

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 746**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2008** **E 08765612 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 2170300**

54 Título: **Microesferas con una estructura de núcleo/cáscara**

30 Prioridad:

25.06.2007 JP 2007166183

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

25.02.2015

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
9, KANDA-TSUKASA-MACHI 2-CHOME CHIYODA-
KU
TOKYO 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

HIRAOKA, SHOGO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 529 746 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

Microesferas con una estructura de núcleo/cáscara.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a microesferas que contienen aripiprazol, un procedimiento para producir las mismas, y una formulación de una suspensión acuosa inyectable que contiene las microesferas.

10 **Antecedentes de la técnica**

Para la liberación controlada de fármacos tales como el aripiprazol se utilizan microesferas compuestas de un fármaco y un polímero de base. Varias microesferas conocidas convencionalmente son de tipo matriz, en las que un fármaco se encuentra sustancialmente distribuido de forma uniforme en una matriz base tal como un polímero.

15 Por ejemplo, micropartículas de tipo matriz base/fármaco se obtienen disolviendo juntos una base y un fármaco en un solvente, secando la solución como tal, seguido de una compresión y una fragmentación (Documento de patente 1). Sin embargo, cuando una microesfera de tipo matriz como éstas tiene un alto contenido de fármaco, por ejemplo, un ratio en masa de fármaco/base de 1 o más (por ejemplo, un contenido de fármaco de 50% en masa o más), el fármaco constituye una gran parte de la microesfera. Consecuentemente, una gran cantidad del fármaco también estará presente en la superficie de la microesfera. Generalmente se considera que una gran cantidad de fármaco presente en la superficie de la microesfera desactiva el control de la liberación por la base.

25 Según otro procedimiento conocido, un fármaco y una base se disuelven en un solvente orgánico tal como diclorometano, se prepara una emulsión aceite/agua en un sistema acuoso y se vaporiza el diclorometano (Documento de patente 2).

30 El documento de patente 3 se refiere a una microesfera producida mediante la encapsulación de un antipsicótico hidrofóbico, tal como el bromperidol o haloperidol, en una base que comprende un polímero biocompatible, tal como el ácido poliláctico o un copolímero ácido láctico/ácido glicólico

Documento de patente 1: US 2004/0247870 A1

Documento de patente 2: WO 94/10982

Documento de patente 3: EP 0 669 128 A1

35

Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

40 De acuerdo la investigación llevada a cabo por el inventor, cuando se utiliza el procedimiento divulgado en el Documento de patente 2 con un alto contenido de fármaco, particularmente con un alto contenido de aripiprazol, se produce un crecimiento de cristales de fármaco en la emulsión que resulta en la producción de partículas que no son esféricas, sino que las partículas adquieren una forma derivada del cristal de fármaco (por ejemplo, de aguja o romboide). Consecuentemente, el procedimiento no logra producir microesferas que tengan una forma esférica y una estructura de núcleo/cáscara (del inglés core/shell) (ver Ejemplos comparativos 1 y 2 descritos más adelante).

50 Considerando la fluidez durante el llenado en la producción de una formulación inyectable, la habilidad de pasar a través de una jeringa (jeringabilidad) durante la administración de la formulación inyectable, la estimulación intramuscular, etc., es preferible que las microesferas tengan forma esférica.

Además, como el aripiprazol debe administrarse en una dosis alta, una formulación de una suspensión inyectable para ser administrada contiene una cantidad elevada de partículas. La elevada cantidad de partículas contenidas en la formulación inyectable aumenta la viscosidad de la suspensión, causando una menor jeringabilidad durante la administración. De acuerdo con esto, es deseable que la proporción de una base, tal como un polímero, en la microesfera se reduzca tanto como sea posible de tal forma que la microesfera contenga una gran cantidad de aripiprazol que es un ingrediente activo.

60 La presente invención tiene como objetivo el proporcionar microesferas que tienen un alto contenido de aripiprazol, un procedimiento para producir las mismas, y una formulación de una suspensión acuosa inyectable que contiene las microesferas.

Medios para resolver el problema

65 Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación intensiva para resolver los problemas arriba mencionados e hicieron los siguientes descubrimientos.

- 5 (a) Cuando el aripiprazol y un polímero biocompatible se disuelven en un disolvente orgánico, la solución resultante se mezcla con agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión en condiciones que evitan la evaporación del solvente orgánico, y después se elimina el solvente orgánico de la emulsión, por lo menos parcialmente, en condiciones que permiten la precipitación del aripiprazol en forma de partículas de forma esférica en la emulsión; sorprendentemente, se producen microesferas esféricas que tienen una estructura de núcleo/cáscara en la que un polímero biocompatible recubre toda o la mayor parte de la superficie de la partícula de aripiprazol.
- 10 (b) Las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara obtenidas de esta manera tienen un alto contenido de aripiprazol.
- (c) Las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara y un alto contenido en aripiprazol tienen unas propiedades de liberación prolongadas excelentes.
- 15 Como resultado de más investigación basada en estos descubrimientos, se logró la presente invención. La presente invención proporciona microesferas que tienen una estructura de núcleo/cáscara y un alto contenido de aripiprazol, un procedimiento para producir las mismas, una formulación de una suspensión acuosa inyectable que contiene las microesferas, etc. tal y como se muestra en los siguientes ítems 1 a 20.
- 20 Ítem 1. Microesferas con una estructura de núcleo/cáscara y una forma esférica,
- (a) comprendiendo el núcleo aripiprazol en estado sólido; y
- 25 (b) recubriendo la cáscara toda o la mayor parte de la superficie del núcleo, y comprendiendo la cáscara un polímero biodegradable, estando el contenido de aripiprazol comprendido entre 55 y 95% en masa de la masa total de la microesfera.
- Ítem 2. Microesferas según el ítem 1, que tienen un tamaño de partícula medio de 20 a 150 μm .
- 30 Ítem 3. Microesferas según los ítem 1 o 2, en las que la cáscara tiene un espesor medio de 0,5 a 20 μm .
- Ítem 4. Microesferas según cualquiera de los ítems 1 a 3, en las que el polímero biodegradable es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo formado por ácidos polilácticos y copolímeros ácido láctico-ácido glicólico.
- 35 Ítem 5. Microesfera según el ítem 4, en las que los ácidos polilácticos o los copolímeros ácido láctico-ácido glicólico tienen un peso molecular de 5000 a 200000.
- Ítem 6. Formulación de una suspensión acuosa inyectable que comprende las microesferas según cualquiera de los ítems 1 a 5, un vehículo para la misma, y agua para inyección.
- 40 Ítem 7. Formulación de una suspensión acuosa inyectable según el Ítem 6, en la que el vehículo comprende:
- (1) uno o más agentes suspensores,
- 45 (2) uno o más agentes isotónicos, y
- (3) opcionalmente uno o más agentes de ajuste del pH.
- Ítem 8. Procedimiento para producir microesferas con una estructura de núcleo/cáscara y una forma esférica,
- 50 (a) el núcleo comprendiendo aripiprazol en estado sólido; y
- (b) la cáscara recubriendo toda o la mayor parte de la superficie del núcleo, y la cáscara comprendiendo un polímero biodegradable,
- que comprende:
- 55 (i) preparar una solución que contiene aripiprazol, un polímero degradable, y un solvente orgánico;
- (ii) mezclar la solución obtenida en la etapa (i) con agua para obtener una emulsión aceite/agua, en condiciones que evitan la evaporación del solvente orgánico; y
- 60 (iii) eliminar el solvente orgánico de la emulsión aceite/agua, por lo menos parcialmente, en condiciones eficaces para permitir la precipitación de partículas esféricas de aripiprazol.
- Ítem 9. Procedimiento según el Ítem 8, en el que el solvente orgánico utilizado en la etapa (i) es un solvente orgánico inmiscible en agua.
- 65

Ítem 10. Procedimiento según el Ítem 8 o 9, en el que el agua utilizada en la etapa (ii) contiene un emulsionante.

5 Ítem 11. Procedimiento según cualquiera de los Ítems 9 a 10, en el que la etapa (ii) comprende las subetapas de (a) dispersar la solución obtenida en la etapa (i) en agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión aceite/agua y (b) dispersar la emulsión aceite/agua obtenida en la subetapa (a) en agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión aceite/agua.

10 Ítem 12. Procedimiento según cualquiera de los Ítems 8 a 11, en el que en la etapa (ii) la emulsión aceite/agua se produce en condiciones de baja temperatura efectivas para inhibir la evaporación del solvente orgánico, y en la etapa (iii) la emulsión de baja temperatura obtenida en la etapa (ii) se agita en un sistema abierto a temperatura ambiente para permitir que el solvente orgánico se volatilice.

15 Ítem 13. Formulación de una suspensión acuosa inyectable según los Ítems 6 o 7 para uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

Efectos de la invención

20 (a) Las microesferas que tienen una estructura de núcleo/cáscara de la presente invención tienen unas propiedades de liberación prolongada excelentes ya que toda o la mayor parte de la superficie del núcleo que contiene aripiprazol están recubiertas con una cáscara hecha de un polímero biodegradable.

25 (b) Además, como las microesferas son esféricas, tienen una fluidez excelente durante el relleno en la producción de una formulación de una suspensión acuosa inyectable y una excelente habilidad para pasar a través de una jeringa (jeringabilidad) durante la administración de una formulación de una suspensión acuosa inyectable.

30 (c) Además, como las microesferas tienen un alto contenido de aripiprazol, la administración de incluso una pequeña cantidad de partículas (microesferas) en una formulación inyectable permite la administración de una dosis alta de aripiprazol.

35 (d) Como las microesferas son esféricas, cuando se utilizan en una formulación inyectable, la sedimentación compacta (formación de una capa dura por las partículas sedimentadas) después de la suspensión es menos probable que ocurra. Por lo tanto, las microesferas son fácilmente redispersadas incluso cuando han sedimentado después de ser dispersadas en una formulación inyectable.

(e) Como el aripiprazol y el polímero biodegradable están disueltos en un solvente orgánico durante la producción de las microesferas de la presente invención, es posible la esterilización por filtro y no se requiere ningún ingrediente activo estéril; de esta forma, hay unas ventajas enormes en la producción.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una imagen de microscopio electrónico de las microesferas obtenidas en el Ejemplo 5.

45 La figura 2 es una imagen de microscopio electrónico de las microesferas obtenidas en el Ejemplo 6.

La figura 3 es una imagen de microscopio electrónico de las partículas esféricas de aripiprazol obtenidas en el Ejemplo de referencia 1.

50 La figura 4 es una imagen de microscopio electrónico de la superficie de corte completa de la microesfera obtenida en el Ejemplo 2 en la que la capa entre los dos triángulos (▲) es la cáscara.

La figura 5 muestra una imagen de microscopio electrónico ampliada de una parte de la superficie de corte de una microesfera obtenida en el Ejemplo 2 en la que la capa entre los dos triángulos (▲) es la cáscara.

55 La figura 6 muestra una imagen de microscopio electrónico de la superficie de corte completa de la microesfera obtenida en el Ejemplo 5 en la que la capa entre los dos triángulos (▲) es la cáscara.

60 La figura 7 muestra una imagen de microscopio electrónico ampliada de una parte de la superficie de corte de la microesfera obtenida en el Ejemplo 5 en la que la capa entre los dos triángulos (▲) es la cáscara.

La figura 8 es una imagen de microscopio electrónico de la superficie de corte de la microesfera obtenida en el Ejemplo 5 que fue cortada, sumergida en una solución ácido acético (20%), lavada y secada.

65 La figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la prueba de disolución de las microesferas obtenidas en los Ejemplos 5 y 6.

La figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de las Tablas 1 y 2 en comparación con el Ejemplo de Prueba 2.

La figura 11 es una imagen de microscopio electrónico de las partículas obtenidas en el Ejemplo Comparativo 1.

La figura 12 es una imagen de microscopio electrónico de las partículas obtenidas en el Ejemplo Comparativo 2.

La figura 13 es una imagen de microscopio electrónico de la superficie de corte completa de una partícula obtenida en el Ejemplo Comparativo 2.

La figura 14 muestra una imagen de microscopio electrónico ampliada de una parte de la superficie de corte de la partícula obtenida en el Ejemplo Comparativo 2.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Microesferas con una estructura de núcleo/cáscara

Las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la presente invención son esféricas, como se muestra en las imágenes de microscopio electrónico (figuras 1 y 2) de microesferas obtenidas en los Ejemplos descritos más abajo.

Como se muestra en las imágenes de microscopio electrónico (figuras 4-7) de microesferas obtenidas en los Ejemplos descritos abajo, la microesfera que tiene una estructura de núcleo/cáscara comprende, básicamente, un núcleo que constituye el núcleo central y una cáscara que recubre toda o la mayor parte de la superficie del núcleo.

El tamaño de partícula medio de las microesferas es de aproximadamente 20 a 150 μm , y preferentemente de aproximadamente 30 a 100 μm .

En la presente especificación, el tamaño de partícula medio de las microesferas se mide mediante el método que se va a describir en los Ejemplos descritos más abajo.

Las microesferas de la invención tienen unas propiedades de liberación prolongada excelentes.

Núcleo

El núcleo contiene básicamente aripiprazol en estado sólido, tiene forma esférica, y forma un núcleo central de la microesfera que tiene una estructura de núcleo/cáscara de la invención (ver figuras 4-7).

Habitualmente, el núcleo consiste esencialmente en aripiprazol en estado sólido, pero puede contener adicionalmente un polímero biodegradable que se describirá demás abajo. Por lo tanto, el núcleo consiste básicamente en aripiprazol o una mezcla de aripiprazol y un polímero degradable. Además, cuando se utiliza un emulsionante durante la producción, como se va a describir más adelante, el núcleo puede asimismo contener ocasionalmente un emulsionante.

La cantidad de aripiprazol contenido en el núcleo es muy elevado con respecto a la masa total de la microesfera. Generalmente, el contenido de aripiprazol es de aproximadamente 55 a 95% en masa, preferentemente de aproximadamente 60 a 90% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 60 a 80% en masa, con respecto a la masa total de la microesfera.

El contenido de aripiprazol en la totalidad de la microesfera se mide mediante un método que se describirá en los Ejemplos descritos más abajo.

La forma del aripiprazol en estado sólido contenido en el núcleo no está limitada siempre y cuando sea sólido, pero es, en general, un sólido amorfo (especialmente un sólido esférico no cristalino). En algunos casos, el aripiprazol puede existir en forma de un agregado de muchas partículas finas (partículas primarias), un cristal, etc. El aripiprazol en tales formas tiene preferentemente una forma esférica.

Cáscara

La cáscara recubre básicamente la superficie completa del núcleo arriba descrito (véase figuras 4-7). Sin embargo, en algunos casos, la cáscara puede recubrir la mayor parte de la superficie del núcleo, por ejemplo, aproximadamente 80 a 90% de la superficie del núcleo, y el núcleo puede estar parcialmente expuesto.

La cáscara consiste esencialmente de un polímero biodegradable. La cáscara puede contener, adicionalmente, una pequeña cantidad del aripiprazol arriba mencionado. Por lo tanto, la cáscara básicamente consiste esencialmente en un polímero biodegradable o una mezcla de aripiprazol y un polímero biodegradable. Además, cuando se utiliza un

emulsionante durante la producción como se va a describir más adelante, la cáscara puede además contener ocasionalmente el emulsionante.

Sin embargo, típicamente la cáscara de las microesferas de la presente invención está hecha principalmente de un polímero biodegradable (por ejemplo, consiste esencialmente en un polímero biodegradable), mientras que el núcleo está hecho principalmente de aripiprazol (por ejemplo, consiste esencialmente en aripiprazol).

El espesor medio de la cáscara puede ajustarse adecuadamente de tal forma que la cantidad de aripiprazol contenido en el núcleo sea aproximadamente 55 a 95% en masa, preferentemente de aproximadamente 60 a 90% en masa, y más preferentemente de 60 a 80% en peso, con respecto a la masa total de la microesfera, y de tal forma que se adquieran las propiedades de liberación prolongada deseadas. Por ejemplo, el espesor medio es de entre 0,5 a 20 μm , preferentemente de aproximadamente 1 a 10 μm , y más preferentemente de aproximadamente 1 a 5 μm . En cada una de las figuras 4 a 7, la distancia entre los dos triángulos (\blacktriangle) indica el espesor de la cáscara. El espesor medio de la cáscara es un valor medido mediante el método que se va a describir en los Ejemplos más abajo.

Cualquier polímero biodegradable puede ser utilizado para formar la cáscara, siempre y cuando éste se descomponga gradualmente en el cuerpo para proporcionar las propiedades de liberación prolongada deseadas. Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, copolímeros ácido láctico-ácido poliglicólico, ácidos policítricos, ácidos polimálicos, copolímeros ácido láctico-ácido aspártico, copolímeros ácido láctico-ácido hidroxipropoico, copolímeros de ácido glicólico-ácido hidroxipropoico, polipropiolactonas, polibutirilactonas, polivalerolactonas, policaprolactonas, carbonatos de politrimetileno, poli(p-dioxanona)s, poli(éster de ácido α -cianoacrílico)s, poli(ácido β -hidroxibutírico)s, oxalatos de politrimetileno, poliortoésteres, poliortocarbonatos, carbonatos de polietileno, poli-ácidos γ -bencil-L-glutámico, poli(L-alanina)s y ácidos polialgínicos, policarbonatos, amidas de poliéster, poli(aminoácido)s, poli(alquilato de alquileo)s, polietilenglicoles, poliuretanos, y homopolímeros y copolímeros de los mismos. Entre ellos, los ácidos polilácticos y los copolímeros de ácido láctico/ácido glicólico son preferidos. Estos polímeros biodegradables para formar cáscaras pueden ser utilizados de forma individual o en una combinación de dos o más.

Cuando se utilizan ácidos polilácticos o copolímeros de ácido láctico/ácido glicólico, el peso molecular de los mismos puede seleccionarse adecuadamente de entre un amplio rango, por ejemplo, de entre aproximadamente 5000 a 200000, preferentemente de entre aproximadamente 20000 a 150000, y más preferentemente de entre aproximadamente 50000 a 120000.

El peso molecular arriba mencionado es el peso molecular medio equivalente al poliestireno, medido por cromatografía de permeabilidad (GPC) utilizando poliestireno como estándar.

El ratio de ácido láctico respecto a ácido glicólico (lactato:glicolato) en los copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico no está limitado y puede seleccionarse adecuadamente de entre un amplio rango. Generalmente, el ratio molar de ácido láctico con respecto a ácido glicólico (lactato:glicolato) es de aproximadamente 99:1 hasta 50:50, y preferentemente de aproximadamente 99:1 hasta 75:25.

Ácidos polilácticos adecuados pueden ser cualquiera de entre poli(ácido D-láctico), poli(ácido L-láctico) y poli(ácido DL-láctico) y se prefiere el poli(ácido DL-láctico). Copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico adecuados pueden ser cualquiera de copolímeros de ácido D-láctico-ácido glicólico, copolímeros de ácido L-láctico-ácido glicólico y copolímeros de ácido DL-láctico-ácido glicólico, y se prefieren copolímeros de ácido DL-láctico-ácido glicólico.

Además de los polímeros biodegradables arriba mencionados, la cáscara puede contener opcionalmente polímeros no degradables biocompatibles.

Procedimiento de producción

El procedimiento para producir las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la presente invención comprende las etapas de:

- (i) preparar una solución que contiene aripiprazol, un polímero biodegradable y un solvente orgánico;
- (ii) mezclar la solución obtenida en la etapa (i) con agua para obtener una emulsión aceite en agua (Aceite/Agua) en condiciones que evitan la evaporación del solvente orgánico; y
- (iii) eliminar el solvente orgánico por lo menos parcialmente de la emulsión Aceite/Agua en condiciones efectivas para permitir la precipitación de partículas esféricas de aripiprazol.

Etapas (i)

En primer lugar, se disuelven aripiprazol y un polímero biodegradable en un solvente orgánico para obtener una solución homogénea.

5 La forma de cristal del aripiprazol no está limitada. Son utilizables una forma monohidrato (hidrato de aripiprazol A) o varias formas anhidras que se conoce que existen en forma de cristal anhidro B, cristal anhidro C, cristal anhidro D, cristal anhidro E, cristal anhidro F, cristal anhidro G y similares. Estas formas de cristal pueden utilizarse de forma individual o en una combinación de dos o más.

10 El solvente orgánico no está limitado siempre que pueda disolver aripiprazol y polímeros biodegradables. Ejemplos de tales solventes orgánicos incluyen cloroformo, dicloroetano, tricloroetano, diclorometano, tetracloruro de carbono e hidrocarburos halogenados similares; etil éter, isopropil éter, y éteres similares, acetato de etilo, acetato de butilo y ésteres de ácidos grasos similares; benceno, tolueno, xileno e hidrocarburos aromáticos similares; etanol, metanol, isopropanol y alcoholes similares, acetonitrilo y nitrilos similares; dimetilformamida y amidas similares; y mezclas de los mismos, etc. Entre ellos, son preferidos los solventes orgánicos inmiscibles en agua, especialmente el diclorometano.

15 La concentración de aripiprazol con respecto al solvente orgánico es habitualmente de aproximadamente 0,1 a 20% (M/V), preferentemente de 1 a 10% (M/V), y más preferentemente de aproximadamente 3 a 7% (M/V). El "% (M/V)" como unidad de la concentración de aripiprazol indica el porcentaje de la masa de aripiprazol con respecto al volumen del solvente orgánico. Por ejemplo, 1 g de aripiprazol en 100 ml del solvente orgánico se expresa como 1% (M/V).

20 La concentración del polímero biodegradable con respecto al solvente orgánico es habitualmente de aproximadamente 0,1 a 10% (M/V), preferentemente de aproximadamente 0,5 a 5% (M/V), y más preferentemente de aproximadamente de 1 a 3% (M/V).

25 La cantidad de polímero biodegradable utilizada puede ajustarse adecuadamente para que el contenido de aripiprazol en el núcleo sea de aproximadamente 55 a 95% en masa, preferentemente de aproximadamente 60 a 90% en masa, y más preferentemente de 60 a 80% en masa, con respecto a la masa total de la microesfera; y de tal forma que se obtengan las propiedades de liberación prolongada deseadas.

Etapa (ii)

35 A continuación, la solución (que contiene el aripiprazol, el polímero biodegradable y el solvente orgánico) obtenida en la etapa (i) se mezcla con agua para obtener una emulsión Aceite/Agua en la que dicha solución está dispersada de forma uniforme en el agua.

40 Cuando el solvente orgánico utilizado en la etapa (i) es inmisible en agua, la solución obtenida en la etapa (i) apenas es miscible en agua y se dispersa por lo tanto en agua en forma de pequeñas gotitas.

45 Cuando se utiliza un solvente miscible en agua en la etapa (i), la solución obtenida en la etapa (i) se dispersa como micelas utilizando un emulsionante.

50 La proporción de la solución obtenida en la etapa (i) con respecto al agua no está limitada, siempre y cuando se pueda formar una emulsión Aceite/Agua con un tamaño de partícula deseado. Habitualmente, la cantidad de solución con respecto al agua es de aproximadamente 0,1 a 20% en masa, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 1 a 5% en masa.

55 Independientemente de si el solvente orgánico utilizado en la etapa (i) es miscible o inmisible en agua, puede añadirse un emulsionante al agua.

60 Cualquier emulsionante puede ser utilizado, siempre y cuando pueda formar una emulsión Aceite/Agua, preferentemente una emulsión Aceite/Agua estable. Ejemplos de tales emulsionantes incluyen oleato de sodio, estereato de sodio, laurel sulfato de sodio y tensioactivos aniónicos similares; ésteres de ácidos grasos de sorbitan polioxietileno, derivados de polioxietileno de aceite de castor y tensioactivos no iónicos similares; polivinilpirrolidona, alcohol polivinilo, carboximetilcelulosa, lecitina, gelatina, ácido hialurónico y similares. Estos emulsionantes pueden ser utilizados de forma individual o en una combinación de dos a más.

65 Cuando se utiliza un emulsionante, la concentración no está limitada y puede seleccionarse de entre un amplio rango, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 20% en masa, preferentemente de aproximadamente 0,001 a 10% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 0,001 a 5% en masa, con respecto a la cantidad de agua.

70 La emulsión Aceite/Agua se forma en condiciones de temperatura que no permiten la congelación del solvente orgánico y del agua, y que evitan la evaporación del solvente orgánico. Una temperatura adecuada depende del tipo de solvente orgánico. Por ejemplo, en el caso de utilizar diclorometano como solvente orgánico, la temperatura bajo

presión atmosférica es típicamente de aproximadamente 0 a 18°C, y preferentemente de aproximadamente 0 a 15°C.

El método para preparar una emulsión Aceite/Agua no está limitado, y cualquier método en el que la solución arriba mencionada (que contiene el aripiprazol, el polímero biodegradable y el solvente orgánico) se dispersa en agua como gotitas de tamaño adecuado o micelas puede ser utilizado. Por ejemplo, una emulsión Aceite/Agua puede prepararse agitando una mezcla de la solución arriba mencionada y agua, utilizando un homogeneizador o similar a una velocidad rotacional adecuada para fragmentar la solución en el agua, o pasando una mezcla de la solución arriba mencionada y agua a través de un filtro con poros pequeños tal como un filtro cerámico a una velocidad fijada para fragmentar la solución y después mezclando la solución fragmentada con agua.

Si es necesario, la formación de una emulsión en la etapa (ii) puede realizarse en múltiples subetapas. Por ejemplo, cuando la etapa (ii) se realiza en dos etapas, en la subetapa (a), la solución obtenida en la etapa (i) se dispersa en agua, en presencia o ausencia de un emulsionante, para formar una emulsión Aceite/Agua, y en la subetapa (b), la emulsión Aceite/Agua resultante se dispersa de nuevo en agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión Aceite/Agua. Además, si es necesario, la etapa (ii) puede realizarse en tres o más subetapas incluyendo estas dos subetapas.

En el caso de formar una emulsión Aceite/Agua en múltiples etapas de esta forma, la proporción de solución obtenida en la etapa (i) en relación con la cantidad total de agua utilizada en las subetapas no está limitada, siempre que se pueda obtener una emulsión Aceite/Agua con el tamaño de partícula deseado, y habitualmente es de aproximadamente 0,1 a 20% en masa, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 1 a 5% en masa. El emulsionante anteriormente mencionado puede ser utilizado como el emulsionante en cada subetapa.

La concentración del emulsionante en cada subetapa no está particularmente limitada y puede seleccionarse de entre un amplio rango. La concentración es típicamente de aproximadamente 0,0001 a 20% en masa, preferentemente de aproximadamente 0,001 a 10% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 0,001 a 5% en masa, en base a la cantidad de agua.

Cuando la etapa (ii) se realiza en tales subetapas múltiples, cada subetapa se realiza en condiciones de temperatura en las que el solvente orgánico y el agua no se congelan y se evita la evaporación del solvente orgánico. Por ejemplo, en el caso de utilizar diclorometano como solvente orgánico, la temperatura bajo presión atmosférica es típicamente de aproximadamente 0 a 18°C, y preferentemente de 0 a 15°C.

El tamaño de las gotitas o micelas en la emulsión Aceite/Agua obtenidas en la etapa (ii) puede ajustarse utilizando varios métodos. Por ejemplo, el tamaño puede reducirse mediante la realización de un procesado a alta velocidad con el homogeneizador arriba mencionado o similar, o mediante el paso de dichas gotitas a través de un filtro con un tamaño de poro pequeño. El tamaño de las gotitas o micelas puede incrementarse mediante el aumento del contenido en aripiprazol y polímero biodegradable en el solvente orgánico arriba mencionado.

Cuando el tamaño de las gotitas o micelas se reduce para obtener microesferas con un tamaño de partícula más pequeño, un área de superficie específica mayor incrementa la cantidad requerida de material de cáscara, haciendo más fina la cáscara. Una proporción aumentada de polímero biodegradable en las gotitas o micelas hace que la cáscara sea más gruesa. El tamaño del núcleo puede ajustarse mediante el ajuste adecuado del contenido de aripiprazol en la solución, el tamaño de las gotitas o micelas en la emulsión (el tamaño de las microesferas) y similares.

Etapas (iii)

La eliminación, por lo menos parcialmente, del solvente orgánico de la emulsión de Aceite/Agua obtenida en la etapa (ii) produce una suspensión acuosa de microesferas con una estructura de núcleo/cáscara en las que toda o la mayoría de la superficie de aripiprazol está recubierta con un polímero biodegradable.

El solvente orgánico puede ser eliminado, por lo menos parcialmente, mediante varios métodos, por ejemplo, calentando la emulsión arriba mencionada bajo presión atmosférica, o dejando la emulsión a temperatura ambiente. En estos métodos, el punto de ebullición del solvente orgánico utilizado es preferentemente menor que el punto de ebullición del agua.

En la etapa (iii), es importante llevar a cabo la eliminación de por lo menos una parte del solvente orgánico de la emulsión Aceite/Agua en condiciones que sean efectivas para permitir que el aripiprazol se precipite en forma de partículas esféricas.

Las condiciones efectivas para permitir la precipitación de partículas esféricas del aripiprazol pueden lograrse eliminando por lo menos una parte del solvente orgánico, dejando que el solvente orgánico se volatilice gradualmente. Se presume que, eliminando gradualmente por lo menos una parte del solvente orgánico de esta

manera, el aripiprazol presente a concentraciones mayores en cada gotita precipita preferentemente en una partícula esférica, y después el polímero biodegradable se deposita en la superficie de la partícula esférica de aripiprazol, de tal manera que se forma la estructura de núcleo/cáscara de la microesfera.

5 Una manera típica de permitir que el solvente orgánico se volatilice gradualmente es el agitar la emulsión Aceite/Agua de baja temperatura obtenida en la etapa (ii) bajo presión atmosférica y a temperatura ambiente de tal forma que la emulsión Aceite/Agua pueda alcanzar la temperatura ambiente para permitir así que por lo menos una porción del solvente orgánico se volatilice gradualmente.

10 Una rápida eliminación del solvente orgánico de la emulsión Aceite/Agua obtenida en la etapa (iii) provoca que el aripiprazol y el polímero biodegradable precipiten simultáneamente formando así una matriz del aripiprazol y el polímero biodegradable, o provoca que los cristales de aripiprazol crezcan.

15 En la etapa (iii), el solvente orgánico se elimina hasta que las microesferas de la presente invención se producen. Por ejemplo, en el caso de utilizar diclorometano como solvente orgánico bajo presión atmosférica, la agitación se lleva a cabo durante 1 a 24 horas, preferentemente 2 a 12 horas.

20 Cabe destacar que la etapa (ii) y la etapa (iii) pueden realizarse como una serie de etapas. Por ejemplo, en la etapa (ii), la solución de solvente orgánico obtenida en la etapa (i) se mezcla con agua en condiciones que evitan la evaporación del solvente (generalmente, a baja temperatura) para obtener una emulsión Aceite/Agua a baja temperatura en la que el solvente está dispersado uniformemente; sin embargo, no es necesario asegurar la uniformidad de la emulsión Aceite/Agua, y la agitación a temperatura ambiente puede empezarse con una emulsión que no sea suficientemente uniforme. En este caso, la volatilización del solvente orgánico y la formación de una emulsión uniforme ocurren simultáneamente.

25 Como las microesferas obtenidas en la etapa (iii) están presentes en agua, pueden ser aisladas separando las microesferas mediante un método adecuado tal como filtración, y las microesferas obtenidas se someten a un por aire, secado bajo presión reducida, una liofilización, o similar. Las microesferas secas pueden ser tamizadas como sea necesario para obtener un tamaño medio de partícula deseado.

30 En el procedimiento de producción de la presente invención, como el aripiprazol y el polímero biodegradable están disueltos, en algún momento, en el solvente orgánico en la etapa (i) mencionada arriba, es posible utilizar la esterilización por filtro, permitiendo el uso de una de polvo de aripiprazol no estéril. De esta forma, existen enormes ventajas en el procedimiento de producción.

35 Formulación de una suspensión acuosa inyectable

40 Las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la invención tienen unas propiedades de liberación prolongada excelentes, como queda claro de los Ejemplos de Prueba más abajo. Asimismo, como las microesferas son esféricas, tienen una fluidez excelente durante el llenado en la producción de una formulación inyectable, y una excelente jeringabilidad durante la administración de una formulación inyectable. Además, como las microesferas tienen un alto contenido de aripiprazol, la administración de una pequeña cantidad de partículas (microesferas de la presente invención) en una formulación inyectable permite la administración de una alta dosis de aripiprazol.

45 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para tratar la esquizofrenia, que comprende la administración de microesferas de la presente invención a un paciente que necesita tal tratamiento. La presente invención también se refiere al uso de las microesferas de la presente invención para producir un medicamento para tratar la esquizofrenia. La presente invención asimismo se refiere a las microesferas para su uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

50 Asimismo, las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la invención pueden ser utilizadas adecuadamente en una formulación de una suspensión acuosa inyectable.

55 La formulación de una suspensión acuosa inyectable de la presente invención contiene las microesferas de la invención, un vehículo para las mismas, y agua para inyección.

60 La cantidad de las microesferas en la formulación de una suspensión acuosa inyectable no está limitada, siempre y cuando las microesferas estén dispersadas en la formulación inyectable. Por ejemplo, el contenido de microesferas en la formulación inyectable es de aproximadamente 5 a 50% en masa, preferentemente de aproximadamente 10 a 40% en masa, y más preferentemente de aproximadamente 10 a 30% en masa.

El vehículo contenido en la formulación de una suspensión acuosa inyectable de la invención contiene:

- 65 (a) por lo menos un agente suspensor,
- (b) por lo menos un agente isotónico, y
- (c) opcionalmente por lo menos un agente ajustador de pH.

(a) Agente suspensor

5 Ejemplos de agentes suspensores contenidos en la formulación de una suspensión acuosa inyectable incluyen carboximetil celulosa de sodio, hidroxipropil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

10 Ejemplos de otros agentes suspensores adecuados para utilizarse en el vehículo para las microesferas de la invención incluyen varios polímeros, oligómeros de bajo peso molecular, productos naturales, y tensioactivos (incluyendo tensioactivos no-iónicos e iónicos), tales como cloruro de cetilpiridinio, gelatina, caseína, lecitina (fosfaturos), dextrano, glicerol, goma arábica, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, monoestearato de glicerol, alcohol cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitan, éteres de polioxietileno de alquilo (por ejemplo, éteres de macrogol tales como cetomacrogol 1000), derivados de polioxietileno de aceite de castor, ésteres de ácidos grasos y polioxietileno de sorbitan (por ejemplo, Tweens (marca registrada) disponibles comercialmente tales como Tween 20 (marca registrada) y Tween 80 (marca registrada) (ICI Specialty Chemicals)); polietilenglicoles (por ejemplo, Carbowax 3350 (marca registrada) y 1450 (marca registrada), y Carbopol 934 (marca registrada) (Union Carbide)), bromuro de dodeciltrimetilamoníaco, estearatos de polioxietileno, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, sulfato de sodio dodecilo, carboximetilcalulosa de calcio, hidroxipropil celulosas (por ejemplo, HPC, HPC-SL, y HPC-L), metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa no cristalina, silicato de magnesio aluminio, trietanolamina, alcohol polivinilo (PVA), polímeros de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenol con óxido de etileno y formaldehído (también conocidos como tiloxapol, superiona, y triton), poloxámeros (por ejemplo, Pluronic F68 (marca registrada) y F108 (marca registrada), que son copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno); poloxaminas (por ejemplo, Tetronic 908 (marca registrada), también conocido como Poloxamina 908 (marca registrada), que es un copolímero de bloque tetrafuncional derivado de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina (BASF Wyandotte Corporation, Parsippany, N.J.)); un fosfolípido cargado tal como fosfatidilglicerol de dimiristoilo, dioctilsulfosuccinato (DOSS); Tetronic 1508 (marca registrada) (T-1508) (BASF Wyandotte Corporation), ésteres dialquilo de ácido sulfosuccínico de sodio (por ejemplo, Aerosol OT (marca registrada), que es un éster dioctilo de ácido sulfosuccínico de sodio (American Cyamid)); Duponol P (marca registrada), que es un laurel sulfato de sodio (DuPont); Tritons X-200 (marca registrada), que es un sulfonato de alquil aril poliéter (Rohm and Haas); Crodestas F-110 (marca registrada), que es una mezcla de estearato de sucrosa y de diestearato de sucrosa (Croda Inc.); *p*-isononilfenoxipoli-(glicidol), también conocido como Olin-10G (marca registrada) o Surfactant 10-G (marca registrada) (Olin Chemicals, Stamford, Conn.); Crodestas SL-40 (marca registrada) (Croda, Inc.); y SA9OHCO, que es C₁₈H₃₇-CH₂(CON(CH₃))-CH₂(CHOH)₄(CH₂OH)₂ (Eastman Kodak Co.); decanoil-N-metilglucamida; n-decil β-D-gucopiranosido; n-decil β-D-matopiranosido; n-dodecil β-D-glucopiranosido; n-dodecil β-D-maltósido, heptanoil-N-metilglucamida; n-heptil-β-D-glucopiranosido; n-heptil β-D-tioglucofósido; n-hexil β-D-glucopiranosido; nonanoil-N-metilglucamida; n-nonil β-D-glucopiranosido; octanoil-N-metilglucamida; n-octil-β-D-glucopiranosido; octil β-D-tioglucofósido; y similares.

40 La mayoría de estos agentes suspensores son excipientes farmacéuticos conocidos y están descritos en detalles, por ejemplo, en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", publicado conjuntamente por la Asociación Farmacéutica Americana y la Sociedad Farmacéutica de Gran Bretaña (The Pharmaceutical Press, 1986).

45 Estos agentes suspensores están disponibles comercialmente y pueden producirse mediante técnicas conocidas en el sector. Estos agentes suspensores pueden ser utilizados de forma individual o en combinación de dos o más.

50 La cantidad de agente suspensor no está limitada, siempre y cuando sea aceptable para ser utilizada en una formulación inyectable, y puede ser ajustada a una cantidad suficiente para suspender las microesferas de la invención en la formulación de una suspensión acuosa inyectable. La cantidad es típicamente de 0,01 a 20 partes por masa, preferentemente 0,1 a 10 partes por masa, por 100 partes por masa de agua para inyección contenida en la formulación inyectable de la invención.

(b) Agente isotónico

55 El agente isotónico contenido en la formulación de una suspensión acuosa inyectable de la invención no está limitado, siempre y cuando pueda hacer que la formulación inyectable sea isotónica. Ejemplos de tales agentes isotónicos incluyen glicerol, arabitol, xilitol, adonitol, manitol, sorbitol, dulcitol, y alcoholes polihídricos similares; metanol, etanol, alcohol isopropilo, y alcoholes monohídricos similares; arabinosa, xilosa, ribosa, 2-desoxirribosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, sorbosa, ramnosa, fucosa, y monosacáridos similares, sucrosa; maltosa, lactosa, celobiosa, trehalosa, y disacáridos similares; maltotriosa, rafinosa, estaquirosa, y oligosacáridos similares; glicina, leucina, arginina, y aminoácidos similares; o derivados de los mismos.

Estos agentes isotónicos pueden ser utilizados de forma individual o en una combinación de dos o más.

65 La cantidad de agente isotónico no está limitada, siempre y cuando sea aceptable para el uso en una formulación inyectable, y puede ser ajustada a una cantidad suficiente para hacer que la formulación inyectable sea isotónica

con los fluidos corporales. La cantidad es típicamente de 0,1 a 20 partes en masa, preferentemente de 0,5 a 15 partes en masa, por 100 partes en masa de agua para inyección contenida en la formulación inyectable de la invención.

5 (c) Agente ajustador de pH

La formulación de una suspensión acuosa inyectable puede contener opcionalmente un agente ajustador de pH, que puede ser utilizado en una cantidad efectiva para ajustar el pH de la suspensión acuosa al rango de aproximadamente 2 a 12, y preferentemente de aproximadamente 7.

10 El agente ajustador de pH puede ser un ácido o una base, dependiendo de si el pH de la formulación de una suspensión acuosa inyectable necesita ser aumentado o disminuido para alcanzar el pH neutro deseado de aproximadamente 7.

15 Cuando el pH necesita ser disminuido, los agentes ajustadores de pH adecuados pueden ser, por ejemplo, ácido hidrociorhídrico, ácido acético, y agentes ajustadores de pH ácidos similares; de entre los cuales el ácido hidrociorhídrico es preferido.

20 Cuando el pH necesita ser aumentado, los agentes ajustadores de pH adecuados pueden ser, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de calcio, óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, y agentes ajustadores de pH básicos similares; de entre los cuales en hidróxido de sodio es preferido.

25 La formulación de una suspensión acuosa inyectable de la invención se utiliza para tratar la esquizofrenia y desórdenes relacionados como el desorden bipolar y la demencia en pacientes humanos. La formulación inyectable se administra en una única inyección o en múltiples inyecciones en las que después de una administración, no se requiere básicamente otra readministración durante por lo menos un mes. La formulación inyectable se administra preferentemente intramuscularmente, aunque también son aceptables las inyecciones subcutáneas. La dosis de formulación de una suspensión acuosa inyectable por administración es de aproximadamente 0,1 a 5 ml, y preferentemente de aproximadamente 0,5 a 3 ml.

30 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para tratar la esquizofrenia, que comprende la administración de una formulación de una suspensión acuosa inyectable a un paciente que necesita tal tratamiento. La presente invención también se refiere al uso de una formulación de una suspensión acuosa inyectable para la producción de un medicamento para tratar la esquizofrenia. La presente invención asimismo se refiere a una formulación de una suspensión acuosa inyectable para su uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

Ejemplos

40 La presente invención se describirá con más detalle abajo, en referencia a los Ejemplos, Ejemplos de Referencia, Ejemplos Comparativos y Ejemplos de Prueba. En los Ejemplos, Ejemplos de Referencia, Ejemplos Comparativos y Ejemplos de Prueba “%” significa “% en masa” a menos que se especifique de otra forma.

45 En los Ejemplos, Ejemplos de Referencia, Ejemplos Comparativos y Ejemplos de Prueba, las propiedades físicas se midieron de acuerdo con los siguientes métodos.

Peso molecular del polímero biodegradable

50 El peso molecular del polímero biodegradable es el peso molecular medio del número equivalente a poliestireno medido por cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) utilizando poliestireno como estándar.

Tamaño de partícula medio de las microesferas

55 El tamaño de partícula medio se midió con un Analizador de Tamaño de Partícula por Difracción Láser (SALD-3000J, manufacturado por Shimadzu Corp.). En los siguientes ejemplos, los tamaños de partícula medios de las microesferas obtenidos estuvieron todos en un rango de 20 a 150 μm .

Contenido de aripiprazol en las microesferas

60 Se disolvieron microesferas en acetona y se rellenó con una fase móvil de HPLC, y la cantidad de aripiprazol se midió por HPLC. La fase móvil se preparó disolviendo 1,59 g de sulfato de sodio anhidro en 560 ml de agua, y mezclando la solución con 330 ml de acetonitrilo y 110 ml de metanol.

Grosor medio de la cáscara

Las microesferas se incrustaron en parafina y se cortaron en un micrótopo deslizante (SM2000R, manufacturado por LEICA) para la observación bajo el microscopio electrónico. El grosor se midió en cinco sitios arbitrarios de la cáscara en una imagen de microscopio electrónico para calcular el valor medio como grosor medio de la cáscara.

5 Ejemplo 1

(i) Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 66 mg de ácido poliláctico (peso molecular: 20000) en 2 ml de diclorometano.

10 (ii) La solución de diclorometano se añadió a 20 ml de una solución acuosa de alcohol polivinilo (PVA) al 1% mientras se enfriaba con hielo, y la mezcla se emulsionó con un homogeneizador (nombre comercial: Polytron Homogenizer PT3000, manufacturado por KINEMATICA) a 2000 rpm durante 1 minuto para obtener una emulsión Aceite/Agua.

15 La emulsión Aceite/Agua resultante se añadió a 80 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua.

(iii) La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante
20 toda la noche. Como resultado, se confirmó la precipitación de partículas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la presente invención) fue 38,0 µm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue 57,8%.

25

Ejemplo 2

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 25 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 100 ml de una
30 solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua. La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitados de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante toda la noche.

35 Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la presente invención). El contenido de aripiprazol en las microesferas fue 72,7%.

40 Con el objetivo de observar el interior de las partículas, las microesferas obtenidas se incrustaron en parafina y se cortaron en un micrótopo deslizante para su observación bajo el microscopio electrónico. Las imágenes de microscopio electrónico obtenidas se muestran en las figuras 4 y 5. Como resultado, una capa (cáscara) con un grosor de varios µm se observó en la superficie. En las figuras 4 y 5, la distancia entre los dos triángulos (▲) indica el grosor de la cáscara.

45 Ejemplo 3

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 66 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 100 ml de una
50 solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua. La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante toda la noche.

55 Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la presente invención). El contenido de aripiprazol en las microesferas fue 56,9%.

Ejemplo 4

60 Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 11 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 100 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua. La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante toda la
65 noche.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 μm , y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas (microesferas de la presente invención). El contenido de aripiprazol en las microesferas resultantes fue 89,6%.

5 Ejemplo 5

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 25 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 20 ml de una solución acuosa de PVA al 1% mientras se enfriaba con hielo, y la mezcla se removió con un homogeneizador Polytron a 2000 rpm durante 1 minuto. El líquido resultante se añadió a 80 ml de una solución PVA 1% (aproximadamente a 10°C) agitado a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua. La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante toda la noche.

15 Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 μm , y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas (microesferas de la presente invención). El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes fue de 64,9 μm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue de 79,7%.

20 Una imagen de microscopio electrónico de las partículas resultantes se muestra en la figura 1. Como queda claro a partir de la figura 1, las partículas obtenidas (microesferas de la invención) son esféricas.

25 A continuación, con el objetivo de observar el interior de las partículas, las microesferas obtenidas se embebieron en parafina y se cortaron con un micrótopo de deslizamiento para su observación bajo un microscopio electrónico. Las imágenes de microscopio electrónico se muestran en las figuras 6 y 7. Consecuentemente, como se muestra en las figuras 6 y 7, se observó una capa (cáscara) en la superficie con un grosor de varios μm . En las figuras 6 y 7, la distancia entre los dos triángulos (\blacktriangle) indica el grosor de la cáscara.

30 Además, las partículas cortadas se sumergieron durante 1 hora en una solución de ácido acético (20%) que no disuelve el ácido láctico pero que disuelve únicamente el aripiprazol, se lavaron con agua purificada, y se observaron bajo un microscopio electrónico. La imagen de microscopio electrónico se muestra en la figura 8. Consecuentemente, como queda claro a partir de la figura 8, solamente se disolvió el núcleo y no se disolvió la cáscara. Esto reveló que en la microesfera de la presente invención, la cáscara consiste esencialmente de ácido poliláctico y el núcleo consiste esencialmente de aripiprazol.

35 Ejemplo 6

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 25 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 20 ml de una solución acuosa de PVA al 1% mientras se enfriaba con hielo, y la mezcla se removió con un homogeneizador Polytron a 2000 rpm durante 1 minuto. El líquido resultante se añadió a 80 ml de una solución PVA 1% (aproximadamente a 10°C) agitado a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua. La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante 4 horas.

45 Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 μm , y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes fue de 55,1 μm .

50 Una imagen de microscopio electrónico de las partículas resultantes se muestra en la figura 2. Como queda claro a partir de la figura 2, las partículas (microesferas de la invención) fueron esféricas.

Ejemplo 7

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (400 mg) y aproximadamente 125 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 10 μm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 4 horas.

60 Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 μm , y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 78,4 μm .

Ejemplo 8

65

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (400 mg) y aproximadamente 125 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 20 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 4 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 129,3 µm.

Ejemplo 9

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (400 mg) y aproximadamente 125 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 15 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 4 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 125,5 µm.

Ejemplo 10

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (400 mg) y aproximadamente 125 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico/ácido glicólico = 75/25 (ratio molar), peso molecular: aproximadamente 63800) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 10 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 3 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al vacío a 40°C para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 69,3 µm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue de 72,0%.

Ejemplo 11

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (500 mg) y aproximadamente 125 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico/ácido glicólico = 75/25 (ratio molar), peso molecular: aproximadamente 63800) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 10 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 3 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al vacío a 40°C y se tamizaron con un tamiz de 150 µm para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 85,5 µm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue de 75,2%.

Ejemplo 12

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (500 mg) y aproximadamente 125 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 10 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 3 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al vacío a 40°C para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 89,2 µm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue de 75,8%.

Ejemplo 13

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (500 mg) y aproximadamente 125 mg de ácido poliláctico (peso molecular: aproximadamente 100000) se disolvieron en 10 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se pasó a través de filtro de vidrio poroso Shirasu con un tamaño de poro de 10 µm a 25 ml/min, y se mezcló con 500 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) para preparar una emulsión Agua/Aceite. La emulsión Agua/Aceite obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 3 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al vacío a 40°C y se tamizaron con un tamiz de 150 µm para obtener partículas secas. El tamaño de partícula medio de las partículas resultantes (microesferas de la invención) fue de 78,1 µm y el contenido de aripiprazol en las microesferas fue de 75,6%.

Ejemplo de referencia 1

Se disolvió hidrato de aripiprazol (100 mg) en 2 ml de diclorometano y la solución se añadió gota a gota a 100 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 10°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua (aproximadamente a 10°C). La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 10°C) se colocó en un vaso de precipitado de 200 ml. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó durante toda la noche.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas. Una imagen de microscopio electrónico de las partículas obtenidas se muestra en la figura 3. Como queda claro a partir de la figura 3, las partículas de aripiprazol fueron esféricas.

Ejemplo de prueba 1

De acuerdo con la Farmacopea japonesa, se realizó una prueba de disolución utilizando el método de palas. Específicamente, se midieron aproximadamente 50 mg de las microesferas de los Ejemplos 5 y 6, calculado como aripiprazol anhídrido, y se añadieron a 900 ml de una solución acuosa de dodecilsulfato de sodio al 0,5% para realizar una prueba de disolución utilizando el método de palas a 100 rpm.

Los resultados se muestran en la figura 9. Como queda claro a partir de la figura 9, las microesferas de los Ejemplos 5 y 6 muestran una disolución durante por lo menos dos meses.

Ejemplo de prueba 2

Las microesferas se administraron a conejos, y se midió la concentración en sangre de aripiprazol. Más específicamente, las microesferas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (PLGA) (de ahora en adelante PLGA MS) obtenidas en el Ejemplo 11 y las microesferas de ácido poliláctico (PLA) (de ahora en adelante PLA MS) obtenidas en el Ejemplo 13 se dispersaron por separado en una solución acuosa al 1,5% de carboximetil celulosa de sodio que contiene 0,75% de cloruro de sodio de tal forma que el contenido de aripiprazol se volvió de 10% (M/V).

La suspensión obtenida se inyectó por vía subcutánea en la región cervical posterior de cada conejo de tal manera que la dosis de aripiprazol fue 25 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre del conejo durante 84 días después de la administración. Se midió la concentración de aripiprazol en sangre (promedio y desviación estándar (D.E.)). La Tabla 1 muestra los resultados para "PLA MS" y la Tabla 2 muestra los resultados para "PLGA MS".

Tabla 1

PLA MS n=4		Tiempo (día)												
Ejemplo 13		0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	70	84
Concentración en plasma (ng/ml)	Promedio	0,00	1,91	1,22	2,40	3,70	3,82	5,21	6,25	4,69	4,59	4,46	4,77	4,02
	D.E.	0,00	0,97	0,61	0,97	2,1	1,27	1,93	2,14	0,82	0,46	0,93	1,6	1,01

Tabla 2

PLGA MS n=4		Tiempo (día)												
Ejemplo 11		0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	70	84
Concentración en plasma (ng/ml)	Promedio	0,00	1,25	1,02	2,29	6,21	5,96	7,29	9,01	7,27	7,83	8,54	5,52	4,42
	D.E.	0,00	0,31	0,36	1,23	1,66	3,74	1,99	1,38	2,36	0,89	2,75	0,81	0,38

La figura 10 muestra un gráfico con los datos de las Tablas 1 y 2.

Como se muestra en la figura 10, la concentración de aripiprazol en la sangre de conejo fue consistentemente alta durante todos los 84 días. La concentración en sangre no había disminuido a día 84, y se presume que la concentración en sangre continuará a un nivel alto durante tres meses o más.

Ejemplo comparativo 1

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (100 mg) y aproximadamente 66 mg de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico/ácido glicólico = 50/50 (ratio molar), peso molecular: aproximadamente 20000) en 2 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinilo (PVA) al 1% (a 23°C) agitada a 400 rpm para obtener una emulsión Aceite/Agua (a 23°C).

La emulsión Aceite/Agua obtenida (a 23°C) se colocó en un vaso de precipitado. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente y la emulsión se agitó a 400 rpm durante 32 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas.

Como se muestra en la figura 11, las partículas resultantes tuvieron formas irregulares, como placas, etc. De este modo, el método no logró obtener microesferas esféricas.

Ejemplo comparativo 2

Se disolvieron hidrato de aripiprazol (aproximadamente 190 mg) y aproximadamente 1,2 g de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico (ácido láctico/ácido glicólico = 50/50 (ratio molar), peso molecular: aproximadamente 20000) en 4 ml de diclorometano. La solución de diclorometano se añadió a 100 ml de una solución acuosa de alcohol polivinilo (PVA) al 1% (a 23°C), y la mezcla se homogeneizó durante un minuto a 2000 rpm utilizando un homogeneizador (Nombre comercial Polytron Homogenizer PT3000, manufacturado por Kinematica) para preparar una emulsión Aceite/Agua (aproximadamente a 23°C). La emulsión Aceite/Agua obtenida (aproximadamente a 23°C) se añadió a 900 ml de una solución acuosa de PVA al 1% (aproximadamente a 23°C) agitada a 400 rpm. La mezcla resultante se colocó en un vaso de precipitado. El vaso de precipitado se colocó en un sistema abierto a temperatura ambiente, y la mezcla allí dentro se agitó durante 32 horas.

Subsiguientemente, se realizó una filtración con un filtro de 10 µm, y las partículas en el filtro se secaron al aire para obtener partículas secas.

Como se muestra en la figura 12, las partículas obtenidas fueron esféricas. Las microesferas se embebieron en parafina y se cortaron con un micrótopo de deslizamiento. Las partículas cortadas se observaron con un microscopio electrónico, como se muestra en las figuras 13 y 14. En dichas partículas, no se observó una estructura de núcleo/cáscara, tal como, en comparación, se observa claramente en las figuras 6 y 7. El método arriba mencionado no logró, de este modo, obtener microesferas con una estructura de núcleo/cáscara.

Aplicabilidad industrial

Las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la presente invención tienen un alto contenido de aripiprazol y, en consecuencia, la administración de incluso pequeñas cantidades de partículas (microesferas) permite la administración de altas dosis de aripiprazol. Asimismo, las microesferas con una estructura de núcleo/cáscara de la invención tienen excelentes propiedades de liberación prolongada ya que el núcleo conteniendo aripiprazol está recubierto con una cáscara hecha de un polímero biodegradable. Además, las microesferas de la invención son esféricas y por lo tanto tienen una excelente fluidez durante el llenado en la producción de una formulación inyectable y una excelente jeringabilidad durante la administración de la formulación inyectable.

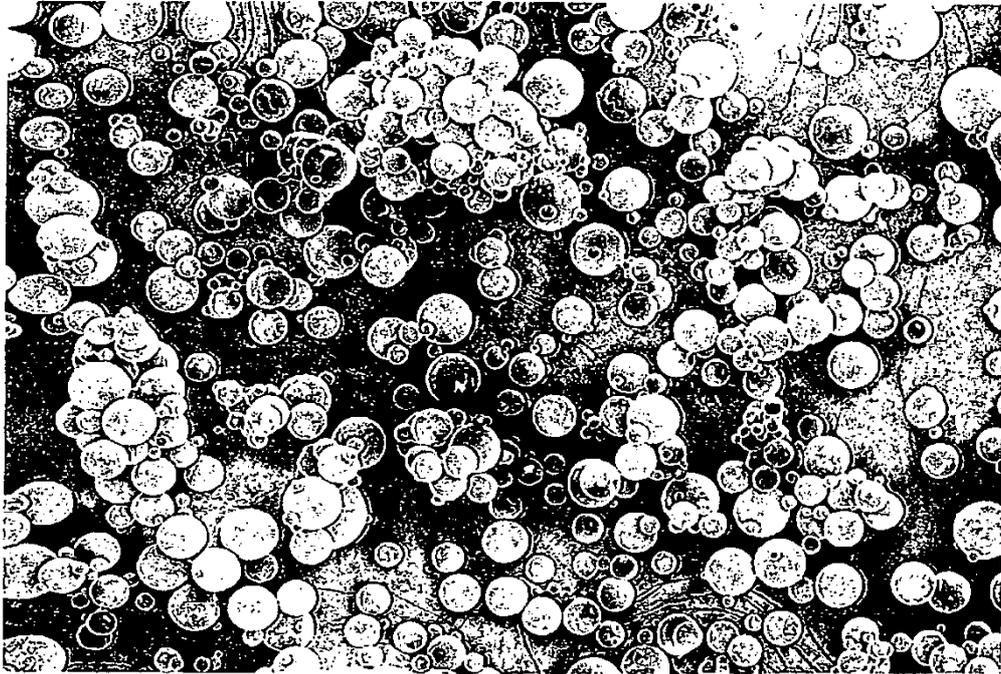
REIVINDICACIONES

1. Microesferas con una estructura de núcleo/cáscara y una forma esférica,
- 5 (a) comprendiendo el núcleo aripiprazol en estado sólido; y
- (b) recubriendo la cáscara toda o la mayor parte de la superficie del núcleo, y comprendiendo la cáscara un polímero biodegradable, estando el contenido de aripiprazol comprendido entre 55 y 95% en masa de la masa total de la microesfera.
- 10 2. Microesferas según la reivindicación 1, que tienen un tamaño de partícula medio de 20 a 150 μm .
3. Microesferas según la reivindicación 1 o 2, en las que la cáscara tiene un grosor medio de 0,5 a 20 μm .
- 15 4. Microesferas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que el polímero biodegradable es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo formado por ácidos polilácticos y copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico.
5. Microesferas según la reivindicación 4, en las que los ácidos polilácticos o los copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tienen un peso molecular comprendido entre 5000 y 200000.
- 20 6. Procedimiento para producir microesferas con una estructura de núcleo/cáscara y una forma esférica,
- (a) comprendiendo el núcleo aripiprazol en estado sólido; y
- 25 (b) recubriendo la cáscara toda o la mayor parte de la superficie del núcleo, y comprendiendo la cáscara un polímero biodegradable,
- comprendiendo dicho procedimiento:
- 30 i) preparar una solución que contiene aripiprazol, un polímero biodegradable, y un solvente orgánico;
- ii) mezclar la solución obtenida en la etapa (i) con agua para obtener una emulsión Aceite/Agua, en condiciones eficaces para inhibir la evaporación del solvente orgánico; y
- 35 (iii) eliminar el solvente orgánico de por lo menos parcialmente la emulsión Aceite/Agua, en condiciones eficaces para permitir que el aripiprazol se precipite en forma de partículas esféricas.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el solvente orgánico utilizado en la etapa (i) es un solvente orgánico inmiscible en agua.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 6 o 7, en el que el agua utilizada en la etapa (ii) contiene un emulsionante.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la etapa (ii) comprende las subetapas que consisten en (a) dispersar la solución obtenida en la etapa (i) en agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión Aceite/Agua y en (b) dispersar la emulsión Aceite/Agua obtenida en la subetapa (a) en agua en presencia o ausencia de un emulsionante para formar una emulsión Aceite/Agua.
- 45 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que en la etapa (ii), la emulsión Aceite/Agua se produce en condiciones de baja temperatura eficaces para inhibir la evaporación del solvente orgánico, y en la etapa (iii), la emulsión a baja temperatura obtenida en la etapa (ii) se agita en un sistema abierto a temperatura ambiente para permitir que el solvente orgánico se volatilice.
- 50 11. Microesferas según la reivindicación 1, con una estructura de núcleo/cáscara y una forma esférica,
- 55 (a) comprendiendo el núcleo aripiprazol en estado sólido; y
- (b) recubriendo la cáscara toda o la mayor parte de la superficie del núcleo, y comprendiendo la cáscara un polímero biodegradable, obtenibles mediante el procedimiento definido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
- 60 12. Formulación de una suspensión acuosa inyectable, que comprende las microesferas según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5 y 11, un vehículo de la misma, y agua para inyección.
- 65 13. Formulación de una suspensión acuosa inyectable según la reivindicación 12, en la que el vehículo comprende:

- (1) uno o más agentes suspensores,
- (2) uno o más agentes isotónicos, y
- (3) opcionalmente, uno o más agentes de ajuste del pH.

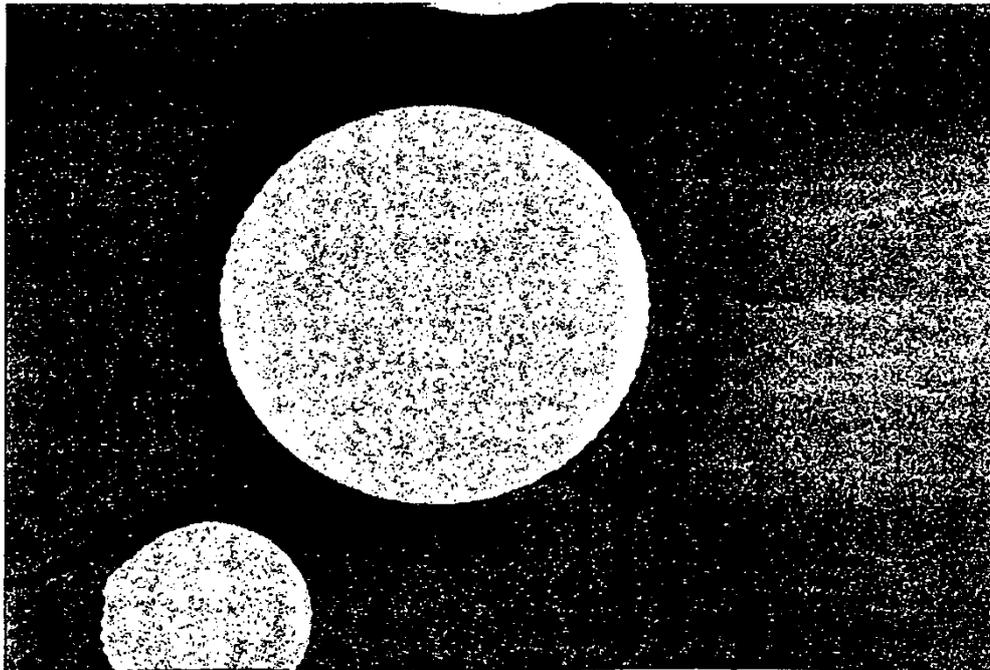
5 14. Formulación de una suspensión acuosa inyectable según la reivindicación 12 o 13 para su uso en el tratamiento de la esquizofrenia.

Fig.1



100 μm

Fig.2



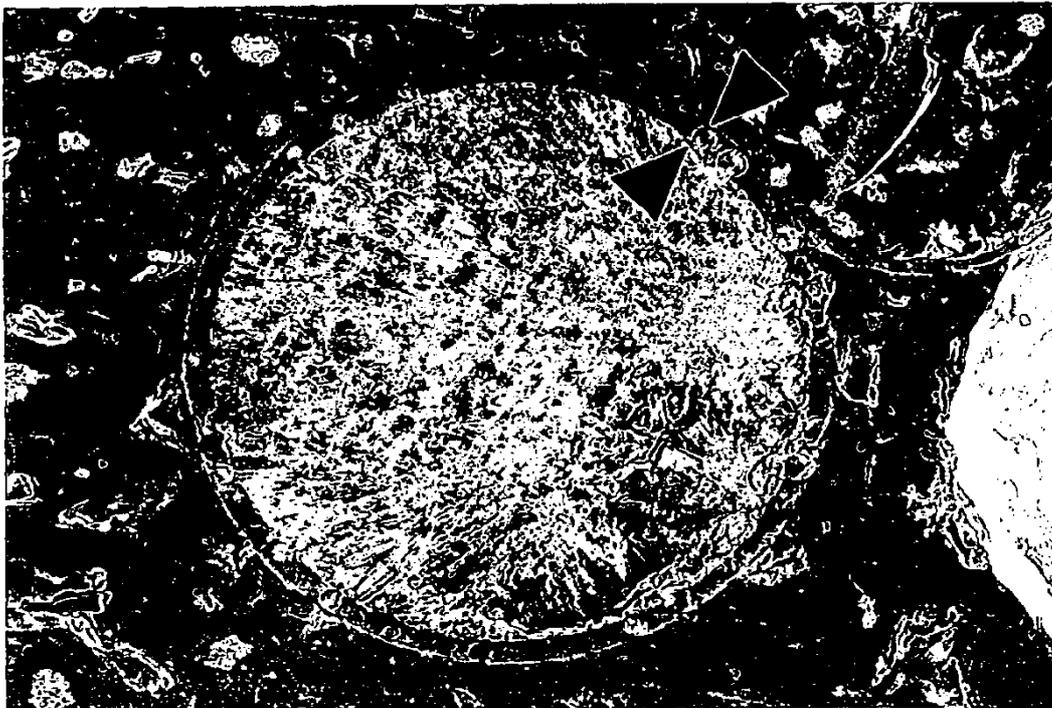
5,00 μm

Fig.3



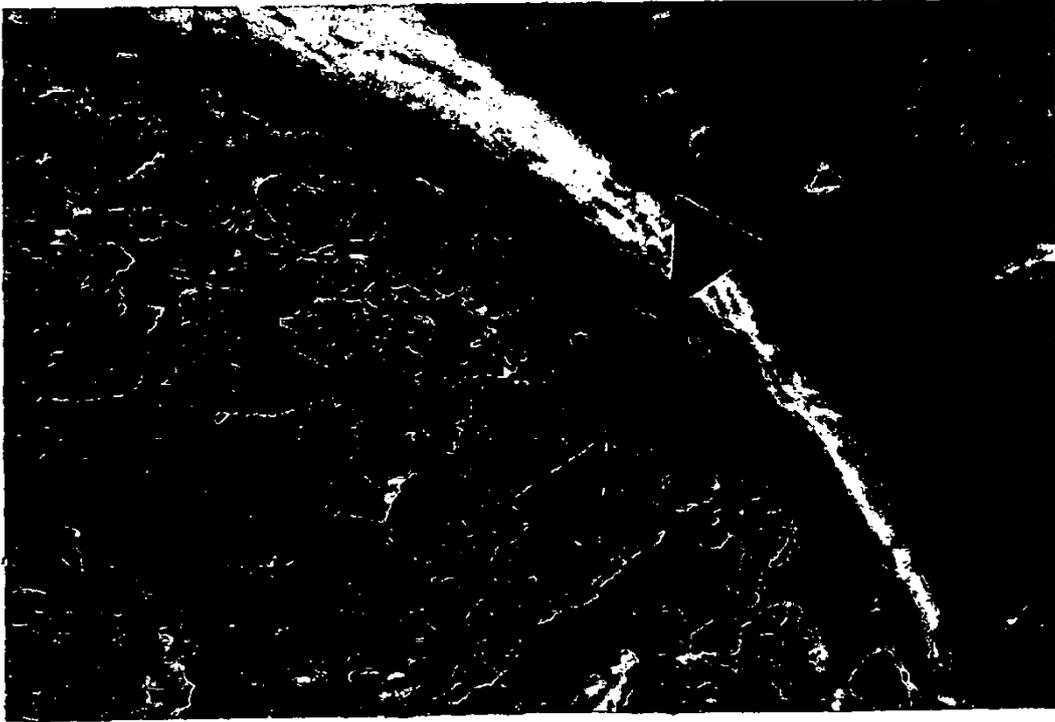
—
20, 0 μm

Fig.4



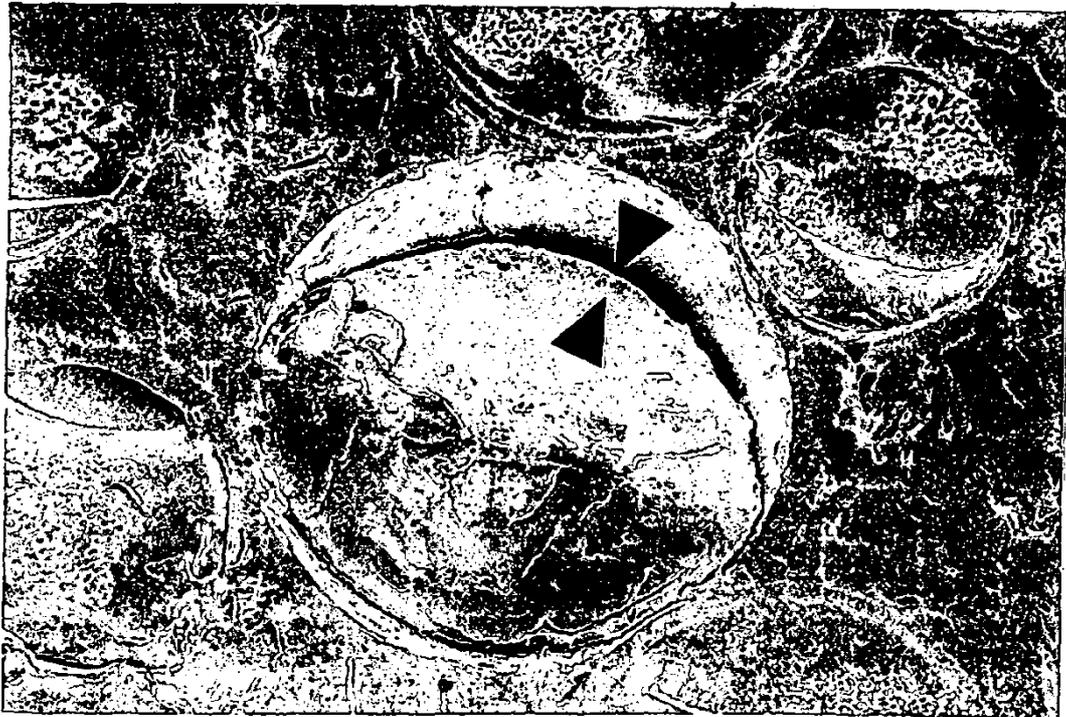
—
20, 0 μm

Fig.5



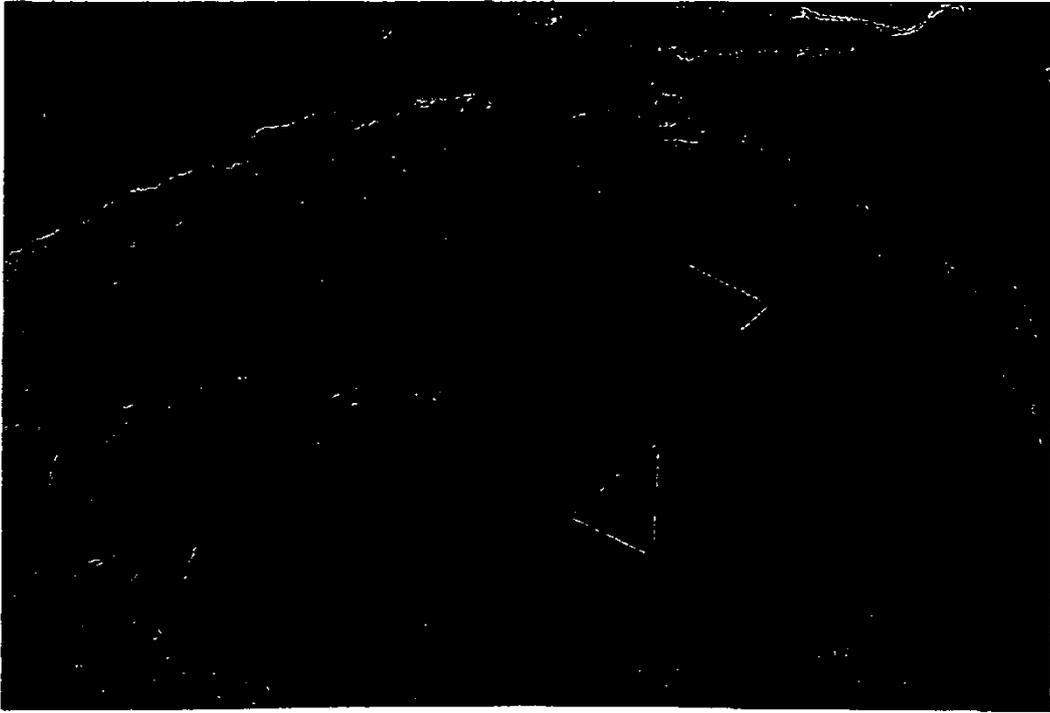
5, 00 μm

Fig.6



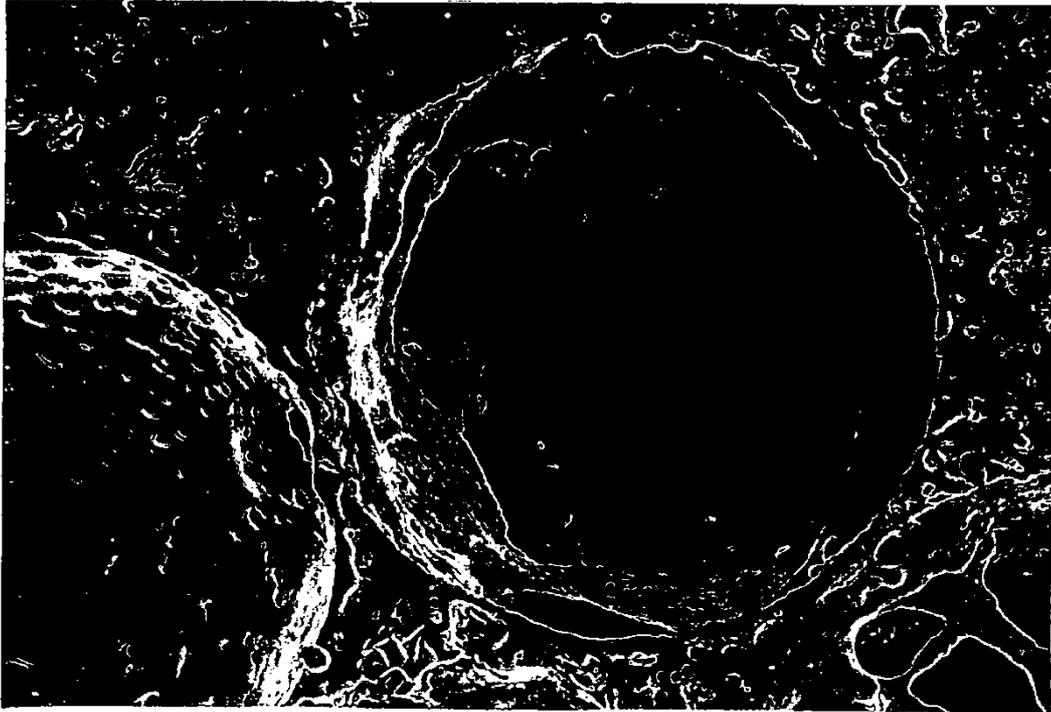
10, 0 μm

Fig.7



4, 00 μm

Fig.8



20, 0 μm

Fig.9

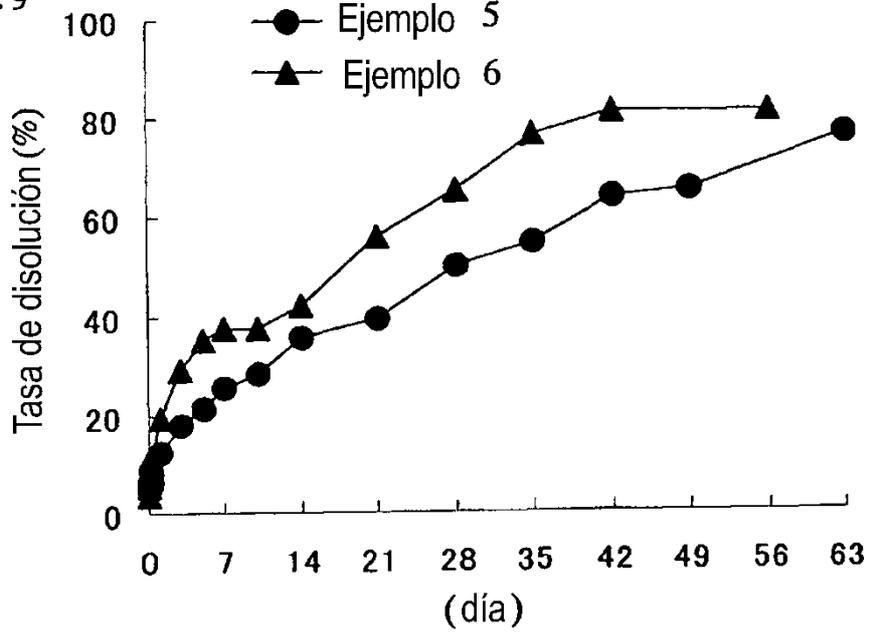


Fig.10

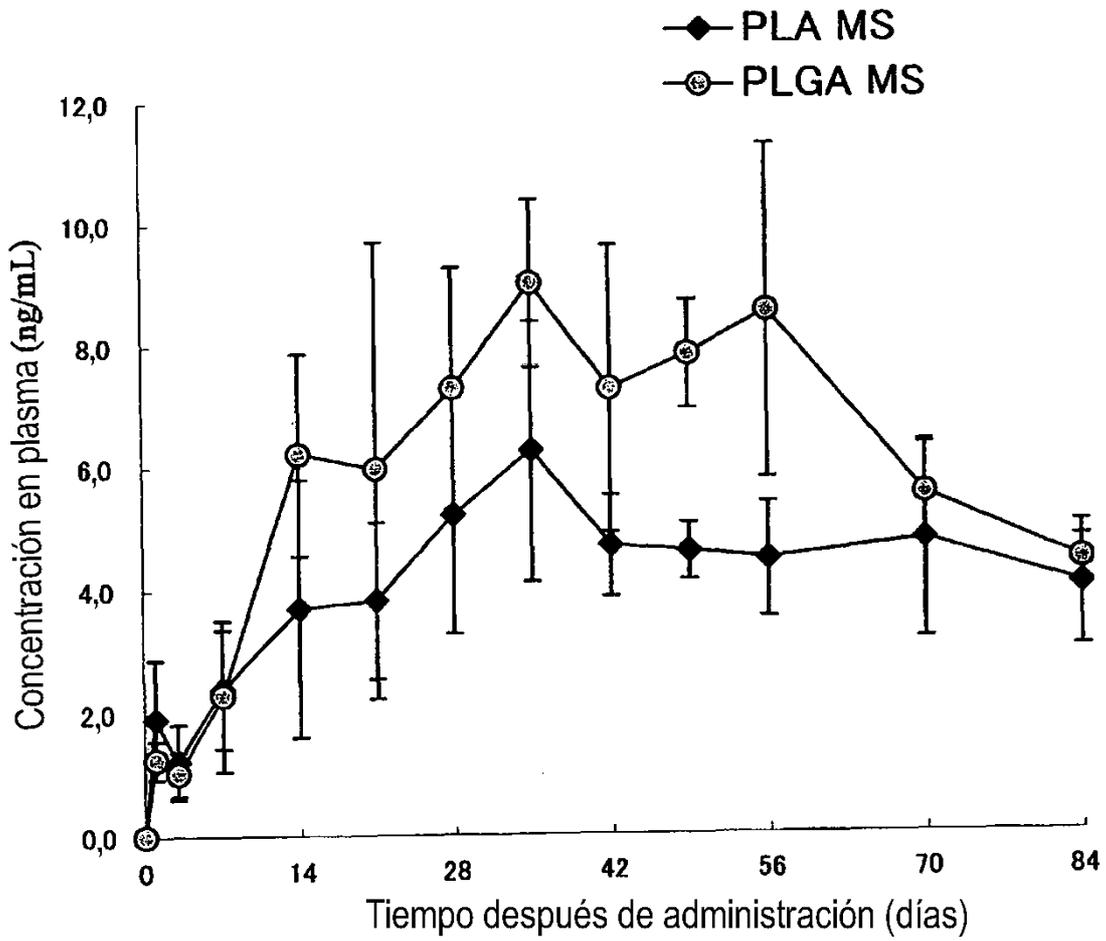
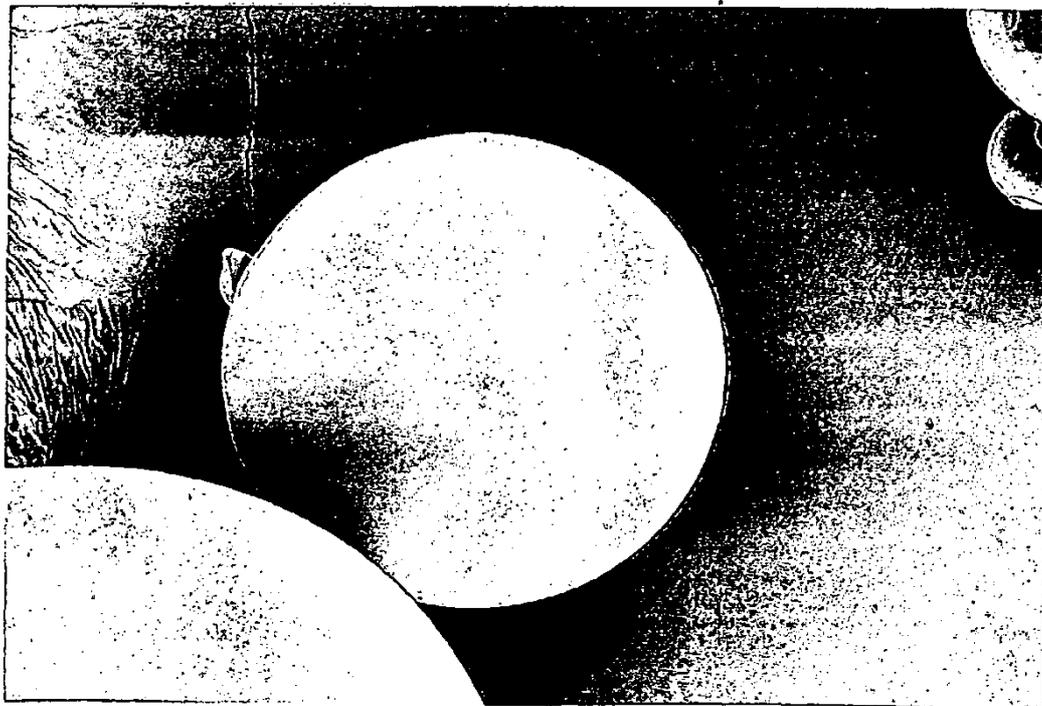


Fig.11



100 μm

Fig.12



100 μm

Fig.13



20, 0 μ m

Fig.14



4, 00 μ m