

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 502**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16	(2006.01)
C08L 67/04	(2006.01)
C08L 71/02	(2006.01)
B01J 13/12	(2006.01)
A61K 31/27	(2006.01)
A61K 31/445	(2006.01)
A61K 38/09	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2018 PCT/KR2018/015121**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2019 WO19108030**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2018 E 18883786 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022 EP 3586828**

54 Título: **Procedimiento para preparar microesferas biodegradables con estabilidad mejorada y estabilidad al almacenamiento**

30 Prioridad:

30.11.2017 KR 20170163105

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2022

73 Titular/es:

**G2GBIO, INC. (100.0%)
411-1 1646 Yuseong-daero
Yuseong-gu, Daejeon 34054, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, HEEYONG;
SEOL, EUNYOUNG y
YOON, KWONHYEOK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 915 502 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar microesferas biodegradables con estabilidad mejorada y estabilidad al almacenamiento

CAMPO TÉCNICO

[Referencia cruzada a solicitud(es) relacionada(s)]

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad basado en la Solicitud de Patente Coreana No. 10-2017-0163105, con fecha de 30 de noviembre, 2017.

La presente invención se refiere a un método para producir microesferas biodegradables, y más particularmente, a un método para producir microesferas biodegradables que tienen alta seguridad al reducir notablemente el disolvente residual, menos deformaciones de las microesferas, y estabilidad de almacenamiento mejorada.

10 TÉCNICA RELACIONADA

El polímero biodegradable se puede preparar en forma de microesferas (por ejemplo, partículas que tienen un tamaño de partícula promedio en el intervalo de nanómetros a milímetros, particularmente 1 a 500 μm , particularmente 10 a 150 μm) mediante diversas técnicas conocidas. Las microesferas poliméricas biodegradables se pueden usar como cargas de partículas para mejorar las arrugas faciales por sí mismas, y son muy usadas con el fin de proporcionar una liberación sostenida o retardada de un fármaco u otro agente activo encapsulando dicho fármaco u otro agente activo. El método más frecuentemente usado para preparar dicha microesfera de polímero biodegradable es disolver el polímero biodegradable, o el polímero biodegradable y la sustancia (fármaco u otro agente activo) a encapsular en dicho polímero, en un disolvente, y entonces dispersar o emulsionar la disolución resultante en una disolución acuosa. A continuación, el disolvente de las microesferas se elimina para obtener el producto final de microesferas. Los disolventes tóxicos tales como el diclorometano o el cloroformo se usan a menudo para disolver polímeros biodegradables y agentes activos en el procedimiento de producción de microesferas según la técnica conocida. Los residuos de estos disolventes tóxicos en el producto final son indeseables debido a su toxicidad general y a sus efectos cancerígenos potenciales. Además, se usa una mezcla de diversos tipos de disolventes orgánicos para disolver homogéneamente el polímero biodegradable y el agente activo simultáneamente. Esta mezcla de disolventes se dispersa en una disolución acuosa para formar una emulsión, y después se extrae y se evapora en una capa de disolución acuosa según la solubilidad de cada disolvente en una disolución acuosa, la afinidad con el polímero biodegradable, etc. Sin embargo, se ha encontrado que la mezcla de tales disolventes orgánicos no se elimina lo suficiente durante la producción de microesferas según la técnica anterior conocida, y el disolvente residual afecta negativamente la estabilidad del producto final, tal como al promover la descomposición del polímero durante el período de almacenamiento de las microesferas finalmente producidas. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar un método de producción de microesferas poliméricas biodegradables capaz de aumentar la vida útil de un producto reduciendo la cantidad residual de mezcla de disolvente tóxico y disolvente orgánico. El documento WO 02/49620 describe un procedimiento para la producción de micropartículas poliméricas, que comprende disolver un polímero en un disolvente, para formar una disolución de polímero; añadir un agente activo no soluble en agua a la disolución de polímero, para formar una fase de fármaco contenida en una vasija; añadir con mezclamiento una cantidad predeterminada de una fase acuosa de tensioactivo a la vasija que contiene la fase de fármaco, siendo suficiente dicha cantidad predeterminada para hacer que la fase de tensioactivo se convierta en la fase continua y el medio de extracción, para extraer una cantidad de dicho disolvente de dicha fase de fármaco de manera que se produce una suspensión de micropartículas tras la adición de la fase de tensioactivo a la fase de fármaco, sin necesidad de eliminar el disolvente de la vasija. En este procedimiento, el disolvente se elimina mediante lavado, filtración, vacío, o evaporación. El documento EP 2 982 367 describe un método para preparar una microesfera de donepezilo, que comprende las etapas de: disolver en uno o más disolventes donepezilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y un polímero biocompatible y biodegradable; formar una microesfera añadiendo la disolución de donepezilo y polímero biocompatible biodegradable a una disolución acuosa de polímero hidrófilo, y agitando; y eliminar el disolvente, en el que el método comprende además una etapa de lavar la microesfera. El documento WO 2014/202214 describe un procedimiento para la preparación de micropartículas biodegradables de polímero de poli(D,L láctida-co-glicólida) (PLGA), que tiene un perfil de liberación sigmoide de un compuesto básico o hidrófobo, contenido dentro de las micropartículas, que comprende preparar una emulsión de aceite en agua, en la que la fase oleosa comprende PLGA, el compuesto y un disolvente orgánico, y la fase acuosa comprende agua, tensioactivo, opcionalmente, un amortiguador, y el mismo disolvente orgánico que en la fase oleosa, y entonces llevar a cabo una etapa de extracción/evaporación de la emulsión con disolvente, seguido de una única etapa de secado de las micropartículas endurecidas. El documento EP 1 629 833 describe un procedimiento para la producción de micropartículas, en el que se disuelve betametasona y un polímero biodegradable en un disolvente que comprende un hidrocarburo halogenado y alcohol fenilalquílico para formar una fase oleosa, la fase oleosa se mezcla con una fase acuosa para formar una emulsión de tipo o/w, y después los disolventes mencionados anteriormente se eliminan para producir las micropartículas. El documento KR 2016 0019020 se refiere al desarrollo de un método para producir micropartículas de liberación sostenida, que puede eliminar fácilmente el disolvente de alcano halogenado y minimizar la hidrólisis del polímero biodegradable.

DESCRIPCIÓN

[Problema técnico]

5 En consecuencia, la presente invención se ha realizado para resolver el problema mencionado anteriormente de la técnica convencional. De este modo, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir microesferas biodegradables que tienen alta seguridad al reducir notablemente el disolvente residual, menos deformaciones de las microesferas, y estabilidad de almacenamiento mejorada.

[Solución técnica]

Como un aspecto para lograr dicho propósito, la presente invención se refiere a un método para preparar microesferas biodegradables, que comprende:

- 10 (a) formar una disolución de polímero biodegradable disolviendo un polímero biodegradable solo; o un polímero biodegradable y un fármaco en un disolvente orgánico;
- (b) mezclar uniformemente la disolución de polímero biodegradable preparada en la etapa (a) en una disolución acuosa que contiene un tensioactivo, para formar una emulsión que contiene la disolución de polímero biodegradable como fase dispersa y una disolución acuosa que contiene el tensioactivo como una fase continua;
- 15 (c) extraer y evaporar el disolvente orgánico de la fase dispersa en la emulsión de la etapa (b) a la fase continua para producir microesferas, en el que se elimina una parte de la fase continua que contiene el disolvente orgánico extraído, mientras que se suministra una nueva fase continua; y
- (d) recuperar las microesferas de la fase continua que contiene las microesferas producidas en la etapa (c), en el que la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua o continua, y (i) cuando la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua, la fase continua eliminada es una relación de volumen de 40% (v/v) a 99% (v/v), basado en el volumen total de la fase continua, o es una relación en peso de una fase continua restante, excepto la relación en peso puntual de la fase continua de la micropartícula en la etapa (c), o (ii) cuando la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma continua, la tasa de eliminación de la fase continua está en el intervalo de 2% (v/v) a 200% (v/v)/min, basado en el volumen total de la fase continua.
- 20

25 EFECTOS VENTAJOSOS

En la producción de una microesfera de polímero biodegradable que contiene un polímero biodegradable en sí mismo, o una microesfera biodegradable que contiene un polímero biodegradable y un fármaco fisiológicamente activo, es muy importante minimizar la cantidad residual de disolvente tóxico o mezcla de disolvente orgánico que queda en la microesfera. La presente invención proporciona un método para preparar de manera eficaz microesferas biodegradables que tienen alta seguridad y excelente estabilidad de almacenamiento formando una emulsión y después eliminando de la fase dispersa una parte de una fase continua que comprende un disolvente orgánico extraído, al tiempo que se suministra una nueva disolución acuosa para reemplazar dicha fase continua. De este modo, es posible eliminar rápida y fácilmente el disolvente orgánico residual en las microesferas, al tiempo que se minimizan los cambios morfológicos de las microesferas y la reducción del peso molecular debido a la hidrólisis del polímero biodegradable en las microesferas.

30

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- FIG. 1a es una fotografía de microscopio electrónico de barrido (SEM) para el análisis de la caracterización morfológica de las microesferas preparadas en el Ejemplo 1-1 de la presente invención, que confirma que la mayoría de las microesferas mantienen la morfología esférica completa.
- 40 FIG. 1b es una fotografía SEM para el análisis de la caracterización morfológica de las microesferas preparadas en el Ejemplo Comparativo 1 (cuando el tiempo de intercambio del disolvente de fase continua es más rápido que el tiempo de endurecimiento de la superficie de la microesfera), lo que confirma que las microesferas no pueden mantener la forma esférica.
- 45 FIG. 1c es una fotografía de las microesferas preparadas en el Ejemplo Comparativo 2 (cuando se eliminó todo el disolvente de la fase continua) para el análisis de caracterización morfológica, y se confirmó mediante el microscopio electrónico de barrido que la forma de las partículas de las microesferas cambiaba.
- FIG. 1d es una fotografía de las microesferas preparadas en el Ejemplo 5 (cuando el disolvente de fase continua contiene una cantidad apropiada de alcohol etílico) para el análisis de caracterización morfológica usando un SEM, lo que confirma que la mayoría de las microesferas mantienen la morfología esférica completa.
- 50 FIG. 1e es una fotografía de las microesferas preparadas en el Ejemplo Comparativo 3 (cuando el disolvente de fase continua contiene 50% (v/v) o más de alcohol etílico) preparadas en el Ejemplo Comparativo 3), para el análisis de caracterización morfológica usando un SEM, que muestra que la morfología de las microesferas se deformó por la eliminación brusca del diclorometano.

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle.

La presente invención se refiere a un método para producir una microesfera mediante la preparación de una disolución de polímero biodegradable que comprende un polímero biodegradable y un disolvente orgánico como fase dispersa, preparando una emulsión que contiene un tensioactivo como fase continua, extrayendo y evaporando el disolvente orgánico de la fase dispersa en una fase continua, en el que una parte de la fase continua que comprende el disolvente orgánico extraído de la fase dispersa se elimina del sistema de emulsión, mientras se suministra una nueva disolución acuosa que contiene un tensioactivo al sistema de emulsión para reemplazar dicha fase continua eliminada, para proporcionar microesferas biodegradables que tienen una deformación reducida de las microesferas y una estabilidad de almacenamiento mejorada.

5 Como una realización de la presente invención, la presente invención se refiere a un método para preparar microesferas biodegradables, que comprende:

(a) formar una disolución de polímero biodegradable disolviendo un polímero biodegradable solo; o un polímero biodegradable y un fármaco en un disolvente orgánico;

15 (b) mezclar uniformemente la disolución de polímero biodegradable preparada en la etapa (a) en una disolución acuosa que contiene un tensioactivo, para formar una emulsión que contiene la disolución de polímero biodegradable como fase dispersa y una disolución acuosa que contiene el tensioactivo como una fase continua;

(c) extraer y evaporar el disolvente orgánico de la fase dispersa en la emulsión de la etapa (b) a la fase continua para producir microesferas, en el que se elimina una parte de la fase continua que contiene el disolvente orgánico extraído, mientras que se suministra una nueva fase continua; y

20 (d) recuperar las microesferas de la fase continua que contiene las microesferas producidas en la etapa (c), en el que la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua o continua, y (i) cuando la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua, la fase continua eliminada es una relación de volumen de 40% (v/v) a 99% (v/v), basado en el volumen total de la fase continua, o es una relación en peso de una fase continua restante, excepto la relación en peso puntual de la fase continua de la micropartícula en la etapa

25 (c), o (ii) cuando la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma continua, la tasa de eliminación de la fase continua está en el intervalo de 2% (v/v) a 200% (v/v)/min, basado en el volumen total de la fase continua.

A continuación, se describirá en detalle un método para producir las microesferas de polímero biodegradable de la presente invención.

30 Como se usa aquí, la expresión "método de extracción y evaporación con disolvente" se refiere a un método en el que una disolución de polímero biodegradable preparada disolviendo en un disolvente orgánico un polímero biodegradable solo, o una mezcla de un polímero biodegradable y un fármaco, se añade a una fase continua en forma de una disolución acuosa que contiene un tensioactivo, extrayendo y evaporando el disolvente orgánico de la fase dispersa de la emulsión en una fase continua para formar microesferas, y recuperando microesferas de la fase continua para producir microesferas poliméricas biodegradables.

35 El método de preparación de la presente invención comprende (a) disolver en un disolvente orgánico un polímero biodegradable solo, o una mezcla de un polímero biodegradable y un fármaco, para formar una disolución de polímero biodegradable.

40 La etapa (a) puede comprender un procedimiento de formación de una disolución de polímero biodegradable al disolver un polímero biodegradable en un disolvente orgánico para formar una disolución de polímero biodegradable, o un procedimiento de disolución de un polímero biodegradable y un fármaco simultáneamente en una mezcla de disolvente orgánico para formar una disolución de polímero biodegradable que contiene fármaco.

El peso molecular medio ponderal del polímero biodegradable no está particularmente limitado, pero el límite inferior puede ser 5.000 o más, preferiblemente 10.000 o más, y el límite superior puede ser 500.000 o menos, preferiblemente 200.000 o menos.

45 El tipo de polímero biodegradable no está particularmente limitado, pero se pueden usar preferiblemente poliésteres. En particular, el polímero biodegradable se puede seleccionar del grupo que consiste en polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), poli(lactida-co-glicolida) glucosa, policaprolactona, y mezclas de los mismos. Más preferiblemente, se pueden usar polilactida, poli(lactida-co-glicolida), y policaprolactona.

50 Cuando se usa poli(lactida-co-glicolida) como polímero biodegradable, la relación molar de ácido láctico a ácido glicólico (ácido láctico:ácido glicólico) en el copolímero puede ser de 99:1 a 50:50, preferiblemente 50:50, 75:25, u 85:15. Los ejemplos de polímeros biodegradables comercialmente disponibles que se pueden usar en la presente invención incluyen la serie Resomer de Evonik, por ejemplo RG502H, RG503H, RG504H, RG502, RG503, RG504, RG653H, RG752H, RG752S, RG755S, RG756S, RG858S, R202H, R203H, R205H, R202S, R203S and R205S, PDL 02A, PDL 02, PDL 04, PDL 05, PDLG 7502A, PDLG 7502, PDLG 7507, PDLG 5002A, PDLG 5002, PDLG 5004A,

PDLG 5004, PDLG 5010, PL 10, PL 18, PL 24, PL 32, PL 38, PDL 20, PDL 45, PC 02, PC 04, PC 12, PC 17 y PC 24 de Corbion.

En una realización específica, para preparar las microesferas según la presente invención se usaron Resomer R203H, RG502H, RG653H, RG752H, RG757S, RG858S, R202H y R205S, y Purasorb PC 04.

5 El fármaco usado en la etapa (a) no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen un agente para el tratamiento de la demencia; un agente terapéutico para la enfermedad de Parkinson; agentes anticancerígenos; antipsicóticos, tales como ansiolíticos, antidepresivos, estabilizadores nerviosos, y agentes psicotrópicos; un agente terapéutico cardiovascular, tal como un agente terapéutico para la hiperlipidemia, un agente terapéutico para la hipertensión, un agente terapéutico para la hipotensión, un agente antitrombótico, un vasodilatador, y un remedio para la arritmia; antiepilépticos; agentes terapéuticos gastrointestinales, tales como agentes antiulcerosos; un agente terapéutico para enfermedades reumáticas; antiespasmódicos; fármacos antituberculosos; relajantes musculares; un agente terapéutico para la osteoporosis; medicamentos para la disfunción eréctil; agente hematostático; hormonas, tales como hormonas sexuales y similares; agentes antidiabéticos; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes antivirales; fármacos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios; reguladores autonómicos; corticosteroides; diuréticos; analgésico; anestésico; antihistamínicos; agente antiprotozoario; antianémicos; antiasmáticos; anticonvulsivos; antídoto; agente antimigrañoso; antieméticos; fármaco antiparkinsoniano; agentes antiepilépticos; agentes antiplaquetarios; antitusivos y expectorantes; broncodilatador; cardiotónicos; inmunomoduladores; fármacos proteicos; droga genética; y una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el fármaco se puede seleccionar del grupo que consiste en el agente terapéutico para la demencia, un fármaco para la enfermedad de Parkinson, un agente anticanceroso, un fármaco antipsicótico, un agente antihiperlipidémico, un agente antihipertensivo, un agente antiepiléptico, un agente terapéutico gastrointestinal, un fármaco antirreumático, un fármaco antiespasmódico, fármacos antituberculosos, relajante muscular, un agente antiarrítmico, un agente terapéutico para la osteoporosis, un agente terapéutico para la disfunción eréctil, un agente hemostático, un agente antiviral, un agente hormonal, antibióticos, antidiabéticos, un agente antifúngico, un agente antitrombótico, un agente antipirético, analgésico y antiinflamatorio, y una mezcla de los mismos.

Los ejemplos no limitativos de los fármacos mencionados anteriormente incluyen donepezilo, memantina, rivastigmina, entecavir, lamivudina, rotigotina, ropinirol, bupivacaína, ropivacaína, meloxicam, buprenorfina, fentanilo, granisetron, triamcinolona, citarabina, carmustina, tamsulosina, polmacoxib, testosterona, estradiol, risperidona, paliperidona, olanzapina, aripiprazol, goserelina, leuprolida, triptorelina, buserelina, nafarelina, deslorelina, octreotida, pasireotida, lanreotida, vapreotida, exenatida, liraglutida, lixisenatida, semaglutida, y sales o una mezcla de los mismos.

En la etapa (a), el disolvente usado para disolver el polímero biodegradable tiene preferiblemente la propiedad de no ser miscible con agua. Debido a la propiedad de que el disolvente orgánico no es miscible con agua, la emulsión se puede formar mezclando homogéneamente la disolución de polímero biodegradable en la fase continua en la etapa (b) que se describirá más adelante. El ejemplo del disolvente para disolver el polímero biodegradable no está particularmente limitado, pero es preferiblemente uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metiletilcetona, ácido acético, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, alcohol bencílico, y una mezcla de disolventes de los mismos, más preferiblemente diclorometano, acetato de etilo, o una mezcla de disolventes de los mismos.

El método de preparación de la presente invención comprende la etapa (b) mezclar uniformemente la disolución de polímero biodegradable preparada en la etapa (a) en una disolución acuosa que contiene un tensioactivo, para formar una emulsión que contiene la disolución de polímero biodegradable como fase dispersa y una disolución acuosa que contiene el tensioactivo como una fase continua.

Para mezclar homogéneamente una disolución acuosa que contiene una disolución de polímero biodegradable y un tensioactivo en la etapa (b), se pueden usar diversos métodos de mezclamiento, y ejemplos no limitantes de los mismos son un mezclador de alta velocidad, un mezclador en línea, un método de emulsión de membrana o un método de emulsión microfluídica.

Cuando se forma una emulsión que contiene una disolución acuosa que contiene la disolución de polímero biodegradable y el tensioactivo como en la etapa (b), la disolución de polímero biodegradable se dispersa homogéneamente en la disolución acuosa para formar una fase dispersa en forma de gotitas.

Por lo tanto, la disolución acuosa que contiene el tensioactivo como fase continua usada en la etapa (b) no es miscible con el disolvente orgánico en la disolución de polímero biodegradable como fase dispersa.

El tensioactivo usado en la etapa (b) no está particularmente limitado, y se puede usar cualquier tipo de tensioactivo siempre que ayude a la disolución de polímero biodegradable a formar una fase dispersa de gotitas líquidas estables en una fase líquida continua. El tensioactivo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en metilcelulosa, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina, alcohol polivinílico, éster de ácido graso con polioxietilensorbitán, derivados de aceite de ricino polioxietilénados, y una mezcla de los mismos. Además, lo más preferible, se puede usar alcohol polivinílico.

En la etapa (b), el contenido del tensioactivo en la disolución acuosa que contiene el tensioactivo es 0,01% (p/v) a 20% (p/v), basado en el volumen total de la disolución acuosa que contiene el tensioactivo, preferiblemente 0,1% (p/v) a 5% (p/v). Si el contenido del tensioactivo es menor que 0,01% (p/v), es posible que no se forme una fase dispersa en forma de gotitas en la disolución acuosa o una emulsión. Si el contenido de tensioactivo supera el 20% (p/v), es difícil eliminar el tensioactivo después de que se hayan formado las microesferas en la disolución acuosa, debido a la cantidad excesiva del tensioactivo.

Además, en una realización preferida, la fase continua usada en la etapa (b) puede comprender además uno o más disolventes seleccionados de un grupo que consiste en alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, y acetato de etilo, para controlar la tasa de extracción del disolvente orgánico de la emulsión así como el agua y el tensioactivo. Es preferible que dicho disolvente pueda estar contenido en una cantidad de 0,1% (v/v) a 40% (v/v) en base al volumen total de la fase continua.

El método de la presente invención comprende una etapa (c) de extraer y evaporar el disolvente orgánico de la fase dispersa en la emulsión de la etapa (b) a la fase continua para producir microesferas, en el que se elimina una parte de la fase continua que contiene el disolvente orgánico extraído, mientras que se suministra a la emulsión una nueva fase continua.

En la etapa (c), cuando la emulsión que contiene la disolución de polímero biodegradable (fase dispersa) en forma de gotitas y la fase continua se mantiene o se agita a una temperatura menor que el punto de ebullición del disolvente orgánico durante un tiempo predeterminado, por ejemplo 2 a 48 horas, el disolvente orgánico se puede extraer de la disolución de polímero biodegradable en forma de gotitas (una fase dispersa) a la fase continua. Parte del disolvente orgánico extraído a la fase continua se puede evaporar de la superficie de la fase continua que contiene las microesferas producidas. A medida que el disolvente orgánico se extrae de la disolución de polímero biodegradable (fase dispersa) en forma de gotitas y se evapora, la fase dispersa en forma de gotitas se puede solidificar para formar microesferas.

En el método convencional para producir una microesfera usando un método de extracción y evaporación con disolvente, a veces se aplica calor durante mucho tiempo para eliminar suficientemente el disolvente orgánico de la fase dispersa en forma de gotitas, y el calor degrada el polímero biodegradable, reduciendo así el peso molecular del polímero biodegradable.

Sin embargo, en la presente invención, en la etapa (c), se elimina una parte de la fase continua que contiene el disolvente orgánico extraído de la fase dispersa, y se suministra a la emulsión una nueva disolución acuosa que contiene un tensioactivo que reemplaza a la fase continua eliminada, por lo que la cantidad residual del disolvente orgánico se puede minimizar de forma eficiente extrayendo suficientemente el disolvente orgánico en una fase continua y evaporando.

La presente invención se caracteriza por que solo se elimina una parte de la fase continua y se suministra a la emulsión una nueva disolución acuosa que comprende un tensioactivo, de modo que el procedimiento de extracción con disolvente de la fase dispersa se puede llevar a cabo de forma continua. Preferiblemente, el tiempo de intercambio para la fase continua es superior a 5 minutos, más preferiblemente 10 minutos a 60 minutos desde el momento en que la superficie de las microesferas comienza a endurecerse. Cuando la fase continua se intercambia más rápido que el tiempo anterior, las microesferas no pueden mantener la forma esférica y pueden deformarse.

Cuando la fase continua se elimina de forma discontinua, es que se elimina del sistema de emulsión (i) 40% (v/v) a 99% (v/v) de la fase continua, o (ii) el resto de la fase continua excepto una (1) vez del peso de las microesferas. Si la fase continua se elimina más allá del intervalo anterior (por ejemplo, la cantidad eliminada es menor que 99% (v/v), o la mitad (0,5) del peso de la microesfera), la forma de las microesferas producidas puede deformarse. Además, cuando se elimina el 35% (v/v) o menos de la fase continua del 35% (v/v) o menos, la eliminación del disolvente orgánico puede no ser eficaz.

Al eliminar una parte de la fase continua, las microesferas inicialmente formadas como fase dispersa pueden retenerse usando un filtro o similar, y solo una parte de la fase continua puede eliminarse usando una bomba peristáltica o similar.

Como otro método para la etapa (c), puede usarse un método de suministro continuo de una disolución acuosa reciente que comprende un tensioactivo, mientras se elimina simultáneamente una parte de la fase continua.

En la eliminación de la fase continua, se elimina a una tasa del 2% (v/v) al 200% (v/v) con respecto al volumen total de la fase continua por minuto.

La disolución acuosa que contiene el tensioactivo como una nueva fase continua que se suministra adicionalmente en la etapa (c) puede comprender agua o un disolvente mixto que comprende (i) agua y (ii) uno o más seleccionados del grupo que consiste en alcoholes alifáticos que tienen 1 a 4 átomos de carbono (preferiblemente, alcohol metílico, alcohol etílico, o alcohol propílico) y acetato de etilo, en una cantidad predeterminada. Además, es preferible que el disolvente mixto esté contenido en una cantidad de 0,1% (v/v) a 40% (v/v) en base al volumen total de la fase continua que se va a añadir de nuevo.

Mediante la eliminación continua del disolvente orgánico extraído por el método de sustitución de fase continua de la etapa (c) de la presente invención, el disolvente orgánico puede extraerse eficazmente, y el disolvente residual puede minimizarse.

5 Para eliminar más eficientemente el disolvente orgánico en la etapa (c) de la presente invención, se puede aplicar calor durante un cierto período de tiempo para mantener constante la temperatura de la fase continua.

El método de la presente invención comprende la etapa (d) de recuperar las microesferas de la emulsión preparada en dicha etapa (c). Se pueden usar diversas técnicas conocidas para recuperar las microesferas, tales como filtración o centrifugación.

10 En el método de la presente invención, el tensioactivo residual puede eliminarse mediante filtración y lavado entre la etapa (c) y la etapa (d), y las microesferas pueden recuperarse mediante filtración adicional.

La etapa de lavado para eliminar el tensioactivo residual normalmente se puede llevar a cabo usando agua, y la etapa de lavado se puede repetir varias veces.

15 En el método de la presente invención, después de la etapa (d), o después de la etapa de filtración y lavado anterior, las microesferas obtenidas pueden secarse usando un método de secado convencional para obtener finalmente microesferas secas.

Preferiblemente, en el método de la presente invención, las microesferas obtenidas pueden suspenderse en una suspensión después de la etapa (d), o después de la etapa de filtración y lavado entre las etapas (c) y (d), y posteriormente pueden introducirse en un recipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo jeringa desechable o similar, para obtener un producto final.

20 El método descrito anteriormente permite eliminar eficazmente el disolvente residual en las microesferas biodegradables, minimizar la reducción del peso molecular debido a la hidrólisis del polímero biodegradable en la microesfera, y proporcionar microesferas de polímero biodegradable que tienen una seguridad y una estabilidad de almacenamiento excelentes.

25 Preferiblemente, cuando las micropartículas se producen mediante el método según la presente invención, el contenido de disolvente residual en las micropartículas secas después de la producción es 1000 ppm o menos, más preferiblemente 600 ppm o menos.

[MODO PARA LA INVENCION]

Ejemplo 1: Producción de microesferas preparadas mediante diferentes tiempos de intercambio de fase continua

30 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida) Mw: 18000 a 28000) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se disolvieron en 9,2 g de diclorometano (JT Baker, USA) para preparar una fase dispersa. La fase dispersa se preparó agitando durante 30 minutos o más para una disolución suficiente, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

40 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 15 minutos. Se retiraron 455 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de la fase continua (la misma cantidad de peso total del polímero biodegradable y base de donepezilo usada en la preparación de la fase dispersa). Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 1-1: Producción de microesferas preparadas mediante diferentes tiempos de intercambio de fase continua

50 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se disolvieron en 9,2 g de diclorometano (JT Baker, USA) para preparar una fase dispersa. La fase dispersa se preparó agitando durante 30 minutos o más para una disolución suficiente, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó

simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

5 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se retiraron 455 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de la fase continua (la misma cantidad de peso total del polímero biodegradable y base de donepezilo usada en la preparación de la fase dispersa). Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 1-2: Producción de microesferas preparadas mediante diferentes tiempos de intercambio de fase continua

15 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron en 9,2 g de diclorometano (JT Baker, USA) para preparar una fase dispersa. La fase dispersa se preparó agitando durante 30 minutos o más para una disolución suficiente, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

20 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 60 minutos. Se retiraron 455 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de la fase continua (la misma cantidad de peso total del polímero biodegradable y base de donepezilo usada en la preparación de la fase dispersa). Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 2: Producción de microesferas preparadas mediante diferentes cantidades de intercambio de fase continua

30 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se disolvieron en 9,2 g de diclorometano (JT Baker, USA). La fase dispersa se preparó agitando durante 30 minutos o más para una disolución suficiente, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

40 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 230 ml de la fase continua (50% del volumen total de la fase continua), y se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato en la misma cantidad que la fase continua retirada (230 ml). El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 3 Preparación de microesferas usando acetato de etilo

50 La fase dispersa se preparó mezclando 3,5 g de un polímero biocompatible, Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) con 10,5 g de acetato de etilo (Sigma Aldrich, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 530 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 20 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 300 rpm.

55 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 525 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de la fase continua. Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3

horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 4: Producción de microesferas usando RG502H

5 La fase dispersa se preparó mezclando 3,5 g de un polímero biocompatible, Resomer RG502H (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida-co-glicolida) 50:50; Mw: 7.000 a 17.000) y una base de donepezilo (fabricada por Neuland Laboratories, India) con 7,8 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 1750 ml de la fase continua en el
10 vasija de preparación, y se agitó con un mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK) a 3000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 7 ml por minuto.

15 Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la suspensión en el vasija de preparación se mantuvo a 25°C durante 30 minutos mientras se agitaba a 200 rpm. Se eliminaron 1745 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de fase continua. Después, se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua al vasija de preparación. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 4-1: Preparación de microesferas usando RG653H

20 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer RG653H (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida-co-glicolida) 65:35; Mw: 24.000 a 38.000) y 1,5 g de una base de donepezilo (fabricado por Neuland Laboratories, India) se disolvieron en 17,5 g de diclorometano (JT Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se agitó durante 30 minutos o más para una disolución suficiente, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 2% (p/v) (viscosidad: 4,8 a 5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 880 ml
25 de la fase continua a un aparato de emulsionamiento equipado con una membrana que tenía poros de 30 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 180 rpm.

30 La temperatura del aparato de emulsionamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 875 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de fase continua. Después, se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua al vasija de preparación. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de
35 microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 4-2: Preparación de microesferas usando polímero RG752H

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer RG752H (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida-co-glicolida) 75:25; Mw: 4.000 a 15.000) y 1,5 g de una base de donepezilo (fabricado por Neuland Laboratories, India) se
40 mezclaron con 10,0 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 500 ml de la fase continua en el vasija de preparación, y se agitó con un mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK) a 3000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 15 ml por minuto.

45 Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la suspensión en el vasija de preparación se mantuvo a 25°C durante 30 minutos mientras se agitaba a 200 rpm. Se eliminaron 495 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de fase continua. Después, se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua al vasija de preparación. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico
50 residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 4-3: Preparación de microesferas usando RG757S

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer RG757S (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida-co-glicolida) 75:25; Mw: 110.000 a 180.000) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricado por Neuland Laboratories, India) se
55 mezclaron con 26,9 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 4% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 1400 ml de la fase continua

en el vasija de preparación equipada con un mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 5000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto.

5 Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la suspensión en el vasija de preparación se mantuvo a 25°C durante 30 minutos mientras se agitaba a 150 rpm. Se eliminaron 1395 ml de la fase continua, al tiempo que quedaban 5 ml de fase continua. Después, se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua al vasija de preparación. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

10 **Ejemplo 4-4: Preparación de microesferas usando RG858S**

15 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer RG858S (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida-co-glicolida) 85:15; Mw: 190.000 a 240.000) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricado por Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 38,9 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 2,5% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua.

Se conectó un recipiente que incluía 2000 ml de la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana que tenía poros de 20 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 250 rpm.

20 La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 1995 ml de la fase continua, al tiempo que quedaron 5 ml de la fase continua. Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C.

25 La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 4-5: Preparación de microesferas usando R202H

30 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R202H (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida) Mw: 10.000 a 18.000) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricado por Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 7,8 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 2,5% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua.

35 Se conectó un recipiente que incluía 390 ml de la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana que tenía poros de 50 µm de diámetro, mientras que la fase dispersa anterior se inyectó simultáneamente en el aparato para producir la suspensión de microesferas. Después, la suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 250 rpm.

40 La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 385 ml de la fase continua, al tiempo que quedaron 5 ml de la fase continua. Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 4-6: Preparación de microesferas usando R205S

45 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R205S (fabricante: Evonik, Alemania; poli(D,L-lactida) Mw: 58000 a 89000) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se disolvieron en 17,5 g de diclorometano (fabricado por JT Baker, USA) para formar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Como fase continua, se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s), y se conectó un recipiente que contenía 880 ml de la fase continua a un

50 aparato de emulsión equipado con una membrana de 40 µm de diámetro de poros, mientras se inyecta la fase dispersa para formar la suspensión de las microesferas. La suspensión de las microesferas se colocó en un vasija de preparación y se agitó a 100 rpm.

55 La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 875 ml de la fase continua, al tiempo que quedaron 5 ml de la fase continua. Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3

horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 4-7: Producción de microesferas usando PC04

5 La fase dispersa se preparó mezclando 5 g de un polímero biocompatible, Purasorb PC04 (fabricante: Corbion, Países Bajos; policaprolactona; Mw: 28000 a 38000) con 20,0 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más antes del uso. La fase continua fue una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s), y se conectó un recipiente que contenía 700 ml de la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana de 40 µm de diámetro de poros, mientras se inyecta simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

10 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C, y la agitación se mantuvo durante 30 minutos. Se eliminaron 455 ml de la fase continua, al tiempo que quedaron 695 ml de la fase continua. Después, se añadió una nueva disolución de fase continua al aparato, en la misma cantidad que la fase continua eliminada. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas resultantes se liofilizaron.

Ejemplo 5 Preparación de microesferas usando fase continua que comprende alcohol etílico

20 La fase dispersa se preparó mezclando 3,5 g de un polímero biocompatible, Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. La fase continua fue una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) y alcohol etílico al 30% (v/v). Se conectó un recipiente que incluía la fase continua a un aparato de emulsiónamiento equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 200 rpm.

25 La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminaron 455 ml de la fase continua remanente, al tiempo que se dejaron 5 ml de fase continua, y se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

35 Ejemplo 6: Preparación de microesferas con un procedimiento para añadir y eliminar continuamente una fase continua

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 460 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con un mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 2000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto. La temperatura del aparato de emulsiónamiento de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la fase continua se eliminó a un caudal de 13,8 ml por minuto (3% del volumen total de la fase continua), mientras se inyectaba una nueva fase continua a la misma velocidad de eliminación durante 1 hora. Después, la temperatura del aparato se mantuvo a 45°C durante 3 horas. Cuando se completó la eliminación del disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

50 Ejemplo 6-1: Preparación de microesferas con un procedimiento de añadir y eliminar continuamente una fase continua

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para preparar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 460 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 2000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto y se mantenía la temperatura de la vasija de preparación a 25°C. Cuando se completó la inyección de la

fase dispersa, la fase continua se eliminó a un caudal de 27,6 ml por minuto (6% del volumen total de la fase continua), mientras se inyectaba una nueva fase continua a la misma velocidad de eliminación durante 1 hora. Después, la temperatura de la vasija de preparación se mantuvo a 45°C durante 3 horas. Cuando se completó la eliminación del disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 6-2: Preparación de microesferas que comprende además una etapa de añadir y eliminar continuamente una fase continua

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para formar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 460 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 2000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto y se mantenía la temperatura de la vasija de preparación a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la fase continua se eliminó a un caudal de 26,7 ml por minuto (6% del volumen total de la fase continua), mientras se inyectaba una nueva fase continua a la misma velocidad de eliminación durante 0,5 hora. Después, la temperatura de la vasija de preparación se mantuvo a 45°C durante 3 horas. Cuando se completó la eliminación del disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 6-3: Preparación de microesferas con una etapa de añadir y eliminar continuamente una fase continua

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para formar la fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 460 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 2000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto y se mantenía la temperatura de la vasija de preparación a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la fase continua se eliminó a un caudal de 920 ml por minuto (200% del volumen total de la fase continua), mientras se inyectaba una nueva fase continua a la misma velocidad de eliminación durante 10 minutos. Después, la temperatura de la vasija de preparación se mantuvo a 45°C durante 3 horas. Cuando se completó la eliminación del disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión que comprende microesfera se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 7: Preparación de microesferas que comprenden rivastigmina

La fase dispersa se preparó mezclando 4,0 g de un polímero biocompatible, Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,0 g de base de rivastigmina (fabricante: Hwail Pharmaceutical Co., Ltd., Corea) con 10,0 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. La fase continua fue una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa s). Se conectó un recipiente que incluía 500 ml de la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana que tenía poros de 30 µm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 200 rpm.

La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminaron 495 ml de la fase continua, al tiempo que se dejaron 5 ml de fase continua, y se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo 7-1: Fabricación de microesferas de deslorelinea

4,4 g de Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 0,6 g de acetato de deslorelinea (fabricante: Chengdu Kaijie Biopharm, China) se mezclaron con 15,7 g de diclorometano (fabricante: JT Baker, EE. UU.) y 7,5 g de alcohol metílico (fabricado por Sigma Aldrich, EE. UU.) para formar una fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

La fase continua fue una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s). Se conectó un recipiente que incluía 790 ml de la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana

que tenía poros de 30 μm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión a un caudal de 5 ml por minuto. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 180 rpm.

- 5 La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminaron 785 ml de la fase continua, al tiempo que se dejaron 5 ml de fase continua, y se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.
- 10

Ejemplo 7-2: Preparación de una microesfera de bupivacaína

- 15 La fase dispersa se preparó mezclando 4,5 g de Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania), un polímero biocompatible, y 0,5 g de una base de bupivacaína (fabricante: Dishman, India) en 12 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

- 20 Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 600 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 4000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 12 ml por minuto y se mantenía la temperatura de la vasija de preparación a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la suspensión en el vasija de preparación se mantuvo en agitación a 25°C durante 30 minutos.

- 25 Se eliminaron 595 ml de la fase continua, al tiempo que se dejaron 5 ml de fase continua, y se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo Comparativo 1: Producción de microesferas preparadas usando diferentes tiempos de intercambio de fase continua

- 30 La fase dispersa se preparó mezclando 3,5 g de un polímero biocompatible, Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

- 35 Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsión de membrana que tenía poros de 40 μm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

- 40 La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 5 minutos. En esta etapa, se eliminaron 455 ml de la fase continua, al tiempo que se dejaron 5 ml de fase continua, y se añadió la misma cantidad de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

- 45 **Ejemplo Comparativo 2: Producción de microesferas usando diferentes cantidades de intercambio de fase continua**

- 3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para preparar una fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

- 50 Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsión de membrana que tenía poros de 40 μm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminó toda la fase continua, y había 2,5 ml de fase continua (50% (v/v) de la microesfera) en la microesfera (es decir, la microesfera existe en forma hidratada con la fase continua), mientras que se añadieron 460 ml de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo Comparativo 2-1: Producción de microesferas usando diferentes cantidades de intercambio de fase continua

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para formar una fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó. Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía 460 ml de la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 150 rpm.

La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminaron 161 ml (35% (v/v) del volumen total de la fase continua) de la fase continua, mientras se añadían 460 ml de nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo Comparativo 3: Preparación de microesferas usando una fase continua en la que se mezcló alcohol etílico

3,5 g de un polímero biocompatible Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) se mezclaron con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.) para formar una fase dispersa. La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

Se usó una disolución acuosa que comprende alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) y alcohol etílico al 50% (v/v) como fase continua. Se conectó un recipiente que incluía la fase continua a un aparato de emulsión equipado con una membrana que tenía poros de 40 µm de diámetro, mientras se inyectaba simultáneamente la fase dispersa preparada para producir las microesferas en suspensión. La suspensión de microesferas resultante se colocó en una vasija de preparación, y se agitó a 200 rpm.

La temperatura del aparato de emulsión de membrana y de la vasija de preparación se mantuvo a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la agitación se mantuvo durante 30 minutos. En esta etapa, se eliminaron 455 ml de la fase continua, mientras se añadía la misma cantidad de una nueva disolución de fase continua. El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 40°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

Ejemplo Comparativo 4: Preparación de microesferas con un procedimiento de añadir y eliminar continuamente una fase continua

La fase dispersa se preparó mezclando 3,5 g de un polímero biocompatible, Resomer R203H (fabricante: Evonik, Alemania) y 1,5 g de base de donepezilo (fabricante: Neuland Laboratories, India) con 9,2 g de diclorometano (fabricante: J.T Baker, EE. UU.). La fase dispersa se disolvió suficientemente agitando durante 30 minutos o más, y entonces se usó.

Se usó una disolución acuosa de alcohol polivinílico al 1% (p/v) (viscosidad: 4,8-5,8 mPa·s) como fase continua. Se vertieron 460 ml de la fase continua en el vasija de preparación equipada con mezclador de alta velocidad (L4RT, Silverson, UK), y se agitó a 2000 rpm, mientras se inyectaba la fase dispersa a un caudal de 10 ml por minuto y se mantenía la temperatura de la vasija de preparación a 25°C. Cuando se completó la inyección de la fase dispersa, la fase continua se eliminó de la emulsión a un caudal de 4,6 ml por minuto (1% (v/v) del volumen total de la fase continua), mientras se añadía una nueva fase continua a la vasija de preparación al mismo caudal de la eliminación de la fase continua durante 1 hora.

El disolvente orgánico se eliminó mientras que se mantiene la temperatura a 45°C durante 3 horas. Después de eliminar el disolvente orgánico, la temperatura de la suspensión de microesferas se redujo a 25°C. La suspensión de microesferas se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el alcohol polivinílico residual, y las microesferas se liofilizaron.

5 Ejemplo Experimental 1: Análisis morfológico de microesferas por microscopio electrónico

Este ensayo se realizó para analizar las características morfológicas de las microesferas preparadas, y el procedimiento experimental detallado es el siguiente. Se colocaron 5 mg de microesferas en un trozo de aluminio con una cinta de carbón, y se recubrieron con platino usando ION-COATER (COXEM, Corea). El trozo de aluminio se montó en un microscopio electrónico de barrido (COXEM EM-30, Corea), y se observaron las características morfológicas a un voltaje de aceleración de 15 kV.

Como se muestra en la FIG. 1A y FIG. 1B, en el Ejemplo Comparativo 1, el tiempo de intercambio de fase continua fue más rápido que el tiempo de endurecimiento de la superficie de las microesferas, y las microesferas se deformaron sin mantener la forma esférica, mientras que en el Ejemplo 1-1, la mayoría de las microesferas eran completamente esféricas. Por lo tanto, se considera que la fase continua debe reemplazarse después de más de 5 minutos, apropiadamente después de que la superficie esté curada.

Como se puede ver en la FIG. 1 (c), se confirmó que la deformación de la forma de las partículas podría ocurrir durante el procedimiento continuo de intercambio de fase cuando se eliminaron todas las fases continuas. En consecuencia, se confirmó que la forma de las partículas se conservaba eliminando una cierta cantidad de la fase continua, como en el Ejemplo 1-1, en lugar de eliminar toda la fase continua.

Como se muestra en la FIG. 1d y la FIG. 1e, en el caso en el que la fase continua contenía alcohol etílico, en particular, en el Ejemplo 5, se predijo que el alcohol etílico aumentaba la solubilidad del diclorometano para facilitar la eliminación. Por otro lado, en el Ejemplo Comparativo 3, se confirmó que cuando se añadía 50% (v/v) o más de alcohol etílico a la fase continua, la eliminación rápida del diclorometano daba como resultado la deformación de las microesferas.

Ejemplo Experimental 2: Análisis de disolvente orgánico residual

Se llevó a cabo el siguiente ensayo para confirmar la estabilidad y la estabilidad de almacenamiento de las microesferas midiendo la cantidad de disolvente residual en las microesferas preparadas mediante liofilización.

Para la determinación del diclorometano residual y acetato de etilo, se colocan 100 mg de microesferas liofilizadas en un matraz volumétrico, y se añaden 10 ml de dimetilformamida. La disolución se diluye, se transfiere a un vial de 5 ml, y se coloca en un cromatógrafo de gases equipado con un muestreador de espacio de cabeza. Y se midió el disolvente residual. La columna usada fue DB-624 (fabricada por Agilent, EE.UU.) (30 m x 0,53 mm, 3 µm), la cantidad de inyección de muestra fue 1 µl, y la temperatura del detector de ionización de llama se fijó en 250°C.

Para medir el alcohol metílico residual, se colocaron 100 mg de microesferas liofilizadas en un matraz volumétrico, se añadieron 5 ml de N-metilpirrolidona, y la disolución resultante se diluyó y se transfirió a un vial de 5 ml. El disolvente residual se midió con un cromatógrafo de gases equipado con un muestreador de espacio de cabeza. La columna usada fue DB-624 (fabricada por Agilent, EE.UU.) (30 m x 0,53 mm, 3 µm), la cantidad de inyección de muestra fue 1 µl, y la temperatura del detector de ionización de llama se fijó en 250°C.

Para medir el alcohol etílico residual, se colocan 100 mg de microesferas liofilizadas en un matraz volumétrico, se le añaden 5 ml de N-metilpirrolidona, y la disolución resultante se diluye y se transfiere a un vial de 5 ml. El disolvente residual se midió con un cromatógrafo de gases equipado con un muestreador de espacio de cabeza. La columna fue DB-624 (fabricada por Agilent, EE.UU.) (30 m x 0,53 mm, 3 µm), la cantidad de inyección de muestra fue 1 µl, y la temperatura del detector de ionización de llama se fijó en 240°C.

[Tabla 1]

	Diclorometano (ppm)	Acetato de etilo (ppm)	Alcohol etílico (ppm)	Alcohol metílico (ppm)
Ejemplo 1	508	-	-	-
Ejemplo 1-1	170	-	-	-
Ejemplo 1-2	161	-	-	-
Ejemplo 2	362	-	-	-
Ejemplo 3	-	106	-	-
Ejemplo 4	192	-	-	-

ES 2 915 502 T3

	Diclorometano (ppm)	Acetato de etilo (ppm)	Alcohol etílico (ppm)	Alcohol metílico (ppm)
Ejemplo 4-1	196	-	-	-
Ejemplo 4-2	169	-	-	-
Ejemplo 4-3	232	-	-	-
Ejemplo 4-4	316	-	-	-
Ejemplo 4-5	192	-	-	-
Ejemplo 4-6	222	-	-	-
Ejemplo 4-7	< 10	-	-	-
Ejemplo 5	163	-	65	-
Ejemplo 6	229	-	-	-
Ejemplo 6-1	183	-	-	-
Ejemplo 6-2	201	-	-	-
Ejemplo 6-3	216	-	-	-
Ejemplo 7	223	-	-	-
Ejemplo 7-1	218	-	-	173
Ejemplo 7-2	210	-	-	-
Ejemplo Comparativo 1	1210	-	-	-
Ejemplo Comparativo 2	195	-	-	-
Ejemplo Comparativo 2-1	1642	-	-	-
Ejemplo Comparativo 3	151	-	32	-
Ejemplo Comparativo 4	1745	-	-	-

Como se muestra en la Tabla 1, el Ejemplo 1, el Ejemplo 1-1 y el Ejemplo Comparativo 1 muestran el cambio en la cantidad de diclorometano residual dependiendo del tiempo de intercambio de fase continua; y después de 15 minutos del tiempo de intercambio de fase continua, la cantidad de diclorometano residual es 600 ppm o menos.

- 5 Como puede verse a partir de los resultados del Ejemplo 1-1, Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 2, se confirmó que cuando la fase continua se intercambió de forma discontinua, el disolvente residual disminuyó en proporción a la cantidad de la eliminación de la fase continua. Sin embargo, como puede verse a partir del resultado del Ejemplo Comparativo 2, en el que se eliminan todas las fases continuas, las microesferas se deformaron morfológicamente al aplicar presión a las microesferas. Además, como en el Ejemplo Comparativo 2-1, en el que el volumen de fase continua a intercambiar no fue suficiente, el diclorometano no se eliminó de forma eficaz, y quedó una gran cantidad de diclorometano. Es preferible mantener la cantidad residual de diclorometano en las microesferas a 1000 ppm o menos para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento. Preferiblemente, el diclorometano residual se mantiene a 600 ppm o menos.

- 15 Se ha encontrado que cuando se usa una fase continua que comprende alcohol etílico como el Ejemplo 5 y el Ejemplo Comparativo 3, se facilita la eliminación del diclorometano residual. Como se muestra en la Tabla 1, Ejemplo 6, Ejemplo 6-1, Ejemplo 6-2, Ejemplo 6-3, en los que la fase continua se añadió y eliminó continuamente, el diclorometano residual se redujo durante un período corto de tiempo, y parecía ser ventajoso para la eliminación del diclorometano residual. Sin embargo, se confirmó que cuando la cantidad de la fase continua a intercambiar fue menor que 1% (v/v) de la fase continua total como en el Ejemplo Comparativo 4, no era eficaz para eliminar el diclorometano.

- 20 Como se muestra en la Tabla 1, se confirmó que los disolventes residuales se eliminaron de manera eficiente incluso cuando se usaron disolventes orgánicos distintos al diclorometano como Ejemplo 3, Ejemplo 5, Ejemplo 7-1, y Ejemplo Comparativo 3.

Ejemplo Experimental 3: Análisis de estabilidad de almacenamiento acelerado de microesferas de la presente invención

Para confirmar la estabilidad de almacenamiento de las microesferas preparadas comparando el comportamiento de las microesferas almacenadas en las duras condiciones de almacenamiento, se realizaron los siguientes ensayos.

- 5 Cada 1 g de las microesferas del Ejemplo 1-1 de acuerdo con la presente invención y las microesferas del Ejemplo Comparativo 1 se colocaron en viales de 5 ml y se almacenaron en una incubadora a 40°C durante 14 días, y entonces se midió el tamaño de partícula promedio con un analizador de tamaño de partículas (Microtrac Bluewave, Japón). Se mezclaron 50 mg de las microesferas sacadas de la incubadora con 1 ml de agua desionizada, se mezcló con un mezclador de vórtice durante 20 segundos, y se dispersó en un generador ultrasónico durante 1 minuto. La dispersión de microesferas resultante se colocó en un analizador de tamaño de partículas, y se midió durante 20 segundos.

El valor de amplitud como índice de la uniformidad del tamaño de partícula se obtuvo mediante la siguiente ecuación (1).

[Ecuación 1]

$$\text{Valor de amplitud} = (Dv, 0.9 - Dv, 0.1) / Dv, 0.5$$

[Tabla 2]

	Tamaño medio de partícula antes del almacenamiento	Tamaño medio de partícula después del almacenamiento (Temperatura de almacenamiento: 40°C) (Período de almacenamiento: 14 días)
Ejemplo 1-1	Dv0.5 = 81,5 µm Valor de amplitud = 0,63	Dv0.5 = 86,3 µm Valor de amplitud = 0,65
Ejemplo Comparativo 1	Dv0.5 = 79,6 µm Valor de amplitud = 0,60	Dv0.5 = 381 µm Valor de amplitud = 1,72

- 15 Como se muestra en la Tabla 2, se confirmó que el tamaño de partícula del Ejemplo 1-1 mantenía un nivel similar de tamaño de partícula después del almacenamiento a 40°C.

- 20 Por otro lado, las microesferas del Ejemplo Comparativo 1 se curaron a una temperatura de almacenamiento de 40°C, y todas las microesferas apenas se endurecieron en su conjunto. Después de medir el tamaño de partícula de las microesferas suspendidas, se confirma que el tamaño medio de partícula de las microesferas aumentó significativamente. Como resultado, se considera que el diclorometano residual en las microesferas del Ejemplo 1-1 y el Ejemplo Comparativo 1 es una causa del deterioro de la estabilidad al almacenamiento de las microesferas.

- 25 Además, el valor de amplitud del Ejemplo 1-1 después del almacenamiento, en el que el disolvente residual se eliminó de manera eficiente, mostró un aumento de solo 3% en comparación con el anterior al almacenamiento, mientras que en el Ejemplo Comparativo 1, en el que la eliminación del disolvente residual no fue eficiente, el valor de amplitud muestra un aumento del 286% en comparación con los anteriores al almacenamiento. De este modo, se consideró que el disolvente residual había afectado negativamente a las características morfológicas de las microesferas. Por lo tanto, la microesfera con estabilidad de almacenamiento de la presente invención muestra 100% o menos de cambio del valor de intervalo basado en el valor de intervalo inicial, preferiblemente 50%, a una temperatura de almacenamiento de 40°C durante 14 días.

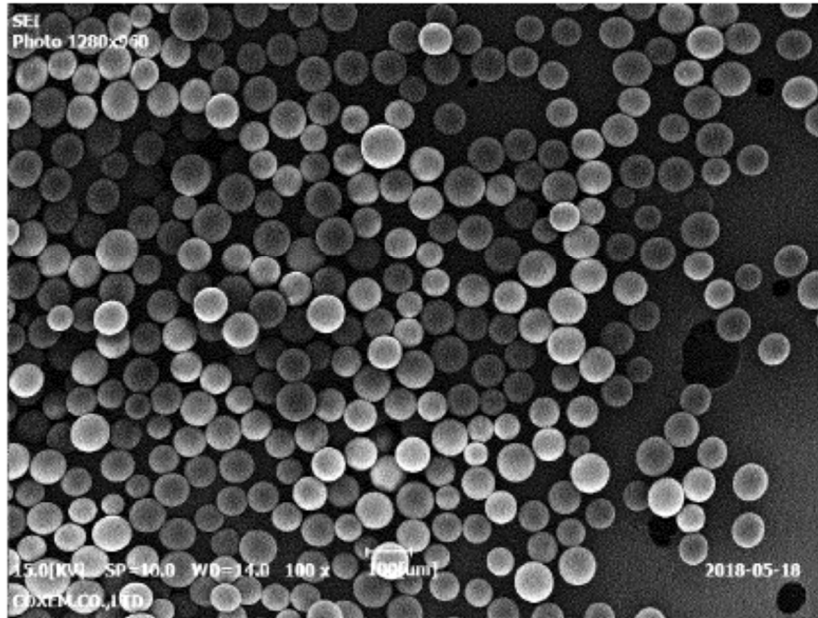
- 30

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar microesferas biodegradables, que comprende:
 - (a) formar una disolución de polímero biodegradable disolviendo un polímero biodegradable solo; o un polímero biodegradable y un fármaco en un disolvente orgánico;
 - 5 (b) mezclar uniformemente la disolución de polímero biodegradable preparada en la etapa (a) con una disolución acuosa que contiene un tensioactivo, para formar una emulsión que contiene la disolución de polímero biodegradable como fase dispersa y una disolución acuosa que contiene el tensioactivo como una fase continua;
 - 10 (c) extraer y evaporar el disolvente orgánico de la fase dispersa en la emulsión de la etapa (b) a la fase continua para producir microesferas, en el que se elimina una parte de la fase continua que contiene el disolvente orgánico extraído, mientras que se suministra una nueva fase continua; y
 - (d) recuperar las microesferas de la fase continua que contiene las microesferas producidas de la etapa (c), en el que la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua o continua, y
 - 15 (i) cuando la parte de la fase continua en la etapa (c) se elimina de forma discontinua, la fase continua eliminada es una relación de volumen de 40% (v/v) a 99% (v/v), basada en el volumen total de la fase continua, o es una relación en peso de una fase continua restante, excepto la relación en peso puntual de la fase continua de la micropartícula en la etapa (c), o
 - (ii) cuando se elimina continuamente la parte de la fase continua en la etapa (c), la tasa de eliminación de la fase continua está en el intervalo de 2% (v/v) a 200% (v/v)/min, basado en el volumen total de la fase continua.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el polímero biodegradable es uno o más seleccionados del grupo que consiste en polilactida, poliglicolida, poli(lactida-co-glicolida), poli(lactida-co-glicolida) glucosa, y policaprolactona.
3. El método de la reivindicación 2, en el que la relación molar de ácido láctico a ácido glicólico en la poli(lactida-co-glicolida) es 99:1 a 50:50.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el disolvente orgánico es uno o más seleccionados del grupo que consiste en diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metiletilcetona, ácido acético, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, y una mezcla de los mismos.
- 25 5. El método según la reivindicación 1, en el que la disolución acuosa que contiene el tensioactivo de la etapa (b) comprende
 - (i) agua, o un disolvente mixto que comprende agua y uno o más disolventes orgánicos seleccionados del grupo que consiste en alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, y acetato de etilo como disolvente; y
 - 30 (ii) un tensioactivo.
6. El método según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo en la etapa (b) es uno o más seleccionados del grupo que consiste en metilcelulosa, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina, alcohol polivinílico, éster de ácido graso con polioxietilensorbitán, derivados de aceite de ricino polioxietilenados, y una mezcla de los mismos.
- 35 7. El método según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo de la etapa (b) está en una cantidad de 0,01% (p/v) a 20% (p/v), basado en el volumen total de la disolución acuosa que contiene el tensioactivo.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la nueva disolución acuosa que contiene un tensioactivo en la etapa (c) se suministra de forma discontinua o continua.
9. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de eliminar una parte de la fase continua en la etapa (c) y suministrar una nueva disolución acuosa que contiene un tensioactivo comienza 10 a 60 minutos a partir del inicio del endurecimiento de la superficie de la microesfera.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que la nueva disolución acuosa que comprende el tensioactivo de la etapa (c) comprende
 - (i) agua, o un disolvente mixto que comprende agua y uno o más disolventes orgánicos seleccionados de un grupo que consiste en alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol propílico, y acetato de etilo como disolvente; y
 - 45 (ii) un tensioactivo.
11. El método de la reivindicación 1, en el que la eliminación de la fase continua y el suministro de una nueva disolución acuosa que contiene tensioactivo en la etapa (c) proceden de forma simultánea o asíncrona.

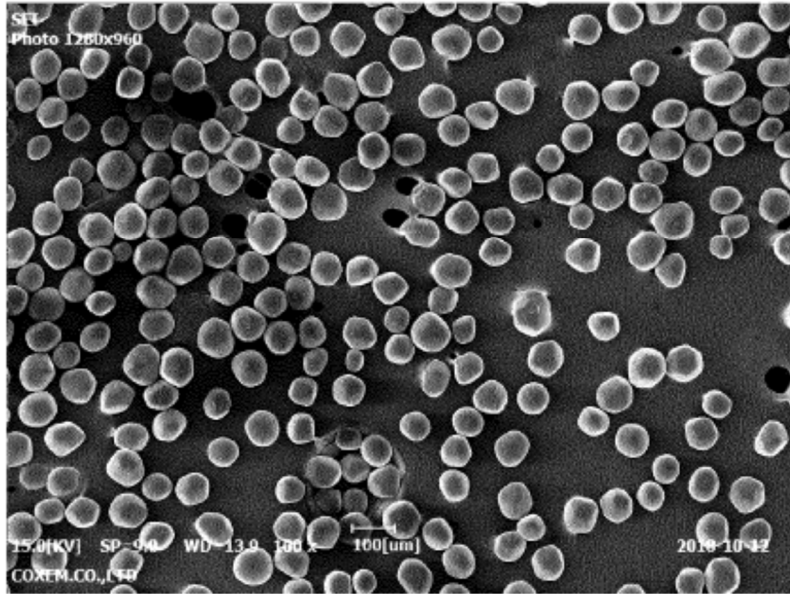
- 5 12. El método de la reivindicación 1, en el que el fármaco se selecciona del grupo que consiste en donepezilo, memantina, rivastigmina, entecavir, lamivudina, rotigotina, ropinirol, bupivacaína, ropivacaína, meloxicam, buprenorfina, fentanilo, granisetron, triamcinolona, citarabina, carmustina, tamsulosina, polmacoxib, testosterona, estradiol, risperidona, paliperidona, olanzapina, aripiprazol, goserelina, leuprolida, triptorelina, buserelina, nafarelina, deslorelina, octreotida, pasireotida, lanreotida, vapreotida, exenatida, liraglutida, lixisenatida, semaglutida, y sales de los mismos.

[Fig. 1a]



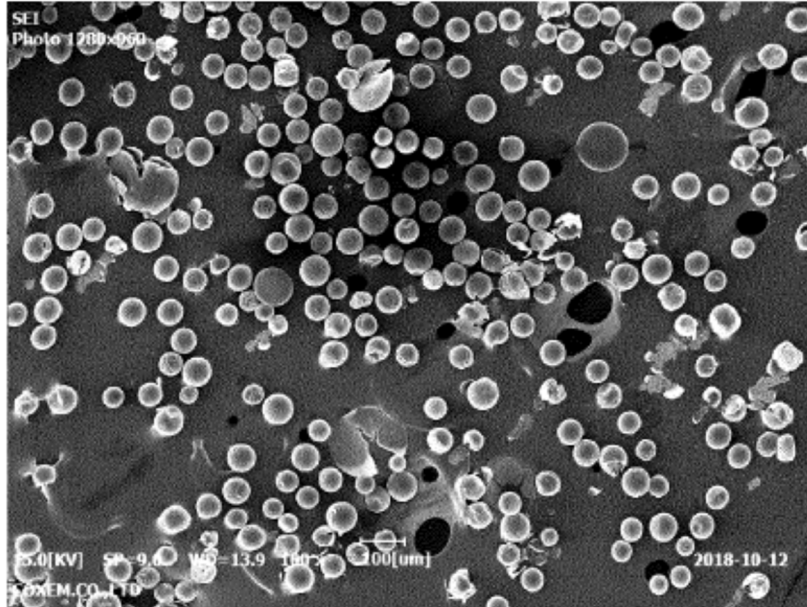
Ejemplo 1-1

[Fig 1b]



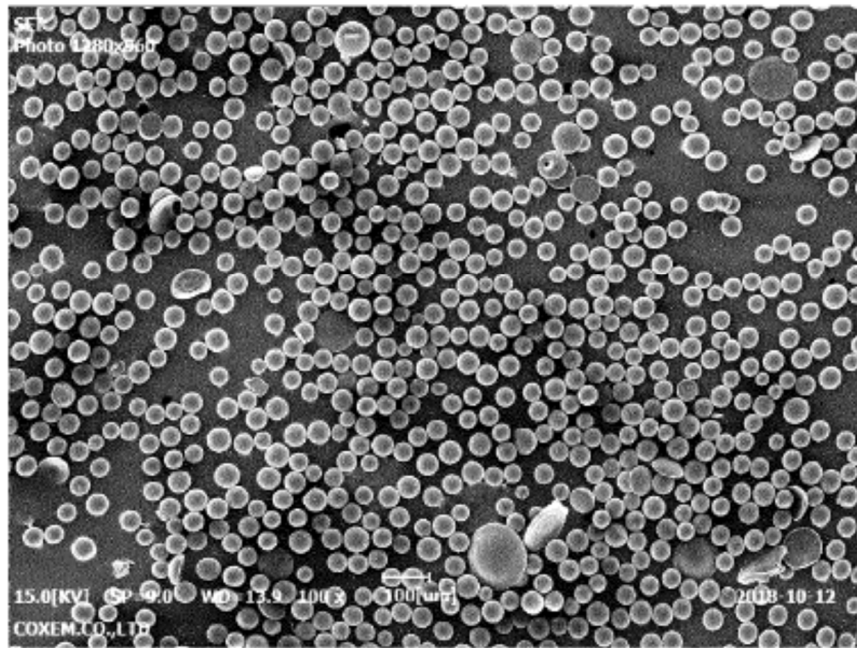
Ejemplo Comparativo 1

[Fig. 1c]



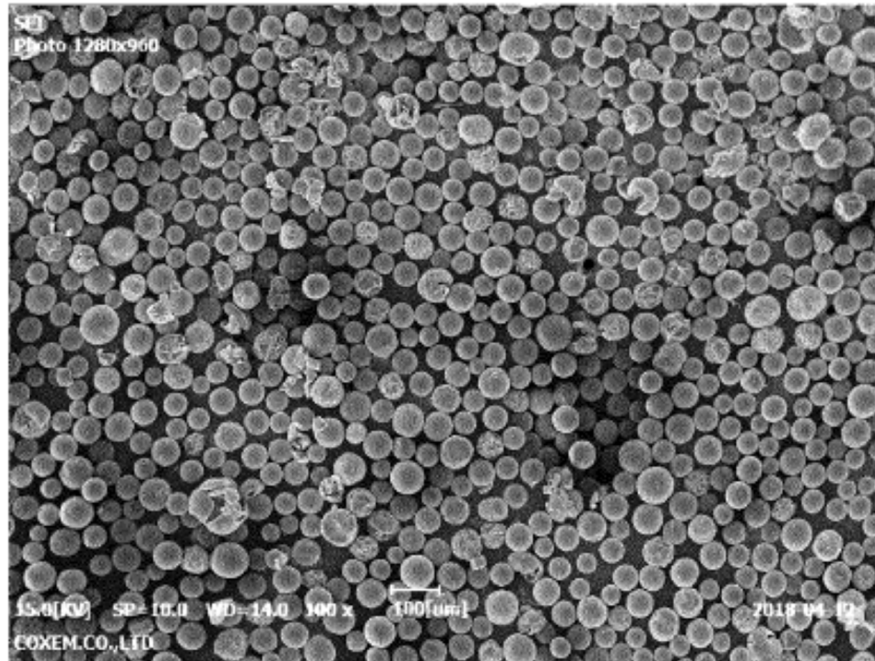
Ejemplo Comparativo 2

[Fig. 1d]



Ejemplo 5

[Fig. 1e]



Ejemplo Comparativo 3