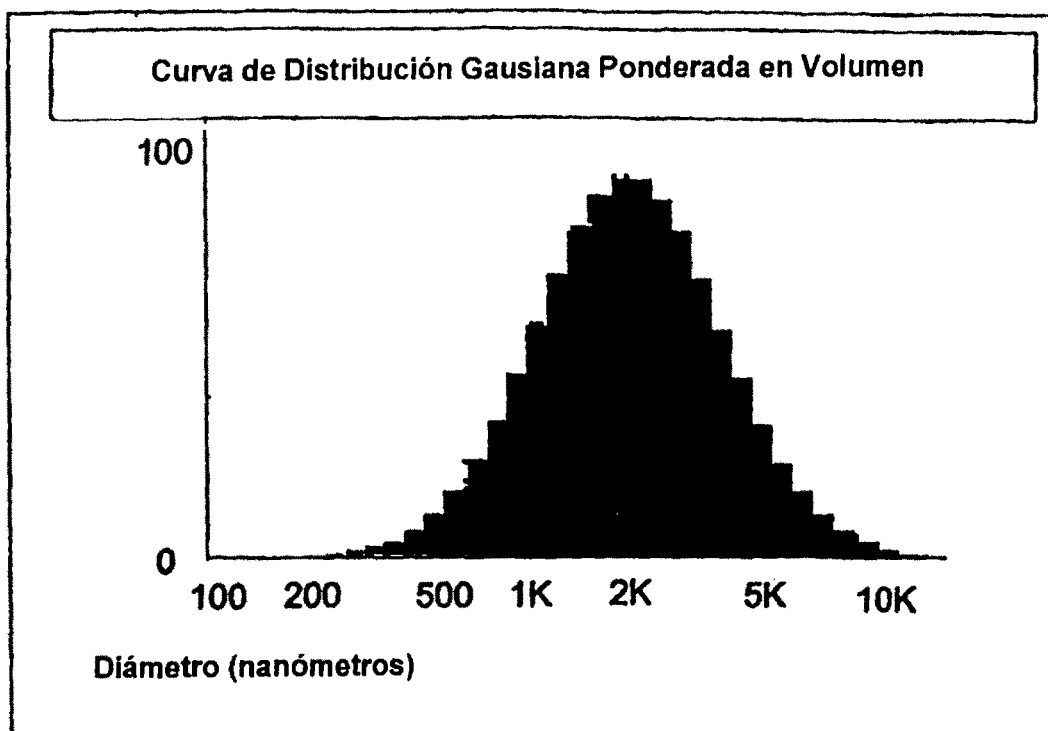


Fig. 10

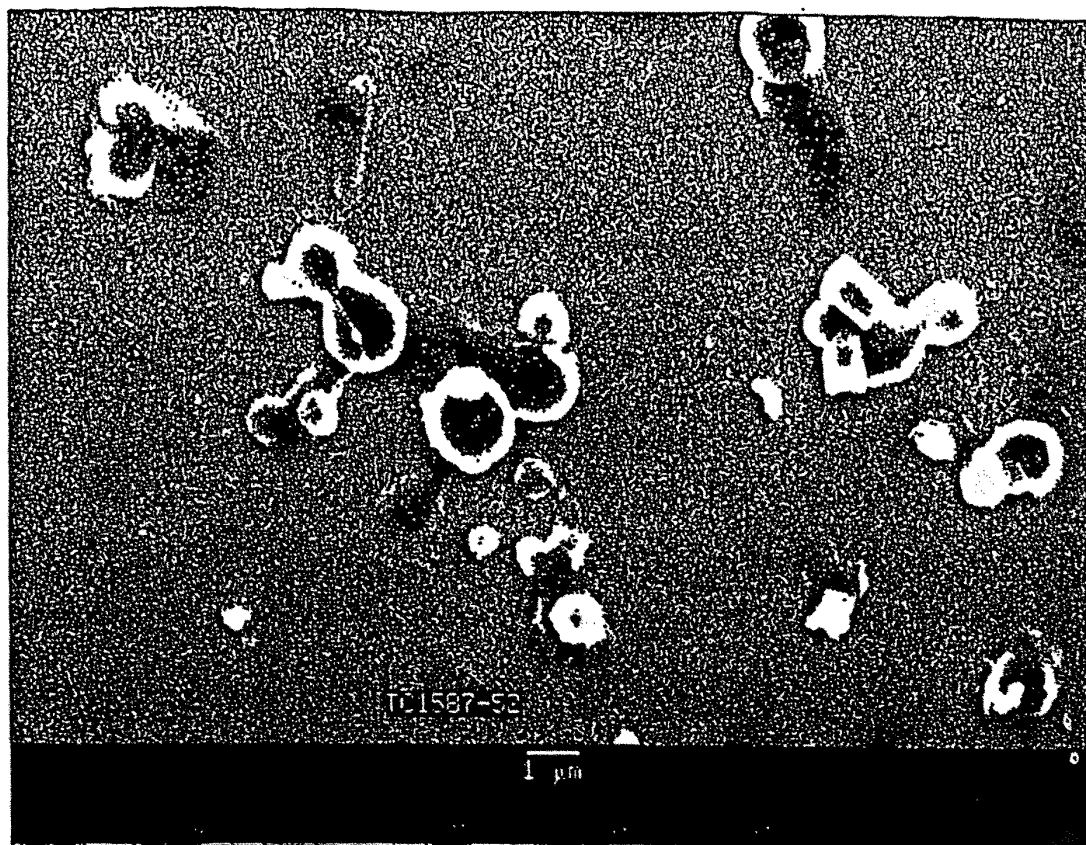


Fig. 11

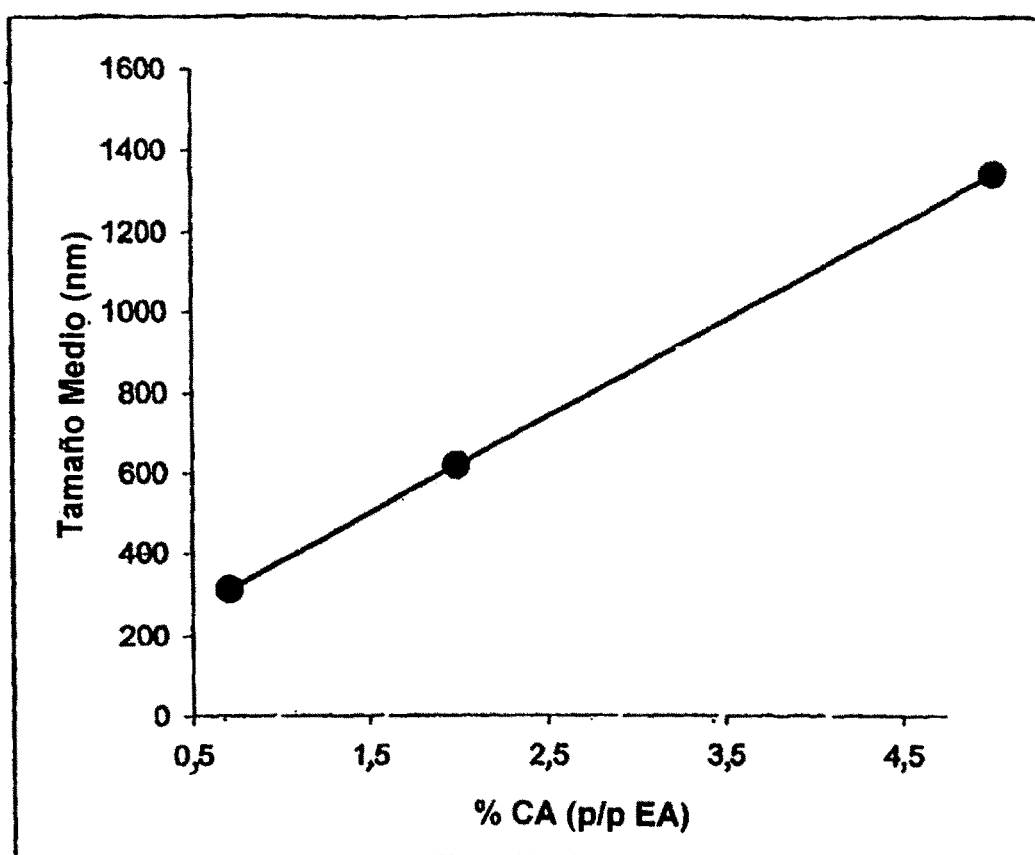


Fig. 12

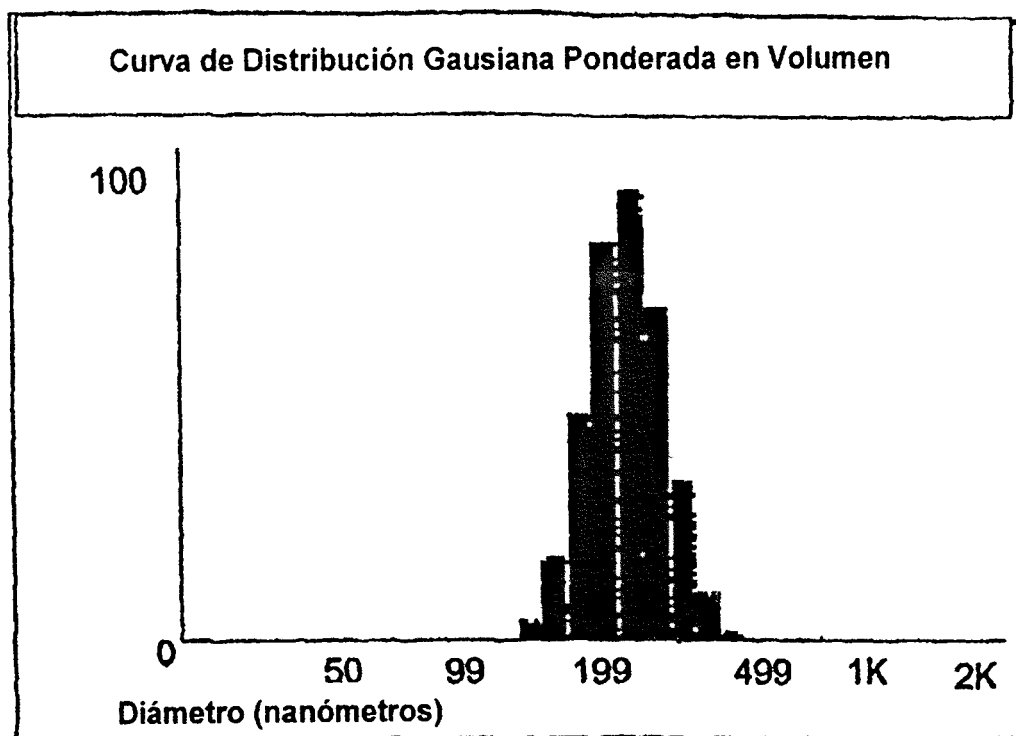


Fig. 13

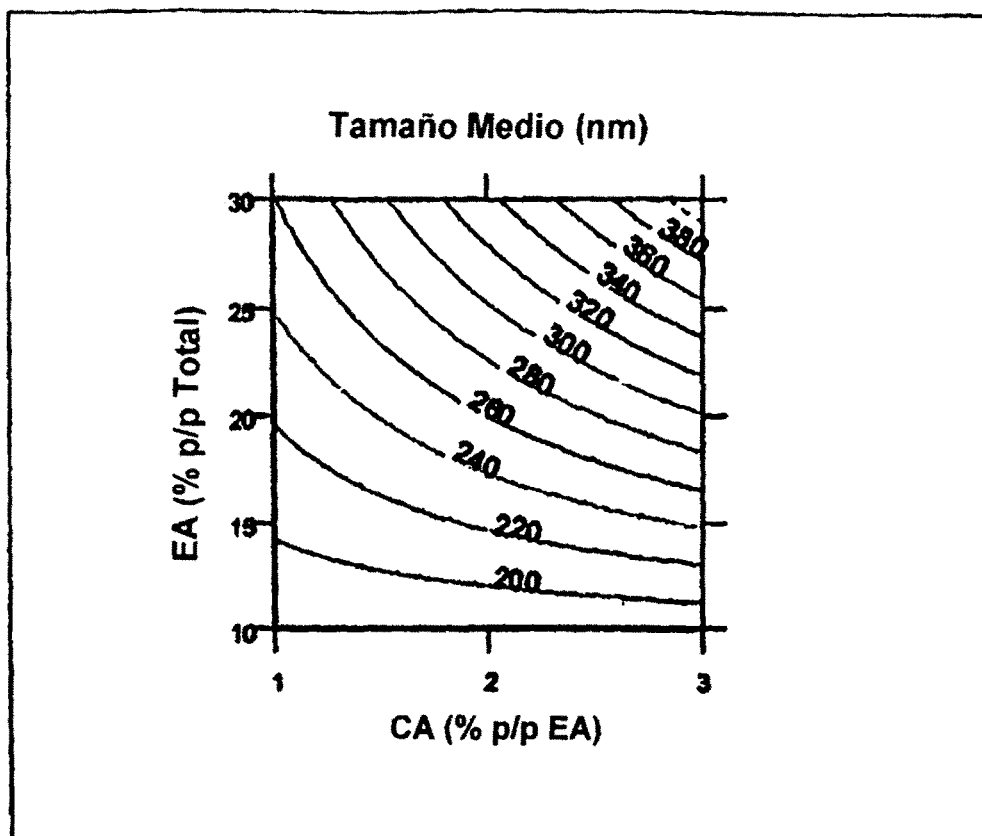


Fig. 14(a)

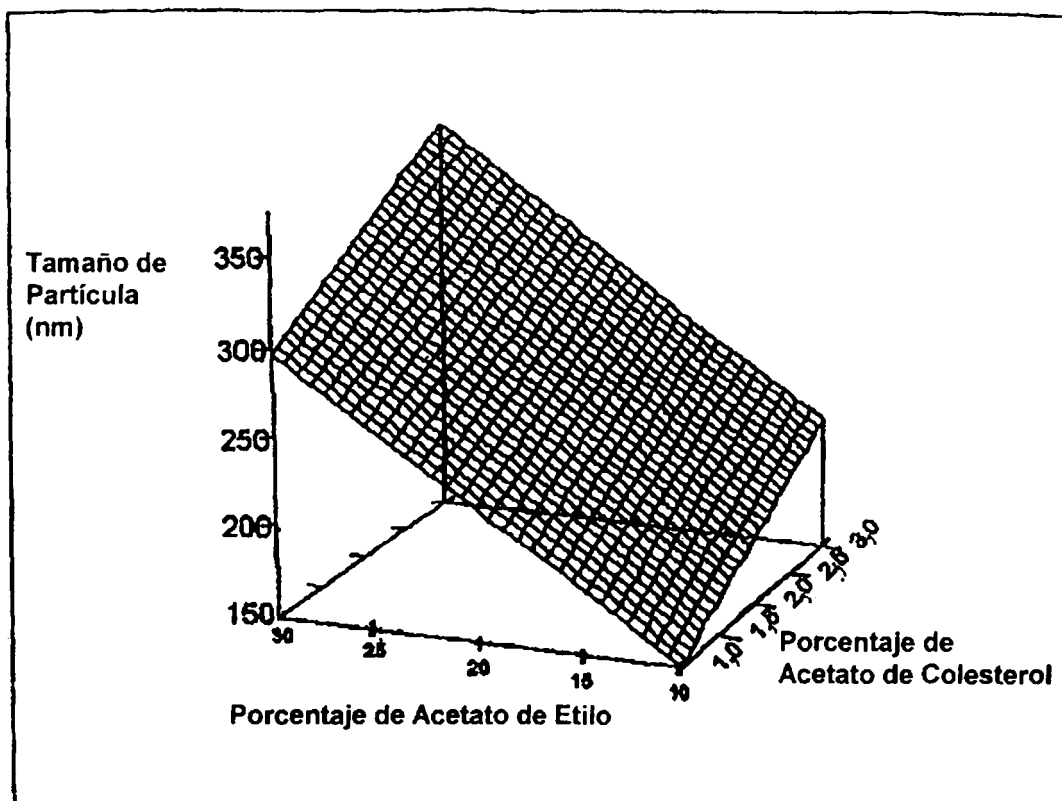


Fig. 14(b)

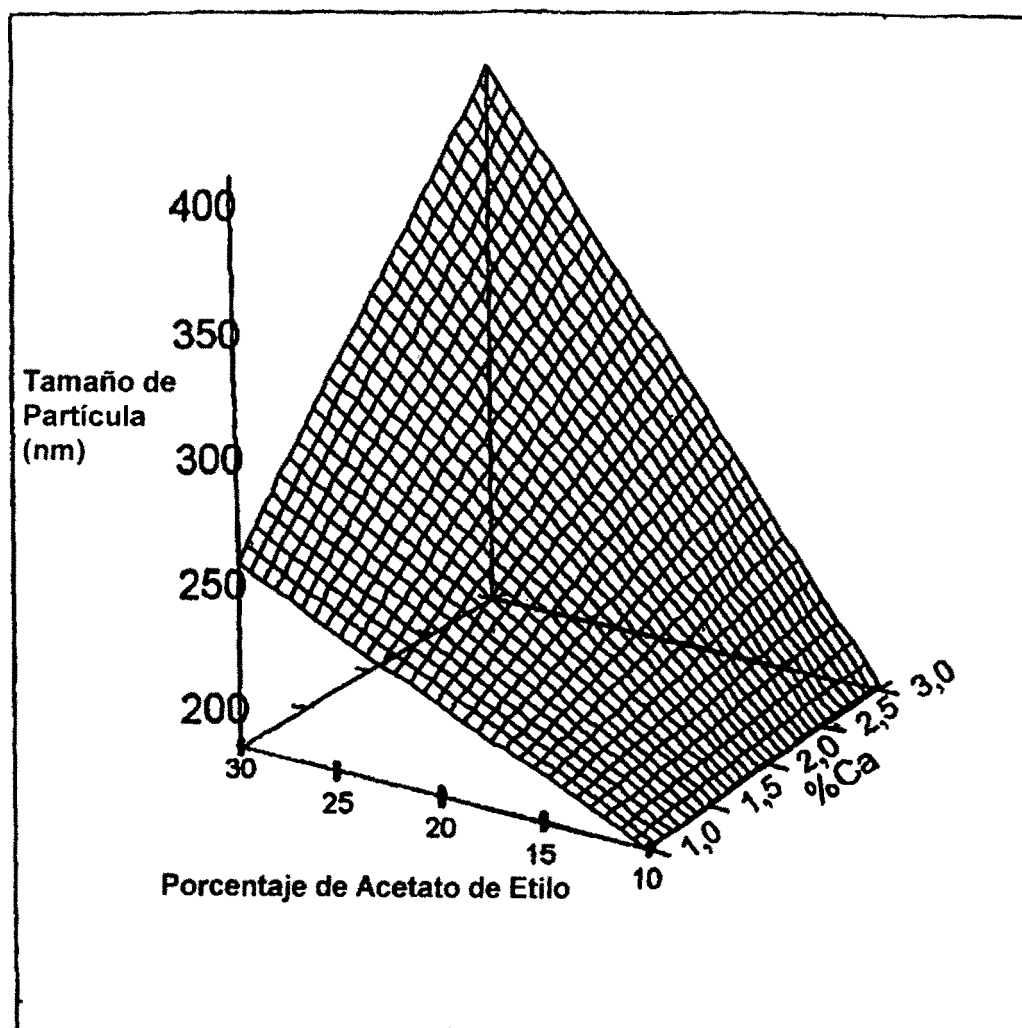


Fig. 14(c)

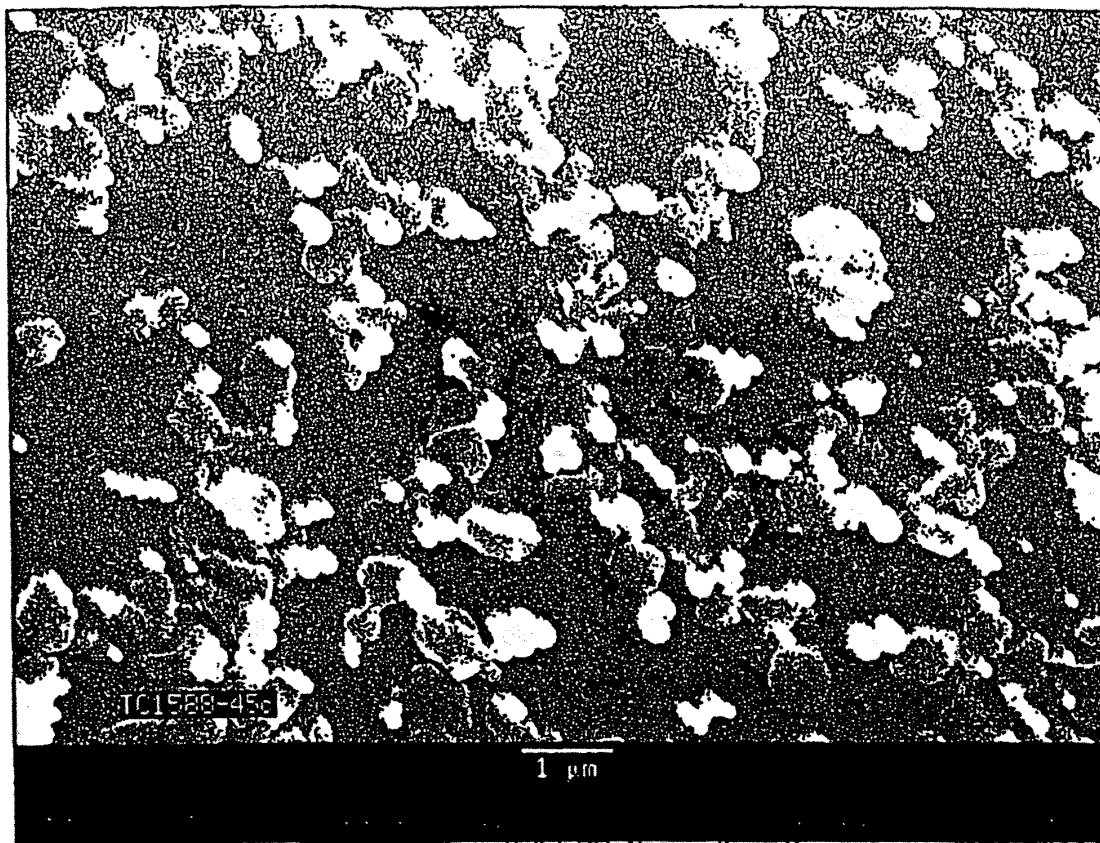


Fig. 15

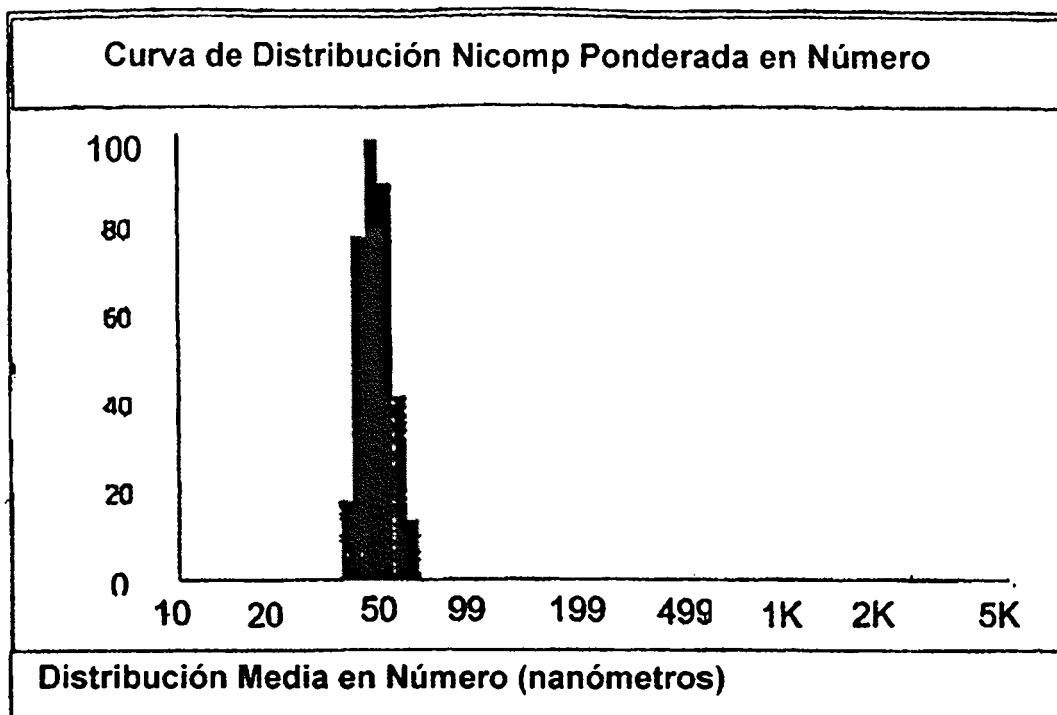


Fig. 16

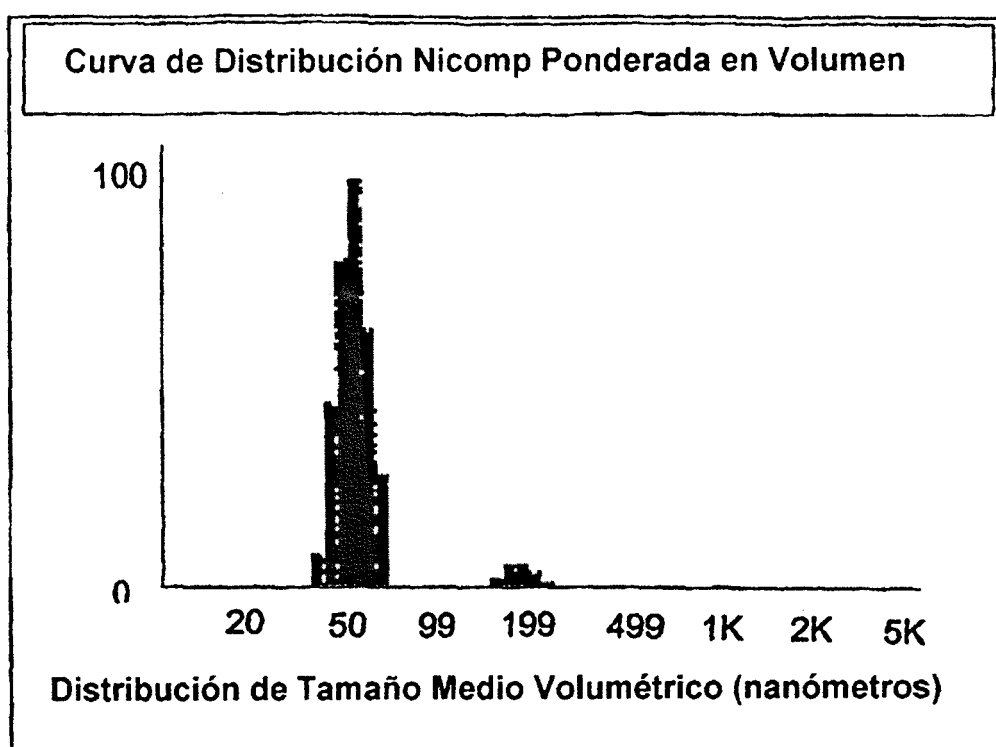


Fig. 17