

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 111**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/127** (2006.01)

**A61K 9/51** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2006 PCT/US2006/048770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2008 WO08005045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2006 E 06851496 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1973837**

54 Título: **Partículas nanolipídicas**

30 Prioridad:

**30.12.2005 US 755171 P**

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

**18.07.2017**

73 Titular/es:

**NUVESSL INC. (100.0%)  
1250, 639 - 5th Avenue S.W.  
Calgary, Alberta T2P 0M9, CA**

72 Inventor/es:

**FOUNTAIN, MICHAEL, W.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 625 111 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

Partículas nanolipídicas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere al campo de incorporación de moléculas pasajero en vesículas lipídicas.

**Antecedentes de la invención**

10 La incorporación de moléculas pasajero, tales como principios activos farmacéuticos, en vesículas lipídicas, tales como liposomas, se ha notificado en la técnica anterior. En la patente 5.269.979 se ha divulgado un portador anfipático indicado como Microportador de dilución en disolvente ("SDMC"). En general, la patente '979 describió la fabricación de una pluralidad de vehículos SDMC mediante la solubilización de un material anfipático y una molécula pasajero en una primera cantidad de un disolvente no acuoso. Después de esto, se añadió una primera cantidad de agua, que formó una suspensión turbia. En una etapa posterior, se añadió una segunda cantidad de disolvente no acuoso para formar una solución ópticamente transparente. La última etapa de una realización preferente era organizar la solución ópticamente transparente en vehículos SDMC mezclando con aire o una segunda cantidad de agua.

20 En la patente 5.879.703, se describió un método para preparar una solución precursora estable en almacenamiento útil para la encapsulación remota de principios activos. En '703, la solución precursora se preparó solubilizando un material anfipático en un disolvente no acuoso. Se añadió a la primera mezcla una cantidad de agua para formar una solución precursora caracterizada por claridad óptica y que era monofásica a temperatura ambiente. La solución precursora se podría almacenar durante un período de tiempo prolongado y el principio activo deseado se añadió en un momento posterior, tal vez en una ubicación remota, para formar una solución precursora cargada. Los SDMC podrían formarse, en realizaciones preferentes, a partir de la solución precursora cargada mediante dilución con agua o mezcla con aire. Los SDMC tenían un tamaño que oscilaba entre aproximadamente 230 y aproximadamente 412 nanómetros de tamaño.

30 Aunque los SDMC y la solución precursora estable en el almacenamiento proporcionaron la fabricación de vehículos adecuados para liberar los principios activos en diversas aplicaciones, seguía existiendo la necesidad de vehículos mejorados para la liberación de moléculas pasajero.

35 Se ha descubierto ahora que la solución precursora estable en almacenamiento, tal como la descrita en la patente '703, se puede usar como material de partida en un método novedoso que da como resultado vehículos de un tamaño más pequeño que el descrito anteriormente. El material de partida se manipula mediante dilución con un disolvente no acuoso, antes o después de la carga con una molécula pasajero, para proporcionar una o más poblaciones definidas de partículas nanolipídicas ("PNL") cuyo tamaño varía de aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 20 nanómetros. Las PNL se forman a partir de las PNL cuyo tamaño varía de aproximadamente 30 nanómetros a aproximadamente 200 nanómetros. Además, se ha descubierto que las PNL pueden usarse en un método para fabricar preparaciones de vehículo portador que son vehículos portadores más pequeños y más grandes mezclados o que tienen un tamaño medio mayor de aproximadamente 200-300 nanómetros, pero mejor encapsulación de moléculas pasajero.

45 La presente invención se refiere a un método para fabricar una población de conjuntos de partículas nanolipídicas [PNL], que comprende las etapas de:

50 (a) proporcionar una solución precursora monofásica, formándose dicha solución precursora monofásica mediante; solubilización de un material anfipático que comprende fosfolípidos en una primera cantidad de disolvente no acuoso; adición de una cantidad de agua para formar una suspensión turbia; y adición de una segunda cantidad de disolvente no acuoso hasta que la suspensión turbia sea monofásica y tenga claridad óptica a temperatura ambiente;

55 (b) mezclar una molécula pasajero seleccionada del grupo que consiste en moléculas pasajero lipófilas y anfipáticas con dicha solución precursora monofásica para formar una población de vehículos cargados;

(c) diluir dicha población de vehículos cargados con una o más alícuotas de disolvente no acuoso para formar una población de partículas cargadas con PNL;

60 (i) dicho disolvente no acuoso se añade de manera secuencial a la solución precursora después de la adición de una molécula pasajero,

(ii) dicha población de vehículos cargados se combina con dicho disolvente no acuoso en una proporción que varía de aproximadamente 1 parte de la población de vehículo cargado a 20 partes de disolvente no acuoso, a una proporción de 1 parte de la población de vehículo cargado a 0,3 partes de disolvente no acuoso,

65 (iii) donde dicha dilución de dicha población de vehículo cargado forma una población de partículas cargadas con PNL que tienen partículas nanolipídicas (PNL) de 1 nm a 20 nm de tamaño, disminuyendo dicho tamaño de las PNL a medida que aumenta la concentración de dicho disolvente no acuoso,

y

(d) mezclar una alícuota de dicha población de PNL cargadas con un disolvente acuoso para formar una población de conjuntos de PNL, que tienen un diámetro medio de partícula de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 nm.

5

### Descripción detallada

Las partículas nanolipídicas ("PNL") de acuerdo con la presente invención tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nanómetros, medido mediante una técnica estándar de dispersión de luz láser, que se trata con detalle en el presente documento. Pueden prepararse varias subpoblaciones de PNL. Las distintas subpoblaciones preferentes de NLP tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nm, de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 nm, de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 14 nm, de aproximadamente 14 a aproximadamente 18 nm y de aproximadamente 18 a aproximadamente 20 nm. Una subpoblación preferente comprende PNL que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 9 a 10 nanómetros.

15

Las PNL se hacen a partir de una solución precursora como se describe en la patente de Estados Unidos 5.879.703, Como se indica en la patente '703, se puede preparar una solución precursora solubilizando un material anfipático en una primera cantidad de un disolvente no acuoso apropiado para solubilizar el material anfipático para formar una primera mezcla. El material anfipático comprende fosfolípidos (FL). Un FL preferente comprende uno o más de los siguientes fosfátidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol (PI). En una realización preferente, se combinan PC, PE, PA y PI. Una proporción preferente de FL útiles en la invención es PC:PE:PA:PI de 6,5:2,5:0,7:0,3 en etanol. Preferentemente, se solubiliza un gramo de FL en 5,0-7,5 ml de disolvente de etanol.

20

Tras la disolución del material anfipático, se añade una cantidad de agua para formar una suspensión turbia. La cantidad de agua a añadir es de aproximadamente 9 kg a 31 kg de material anfipático disuelto, pero se puede variar para dar lugar a la suspensión turbia deseada. Se añade una segunda cantidad de disolvente no acuoso, tal como etanol, hasta que la suspensión turbia es monofásica y tiene la claridad óptica a temperatura ambiente. Este producto resultante es una solución precursora que es estable en el almacenamiento a lo largo del tiempo.

25

En la patente '703, se divulgó que una solución precursora preparada de acuerdo con el proceso divulgado en la misma era estable en el almacenamiento durante hasta al menos dos años, y tal vez más, siempre y cuando permanezca en estado monofásico. Recientemente se ha determinado que las soluciones precursoras hechas mediante este método son estables durante al menos ocho años, con independencia de la fabricación, la localización, la estación, el año y el lote.

30

Actualmente, se ha descubierto que la solución precursora, tal como la divulgada en '703 se puede usar como material de partida para preparar partículas nanolipídicas (PNL) y conjuntos de PNL. En '703, se divulgó que la solución precursora era útil para preparar SDMC en un momento posterior y, tal vez, una ubicación remota. Los SDMC tienen un diámetro de aproximadamente 230 a aproximadamente 412 nm. Por el contrario, las PNL tienen un diámetro medio de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 20 nm y los conjuntos de PNL tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 200 nm.

35

Pueden hacerse diversas poblaciones de conjuntos de PNL para diversas aplicaciones. Las poblaciones preferentes oscilan de aproximadamente 40-60 nm; aproximadamente 60-80 nm; aproximadamente 80-110 nm; aproximadamente 110-140 nm; y aproximadamente 150-200 nm. Las poblaciones del conjunto de PNL tienen, generalmente, un diámetro un 20-30 % más pequeño que los SDMC para la misma molécula pasajero.

40

Una población ligeramente mayor o población mixta de vehículos portadores se denomina en el presente documento ECV o vehículos portadores de encapsulación. Aunque se superponen al diámetro medio de los SDMC, el ECV se fabrica utilizando un método diferente que emplea PNL y el resultado es una población de vehículos portadores que se ha descubierto que exhiben una eficacia de encapsulación mayor. Se describe que los ECV tienen un diámetro medio de aproximadamente 200 nm a 300 nm.

45

Para fabricar portadores de moléculas pasajero de acuerdo con el método divulgado, tales como poblaciones de PNL, conjuntos de PNL o ECV, la solución precursora como se ha descrito previamente en la patente '703 se diluye con un disolvente adecuado o un sistema disolvente mixto que es compatible con el sistema de disolvente utilizado en la solución precursora. Esta dilución se realiza antes o después de la adición de la molécula pasajero, como se describirá con más detalle a continuación. El disolvente se selecciona para determinar la biocompatibilidad si el uso final de los portadores va a requerir esa característica. El disolvente o el sistema disolvente mixto utilizado para la dilución debe ser miscible con los disolventes en la solución precursora y debería ser eficaz para dispersar en lugar de disolver los portadores. Más preferentemente, el disolvente utilizado para la dilución es etanol, ya que posee las cualidades deseadas. La dilución se lleva a cabo, preferentemente, de una manera secuencial o en serie. Por ejemplo, una primera dilución de 1:10 proporciona una población de portadores y una dilución adicional en serie a aproximadamente 1:0,5 proporciona una serie de poblaciones de portadores. El tamaño de los portadores en cada

50

55

60

65

dilución puede determinarse mediante dispersión de luz láser. Pueden crearse poblaciones mixtas de PNL y vesículas más grandes con diluciones más bajas con el disolvente no acuoso. Un instrumento adecuado para este fin es el Zetasizer 1000, fabricado por Malvern Instruments, (Worcestershire, Reino Unido). Los diámetros de las partículas indicados en el presente documento fueron determinantes usando el Modo de Análisis Multimodal del Zetasizer 1000 para determinar el tamaño de partícula por intensidades máximas. Se pueden usar otras técnicas para analizar el tamaño de partícula, cuyos resultados pueden correlacionarse con los valores numéricos obtenidos con la técnica de dispersión de luz descrita en el presente documento.

La adición de la molécula pasajero deseada se produce antes de la dilución con el disolvente si la molécula pasajero es lipófila o anfipática. La adición se produce después de que la dilución de la molécula de pasajero sea soluble en agua.

Por lo tanto, en el caso de una molécula pasajero lipófila o anfipática, las poblaciones cargadas de PNL se forman tras la dilución con el disolvente. Las poblaciones de conjuntos de PNL o ECV se forman mediante la dilución de la población cargada de PNL en agua.

En el caso de una molécula pasajero soluble en agua, la solución precursora se mezcla con una molécula pasajero disuelta en agua. Las poblaciones de conjuntos de PNL o ECV se forman tras la dilución con el disolvente no acuoso. Si se utiliza una técnica de dilución en serie, se forman poblaciones distintas.

Basándose en las curvas observadas de diferentes clases de compuestos, pueden establecerse intervalos para la población de conjuntos de PNL terminada para cada población de PNL usada para formar la población final de conjuntos de PNL. Cuanto más disolvente no acuoso se utilice para diluir las PNL, más pequeñas serán las poblaciones de conjuntos de PNL.

Varias poblaciones cargadas de PNL pueden mezclarse y adaptarse para proporcionar un producto de conjunto de PNL multifuncional. Como un solo ejemplo, en un producto para el cuidado de la piel, puede ser deseable proporcionar tópicamente vitamina E y un antibiótico en una sola preparación. Las diferentes poblaciones cargadas de PNL dentro del conjunto de PNL podrían proporcionar una preparación que permita que un principio activo sea absorbido, preferentemente, en lugar del otro, lo que permite un control de las velocidades de penetración de diferentes ingredientes en una sola preparación. Como alternativa, una única población de PNL podría cargarse con más de una molécula pasajero para proporcionar la multifuncionalidad.

Un producto de conjunto de PNL multifuncional inyectable también podría proporcionar ventajas: Debido a la capacidad novedosa de LA PRESENTE invención para producir poblaciones bien definidas de poblaciones extremadamente pequeñas (menores que 150 nm), pueden producirse productos de PNL que tienen semividas en suero considerablemente aumentadas. Tales partículas pueden ser capaces de evadir la captación inicial por el sistema inmunológico del cuerpo y, posiblemente, ayudar en la liberación de cargas de fármacos a células y tejidos que no son fácilmente accesibles por mecanismos de liberación vascular normales; es decir, la liberación a través de la barrera hematoencefálica y la liberación extravascular de cargas de fármacos a órganos y tejidos seleccionados o dirigidos.

La capacidad para seleccionar una población de PNL de un tamaño preferente para una aplicación dada proporciona ventajas también al proceso de fabricación. Se requerirá menos material para formar el producto final si se selecciona una solución precursora de PNL para una necesidad de tamaño concreta. La eficiencia de la carga también aumenta. El número de partículas de PNL aumenta a medida que disminuye el tamaño de las poblaciones de PNL en función del diámetro decreciente del producto de PNL esféricas (asumiendo que la cantidad de lípido en la molécula pasajero permanece constante). Esto puede proporcionar una mayor concentración de molécula pasajero por unidad de volumen.

Otra ventaja de la tecnología PNL es que se puede preparar una solución ópticamente transparente que contiene PNL cargadas con moléculas pasajero mediante la selección de condiciones en las que las PNL tienen un tamaño inferior a aproximadamente 150 nm. Muchas veces es importante que un producto aparezca ópticamente transparente o no logrará la aceptación del consumidor. Por ejemplo, las PNL cargadas en una solución ópticamente transparente tienen aplicación en la industria de bebidas y en la industria farmacéutica para productos líquidos. Como ejemplo, se puede preparar un colutorio que contenga PNL que encapsulen un ingrediente para la liberación en el tiempo en la boca. Un consumidor prefiere comprar un colutorio ópticamente transparente en lugar de uno turbio.

Las moléculas pasajero adecuadas para su uso en la formación de una población cargada de PNL son numerosas. En una realización, En una realización, se pueden seleccionar moléculas pasajeras que exhiben solubilidad lipídica o son anfipáticas. Estas moléculas tienen perfiles de solubilidad adecuados idealmente para cargar en PNL. Las moléculas solubles en agua se pueden incorporar en las PNL mediante solubilización en la solución acuosa usada para formar el producto de PNL acabado. Usando estos dos enfoques, prácticamente cualquier molécula puede incorporarse como una molécula pasajero en productos de PNL de tamaños definidos. Se puede utilizar un uso innovador de ambos enfoques para incorporar compuestos solubles tanto en lípidos como en agua en un producto

de conjunto de PNL incorporando primero compuestos liposolubles en las PNL antes de la dilución con etanol y, en segundo lugar, incorporando una o más moléculas solubles en agua en la solución acuosa usada para formar el producto de PNL acabado de tamaño definido.

- 5 Se han incorporado numerosas moléculas pasajero en las PNL. Por ejemplo, se pueden usar vitaminas liposolubles como molécula pasajero. Se ha descubierto que las vitaminas D, E y K son adecuadas para las PNL.

10 Las vitaminas solubles en agua, tal como vitamina B y C, también se pueden utilizar como moléculas pasajero. Tanto las vitaminas hidrosolubles como las liposolubles se pueden combinar en un conjunto de PNLP, si se desea administrar ambas usando la técnica tratada anteriormente.

15 También pueden usarse moléculas pasajero de modo que sean útiles en protectores solares. La benzofenona (absorbente de UVB y UVA), por ejemplo, por ejemplo, puede usarse apropiadamente como una molécula pasajero de PNL.

Otras moléculas pasajero preferentes son antibióticos, tales como aminoglucósidos (gentamicina), beta-lactámidos (penicilina G) y macrólidos (eritromicina). Los anestésicos, como la lidocaína, se han incorporado de forma eficaz en las PNL, al igual que los esteroides y los antifúngicos (griseofulvina).

20 Las PNL también pueden utilizarse en la industria de alimentos y bebidas. Por ejemplo, Las PNL que incorporan cafeína se pueden utilizar en suplementos dietéticos para la supresión del apetito. Se ha descubierto que la encapsulación en PNL es eficaz para enmascarar el sabor de la molécula pasajero si se desea evitar saborear la misma tras la ingestión.

25 Otra aplicación en la industria de alimentos y bebidas es la incorporación de sustancias en las PNL que se van a probar, en lugar de enmascarar. Los aromatizantes, tales como aceite de menta y otros aceites, se incorporan adecuadamente en las PNL. La encapsulación de sustancias que contienen aceite puede conducir a una mayor vida útil durante el almacenamiento, ya que la sustancia encapsulada está protegida contra la oxidación. Además, la encapsulación de sustancias permitiría opciones adicionales para los fabricantes y los consumidores. Como un solo ejemplo, un fabricante de una bebida podría preparar y embotellar un sabor base. A continuación, el consumidor tendría la opción de añadir paquetes de PNL a la bebida para satisfacer las preferencias de sabor del consumidor o para enriquecerla con vitaminas. Un consumidor que prefiere un fuerte aroma de menta en una bebida de chocolate podría añadir a su bebida PNL que contengan aceite de menta. Las sustancias que van a saborearse también se pueden asociar de forma laxa con el exterior de la PNL proporcionando tales sustancias en la fase acuosa del procedimiento. Por ejemplo, una PNL que contiene una vitamina que, preferentemente, no debe saborearse, puede tener un sabor agradable en el exterior de la misma. Si se desea que las PNL permanezcan en la boca para que su contenido pueda saborearse, puede unirse un carbohidrato natural o azúcar a la PNL simplemente proporcionándolo en la solución acuosa. Este se adherirá al interior de la boca durante un período de tiempo y la química normal de la boca y la masticación liberarán el contenido de las PNL para proporcionar el efecto deseado. Las PNL también pueden someterse a agitación y cizalladura, tal como en un mezclador o equipo industrial pesado en un sitio de fabricación para proporcionar aromatizantes a alimentos y bebidas.

45 Las PNL también pueden usarse para la incorporación de péptidos. En las PNL se han incorporado con eficacia tripéptidos, tetrapéptidos, hexapéptidos y nonapéptidos.

Las PNL también pueden ser útiles en industrias que requieren colorantes como ingrediente. Se pueden usar colorantes solubles en agua y solubles en lípidos.

50 Las PNL pueden utilizarse para incorporar aceites de diversos tipos, tales como aceites esenciales y aceites perfumados, en los productos. Ejemplos de tales productos son lociones, emulsiones, cremas, cosméticos, cosmeceúticos y perfumes. Las PNL pueden cargarse con los aceites y proporcionar al producto una función de liberación en el tiempo, lo que permite que el ingrediente deseado se libere durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, la esencia de un perfume podría incorporarse en una o más poblaciones de tamaños de PNL y liberar la esencia durante un período de tiempo más largo que la esencia no incorporada en las PNL.

55 Si la molécula pasajero deseada es soluble en agua, la molécula pasajero debe, en primer lugar, disolverse en agua. La etapa de incorporación, o carga de la molécula pasajero en la PNL, se logra cuando el producto de PNL se forma mediante la adición de la molécula pasajero disuelta a la solución precursora.

60 **Ejemplo preparatorio 1: Uso de una solución precursora estable durante el almacenamiento como ingrediente de partida para las partículas nanolipídicas**

65 Se usó la solución precursora estable durante el almacenamiento (lote de fabricación 0013-040010) para preparar PNL de diversas poblaciones de tamaño definido. Utilizando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern (Zetasizer 1000), se midió que las poblaciones nacientes de PNL eran de 9 nm. Para preparar poblaciones de conjuntos de PNL de tamaños definidos, se siguió el siguiente procedimiento: se introdujeron alícuotas de 1 ml de la

solución precursora de reserva (lote 0013-040010) en tubos de ensayo de 10 ml. Para preparar poblaciones definidas del producto de PNL, se añadieron varias cantidades de etanol a cada una de las preparaciones de la muestra. Después de la formación de las preparaciones de PNL, se añadieron alícuotas de 1 ml de cada muestra a 20 ml de agua destilada usando una pipeta de 2 ml. Cada preparación se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se extrajeron alícuotas de 2 ml, se sometieron a agitación en vórtex durante 20 segundos y, a continuación, se sometieron a análisis de tamaño usando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern. En la Tabla 1 se muestran los resultados.

**TABLA 1**

Solución precursora de reserva	Etanol	Sin pasajero	Tamaño
1 ml	0 ml	[Control]	278 nm
1 ml	0,2 ml	[Población mixta]	242 nm
1 ml	0,5 ml	[Conjunto de PNL]	186 nm
1 ml	0,8ml	[Conjunto de PNL]	160 nm
1 ml	1,0ml	[Conjunto de PNL]	138 nm
1 ml	2,0ml	[Conjunto de PNL]	110 nm
1 ml	3,0ml	[Conjunto de PNL]	98 nm
1 ml	5,0ml	[Conjunto de PNL]	61 nm
1 ml	10 ml	[Conjunto de PNL]	34 nm

10

**Ejemplo 2: Partículas nanolipídicas con moléculas pasajero solubles en lípidos**

Se usó la solución precursora estable durante el almacenamiento (lote de fabricación 0013-040010) para preparar PNL de diversas poblaciones de tamaño definido. Utilizando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern (Zetasizer 1000) se midió que las poblaciones nacientes de PNL eran de 9 nm. Para preparar poblaciones de PNL con vitamina K1 de tamaños definidos se siguió el siguiente procedimiento: A 10 ml de la solución de reserva estable durante el almacenamiento (lote 0013-040010) se añadieron 10 mg de vitamina K1. El material se solubilizó mediante agitación en vórtex, dando una preparación de PNL cargada con una concentración eficaz de 1 mg/ml de Vitamina K1. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de las PNL cargadas con vitamina K1 en tubos de ensayo de 10 ml. Para preparar poblaciones definidas del producto de PNL, se añadieron varias cantidades de etanol a cada una de las preparaciones de la muestra. Después de la formación de las preparaciones de PNL, se añadieron alícuotas de 1 ml de cada muestra a 20 ml de agua destilada usando una pipeta de 2 ml. Cada preparación se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se extrajeron alícuotas de 2 ml, se sometieron a agitación en vórtex durante 20 segundos y, a continuación, se sometieron a análisis de tamaño usando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern. Las preparaciones de vitamina K1 resultantes se muestran en la Tabla 2.

15

20

25

**TABLA 2**

Solución precursora de reserva	Etanol	Vitamina K1	Tamaño
1 ml	0ml	[Control]	271 nm
1 ml	0,5ml	[Población mixta]	229 nm
1 ml	1,0	[Conjunto de PNL]	76 nm
1 ml	2,0	[Conjunto de PNL]	51 nm
1 ml	5,0	[Conjunto de PNL]	40 nm
1 ml	10,0	[Conjunto de PNL]	30 nm

30

**Ejemplo comparativo 3: PNL con moléculas pasajero solubles en agua**

Se usó la solución precursora estable durante el almacenamiento (lote de fabricación 0013-040010) para preparar PNL de diversas poblaciones de tamaño definido. Utilizando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern (Zetasizer 1000) se midió que las poblaciones nacientes de PNL eran de 9 nm. Para preparar poblaciones de PNL

con eritromicina de tamaños definidos se siguió el siguiente procedimiento: Se preparó una solución de reserva (150 ml) de eritromicina 1 mg/ml mediante la adición de eritromicina a 150 ml de agua destilada. La solución se solubilizó mediante agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de los materiales de partida de las PNL en tubos de ensayo de 10 ml. Para preparar poblaciones definidas del producto de PNL con eritromicina incorporada se añadieron varias cantidades de etanol a cada una de las preparaciones de la muestra. Después de la formación de las preparaciones de PNL, se añadieron alícuotas de 1 ml de cada muestra a 20 ml de la solución de reserva de eritromicina en agua 1 mg/ml usando una pipeta de 2 ml. Cada preparación se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se extrajeron alícuotas de 2 ml, se sometieron a agitación en vórtex durante 20 segundos y, a continuación, se sometieron a análisis de tamaño usando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern. En la Tabla 3 se muestran los resultados.

TABLA 3

Solución precursora de reserva	Etanol	Eritromicina	Tamaño
1 ml	0ml	[Control]	289 nm
1 ml	0,5ml	[Conjunto de PNL]	162 nm
1 ml	1,0ml	[Conjunto de PNL]	141 nm
1 ml	2,0ml	[Conjunto de PNL]	105 nm
1 ml	5,0ml	[Conjunto de PNL]	66 nm
1 ml	10,0ml	[Conjunto de PNL]	52 nm

**Ejemplo 4: PNL con moléculas pasajero tanto solubles en lípidos como en agua**

Se usó la solución precursora estable durante el almacenamiento (lote de fabricación 0013-040010) para preparar PNL de diversas poblaciones de tamaño definido. Utilizando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern se midió que las poblaciones nacientes de PNL eran de 9 nm. Para preparar poblaciones de PNL con vitamina B12 (soluble en agua) y vitamina K1 (liposoluble) de tamaños definidos se siguió el siguiente procedimiento: se preparó una solución de reserva (70ml) de vitamina B12 1 mg/ml mediante la adición de 70 mg de vitamina B12 a 70ml de agua destilada. La solución se solubilizó mediante agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se preparó una preparación de PNL cargadas con vitamina K1 mediante solubilización de 10 mg de vitamina K1 en 10 ml del lote de fabricación (0013-040010 de la solución precursora estable durante el almacenamiento. Se introdujeron alícuotas de 1 ml de las PLN cargadas con vitamina K1 en tubos de ensayo de 10 ml. Para preparar poblaciones definidas del producto de PNL con vitamina K1 y vitamina B12 incorporadas se añadieron varias cantidades de etanol a cada una de las preparaciones de la muestra. Después de la formación de las preparaciones de PNL, se añadieron alícuotas de 0,5 ml de cada muestra a 10 ml de la solución de reserva preparada de vitamina B12 en agua 1 mg/ml usando una pipeta de 2 ml. Cada preparación se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos y, después, se extrajeron alícuotas de 2 ml, se sometieron a agitación en vórtex durante 20 segundos y, a continuación, se sometieron a análisis de tamaño usando el instrumento de dispersión de luz láser de Malvern. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Solución precursora de reserva	Etanol	Vitaminas K1 y B12	Tamaño
1 ml	0ml	[Control]	217 nm
1 ml	0,5	[Conjunto de PNL]	122 nm
1 ml	1,0	[Conjunto de PNL]	94 nm
1 ml	2,0	[Conjunto de PNL]	71 nm
1 ml	5,0	[Conjunto de PNL]	68 nm
1 ml	10,0	[Conjunto de PNL]	57 nm

**Ejemplo 5: Preparación de poblaciones definidas - Efecto del disolvente**

Se usó la solución precursora estable durante el almacenamiento (número de lote 0013-040100) como material de partida para la producción de conjuntos de PNL

Se añadieron varias cantidades y tipos de disolvente al material de partida para preparar soluciones de reserva diluidas con disolvente. Los conjuntos de PNL se prepararon convirtiendo las soluciones de reserva diluidas con disolvente mediante la adición de 1 ml de la misma en 20 ml de agua destilada con agitación, usando una placa mezcladora y una barra de agitación a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 5 minutos, se sometió a agitación en vórtex suavemente durante 20 segundos y se colocó en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población del conjunto de PNL resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal.

Además, el tamaño de las PNL nativas presentes en el precursor también se determinó examinando el precursor solo usando el Malvern 1000 con los parámetros como ya se han descrito.

Los datos de la Tabla 5 demuestran que se pueden usar varios disolventes para formar conjuntos de PNL o PNL. Aunque es probable que se seleccione etanol para muchas aplicaciones debido a sus propiedades relativamente no tóxicas, puede ser deseable usar otros disolventes para las características concretas de las PNL.

**TABLA 5**

Solución precursora de reserva ( ml)	Cantidad B de disolvente añadido a A (ml)	Cantidad De agua añadida a 1 ml de A+B (ml)	Tamaño del disolvente etanol (nm)	Tamaño del disolvente metanol (nm)	Tamaño del disolvente 1-propanol (nm)	Tamaño del disolvente 2-propanol (nm)
1*	0*	0*	14*	14*	14*	14*
1*	0*	20*	240*	240*	240*	240*
1	0,5	20	133	191	112	95
1	1	20	ND	ND	ND	46
1	2	20	108	97	66	13*
1	5	20	49	60	23	ND
1	10	20	25	43	ND	ND
Comparativo						

**Ejemplo 6: Uso de calentamiento para controlar el tamaño**

Los conjuntos de NLP y los ECV que se han preparado mediante adición secundaria de disolvente a la solución precursora, tal como en el ejemplo 5, pueden calentarse para reducir aún más (de manera controlada) el tamaño promedio de los mismos. Los conjuntos de PNL y ECV se produjeron usando la solución precursora de reserva (lote número 0013-040010) que contenía PNL nativas de tamaño de aproximadamente 10 nanómetros (medidos usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer con medición del tamaño para poblaciones de partículas configurada a los parámetros multimodales). Se realizaron diluciones con etanol de las porciones de control y de ensayo, como se indica en la Tabla 6, para formar soluciones de reserva diluidas con disolvente. Los conjuntos de PNL y los ECV se prepararon convirtiendo las soluciones de reserva diluidas con disolvente mediante la adición de 1 ml de las mismas a 20 ml de agua destilada con agitación, usando una placa mezcladora y una barra de agitación a temperatura ambiente, como se describe en el ejemplo 5. Se retuvo una porción como control y se retiró una porción para analizar la determinación del efecto del calentamiento sobre la población del conjunto de NLP o la población de ECV.

El calentamiento de la porción de ensayo se llevó a cabo colocando muestras de cinco ml en un tubo de ensayo, que después se bajó en agua hirviendo rápidamente durante 3 minutos. Los tubos que contenían las muestras calentadas de este modo se retiraron del agua hirviendo y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después se agitaron en vórtex durante 20 segundos. El control se trató de la misma manera con la excepción de que no se calentó.

Una alícuota de cada porción (control y calentada) se transfirió a una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población del conjunto de PNL resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal.



**TABLA 6**

Solución precursora de reserva ( ml)	Etanol (ml)	B Agua (añadida a 1 ml de A+B ) (ml)	Tamaño (nm) Sin calentamiento	Tamaño (nm) Con calentamiento	% Reducción con calentamiento
1	0*	0*	10*	10*	0*
1	0	20	252	158	37,3
1	0,5	20	188	125	33,5
1	2	20	138	96	30,4
1	5	20	57	35	38,6
1	10	20	36	26	31
*Comparativo					

Los resultados de estas evaluaciones demuestran que el calentamiento de los conjuntos de PNL o ECV redujo el tamaño de los vehículos portadores resultantes de una manera controlada con una reducción promedio del 34 %. Debido a que estos resisten el calor, es posible no solo reducir el tamaño de las PNL sino usar técnicas de calentamiento y esterilización, tal como la pasteurización instantánea, lo que es deseable en la industria de alimentos y bebidas para controlar la carga bacteriana. Esto se puede llevar a cabo a temperaturas de hasta 220 grados Fahrenheit con el intervalo habitual de aproximadamente 180 a 220 grados Fahrenheit.

**10 Ejemplo comparativo 7: Enmascaramiento del sabor de las moléculas mediante encapsulación en preparaciones de PNL**

Los portadores de encapsulación se prepararon usando una solución precursora estable durante el almacenamiento (número de lote 0013-050015) como una solución de reserva. Se determinó que el tamaño de las PNL nativas en la reserva era de 8 nm usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. Se realizaron tres preparaciones. La preparación A se realizó sin NaCl como molécula pasajero; se realizó la preparación B en la que se encapsuló NaCl como una molécula pasajero usando una solución de 0,9 g de NaCl por 100 ml de agua; y la preparación C se realizó usando una preparación de PNL precargada.

Preparación A: Se prepararon partículas sin NaCl mediante la adición de 1 ml de solución de reserva en 100 ml de agua destilada, mientras se agitaba usando una placa mezcladora y una barra de agitación a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 5 minutos y se sometió a agitación suave en vórtex durante 20 segundos y colocó en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal. El tamaño de partícula obtenido fue 274 nm.

Preparación B: Se prepararon partículas con NaCl mediante la adición de 1 ml de solución de reserva en 100 ml de agua destilada que contenía 0,9 g de NaCl, mientras se agitaba usando una placa mezcladora y una barra de agitación a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 5 minutos, después se sometió a agitación suave en vórtex durante 20 segundos y colocó en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población de vehículo portador resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ ajustado para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal. El tamaño de partícula obtenido fue 275 nm.

Preparación C: Las PNL precargadas se prepararon mediante la adición de 1 ml de solución de reserva en 10 ml de una solución que contenía 0,9 g de NaCl y agua destilada, mientras se agitaba a temperatura ambiente. La preparación entera de 10 ml de PNL precargadas se añadió en 90 ml de agua destilada, mientras se agitaba a temperatura ambiente. Esto se agitó durante 5 minutos y se sometió a agitación suave en vórtex durante 20 segundos y colocó en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal. El tamaño de partícula obtenido fue 238 nm.

Las preparaciones B y C se compararon mediante el gusto. B sabía como el agua de mar y C no tenía sabor salado. Cuando C se sometió a sonicación extensa para liberar las moléculas pasajero de NaCl, el sabor salado estaba presente. Utilizando el método para preparar la preparación C, con PNL precargadas, se proporcionó una población de vehículos portadores que efectivamente enmascaró el sabor de la molécula pasajero.

**Ejemplo 8: Enmascaramiento del sabor de la lidocaína clorhidrato**

Las partículas de encapsulación se prepararon usando una reserva precursora estable durante el almacenamiento

(número de lote 0013-050015). Se determinó que el tamaño de las PNL nativas en esta reserva precursora era de 8,1 nm usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. A 5 ml de la reserva se añadieron 50 mg de clorhidrato de lidocaína. La mezcla se sometió a agitación en vórtex e hasta que el clorhidrato de lidocaína se disolvió en la reserva, formando PNL precargadas. Se añadió etanol a las PNL precargadas, como se indica a continuación para formar una reserva de PNL diluidas con disolvente. Se diluyó adicionalmente 1 ml de la reserva de PNL diluidas en disolvente mediante adición a 20 ml de agua destilada, mientras se agitaba usando una placa mezcladora y una barra de agitación a temperatura ambiente. Los vehículos portadores resultantes se agitaron durante 5 minutos y se sometieron a agitación suave en vórtex durante 20 segundos y colocó en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal.

**TABLA 8**

Reserva de PNL A (ml)	Etanol B (ml)	Agua (añadida a 1 ml de A+B) (ml)	Precargada con clorhidrato de lidocaína	Tamaño (nm)
1*	0*	0*	No*	8,1*
1*	0*	20*	No*	262*
1*	0*	20*	Sí*	276*
1	0,5	20	Sí	91
1	1	20	Sí	88
1	2	20	Sí	68
1	5	20	Sí	46
* comparativo				

El tamaño de las PNL nativas presentes en el precursor de reserva también se determinó examinando el precursor solo usando el Malvern 1000 con los parámetros como ya se han descrito.

Las preparaciones de vehículos portadores formados usando las PNL precargadas con clorhidrato de lidocaína enmascararon el sabor del clorhidrato de lidocaína.

**Ejemplo 9: Cafeína como molécula pasajero**

Las preparaciones de vehículos portadores se realizaron utilizando cafeína como molécula pasajero. Se evaluaron dos concentraciones para determinar la capacidad de enmascarar el sabor y la estabilidad en el tiempo, tanto en tamaño como en capacidad de enmascarar el sabor.

Se preparó una preparación de reserva de PNL precargadas. Primeramente, se disolvieron 5 g de cafeína en 100 ml de agua destilada. Por separado, se diluyeron 10 ml de solución precursora estable durante el almacenamiento (número de lote 0013-010007), que contenía PNL nativas medidas a 12 nm utilizando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer con modo de análisis ajustado a una configuración de poblacional multimodal, con 10 ml de etanol como disolvente secundario (dilución volumen/volumen 1:1). Esto formó una reserva de PNL diluida con disolvente. La reserva de PNL diluida con disolvente stock se añadió a la solución de 100 ml que contenía 5 gramos de cafeína, mientras que la solución se agitaba a temperatura ambiente. La totalidad de la preparación de 120 ml preparada de este modo se añadió en 880 ml de agua destilada mientras se agitaba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se retiró una muestra de 3 ml para análisis y se agitó en vórtex durante 20 segundos. Los vehículos portadores cargados con cafeína como molécula pasajero se introdujeron en una cubeta de muestra que se usó para determinar el tamaño de la población de vehículo portador resultante con un instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer™ ajustado para evaluar el tamaño de partícula usando análisis multimodal. Se determinó que los vehículos portadores eran de 121 nm.

Cuando se evaluó la muestra para el enmascaramiento del sabor, se enmascaró el sabor amargo de la cafeína. Además, la preparación final de los vehículos portadores cargados con cafeína era ópticamente transparente.

Se llegó a la conclusión de que este procedimiento podía utilizarse para aplicaciones de productos ópticamente transparentes adecuados para el consumo oral, como bebidas o preparaciones medicinales. Las moléculas pasajero amargas o con alguna otra objeción encapsuladas de este modo en vehículos portadores podrían consumirse sin que el consumidor tenga que probar la molécula pasajero. Además de la cafeína, se contempla que los electrolitos (NaCl y KCl) y las vitaminas, entre otras moléculas pasajero, serían candidatos apropiados para la formulación como se describe en el ejemplo 8.

**Ejemplo comparativo 10: Producción de preparaciones de PNL precargadas que contienen cafeína**

5 Las PNL precargadas se prepararon a partir de una reserva precursora estable durante el almacenamiento (número de lote 0013-050015). Se determinó que el tamaño de las PNL nacientes era de 8 nm usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. La preparación que contenía cafeína se preparó como sigue:

1. Se disolvió cafeína anhidra (2,5 g) en 50 ml de agua destilada a temperatura ambiente
- 10 2. A 20 ml de la reserva precursora se añadieron 10 ml de etanol.
3. El material de la etapa 2 se añadió a la solución de cafeína de la etapa 1 mientras se agitaba a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 5 minutos. Esto dio como resultado la producción de PNL precargadas que contenían cafeína a 31,3 mg/ml.
4. El producto acabado que contenía cafeína a 0,5 mg/ml se produjo mezclando la preparación de la etapa 3 en un volumen apropiado de agua destilada (1:62,5 volumen/volumen).
- 15 5. El tamaño de la preparación acabada se determinó usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. Se determinó que el tamaño de la preparación acabada era de 147 nm. La preparación acabada que contenía 0,5 mg/ml de cafeína era ópticamente transparente.
- 20 6. La preparación acabada de la etapa 5 se evaluó según su capacidad para enmascarar el sabor de la cafeína introduciendo 1 ml de preparación en la boca. Se encontró que la preparación enmascaraba eficazmente el sabor de la cafeína.

25 **Ejemplo comparativo 11: Producción de preparaciones de PNL precargadas que contienen vitaminas liposolubles como medio para producir productos acabados de tamaño pequeño y capacidad para enmascarar el gusto adverso de las vitaminas liposolubles.**

30 Las PNL precargadas se prepararon a partir de una reserva precursora estable durante el almacenamiento (número de lote 0013-050015). Se determinó que el tamaño de las PNL nacientes era de 8 nm usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. La preparación que contenía vitaminas liposolubles se preparó como sigue:

1. Se preparó la reserva precursora diluida en disolvente añadiendo 20 ml de etanol a 40 ml de la reserva precursora estable durante el almacenamiento.
- 35 2. 250 mg de vitamina D3 (DSM Chemicals), 500 mg de vitamina E (DSM Chemicals) y 4 mg de vitamina K (DSM Chemicals) se disolvieron en la preparación resultante de la etapa uno. Esto se agitó a temperatura ambiente y dio como resultado una población de NLP precargada.
3. La preparación de PNL precargada de la etapa 2 se diluyó de 1 a 50 en agua destilada para producir un producto acabado adecuado para consumo oral que contenía la dosis diaria recomendada ("DDR") de las 3 vitaminas liposolubles.
- 40 4. El tamaño de la preparación acabada se determinó usando el instrumento de dispersión de luz láser Malvern 1000 Zetasizer para analizar poblaciones de tamaños usando el modo de análisis multimodal. Se determinó que el tamaño de la preparación acabada era de 168 nm.
5. La preparación acabada de la etapa 5 se evaluó según su capacidad para enmascarar el sabor del sabor desagradable de las tres vitaminas liposolubles introduciendo 1 ml en la boca. Se encontró que la preparación enmascaraba eficazmente el sabor de las tres vitaminas liposolubles; vitamina D3, E y K.
- 45

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para fabricar una población de conjunto de partículas nanolipídicas [PNL], que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una solución precursora monofásica, formándose dicha solución precursora monofásica mediante:
- 10 solubilización de un material anfipático que comprende fosfolípidos en una primera cantidad de disolvente no acuoso; adición de una cantidad de agua para formar una suspensión turbia; y adición de una segunda cantidad de disolvente no acuoso hasta que la suspensión turbia sea monofásica y tenga claridad óptica a temperatura ambiente;
- 15 (b) mezclar una molécula pasajero seleccionada del grupo que consiste en moléculas pasajero lipófilas y anfipáticas con dicha solución precursora monofásica para formar una población de vehículos cargados;
- (c) diluir dicha población de vehículos cargados con una o más alícuotas de disolvente no acuoso para formar una población de partículas cargadas con PNL;
- 20 (i) dicho disolvente no acuoso se añade de manera secuencial a la solución precursora después de la adición de una molécula pasajero,
- (ii) dicha población de vehículos cargados se combina con dicho disolvente no acuoso en una proporción que varía de aproximadamente 1 parte de la población de vehículo cargado a 20 partes de disolvente no acuoso, a una proporción de 1 parte de la población de vehículo cargado a 0,3 partes de disolvente no acuoso,
- 25 (iii) donde dicha dilución de dicha población de vehículo cargado forma una población de partículas cargadas con PNL que tienen partículas nanolipídicas (PNL) de 1 nm a 20 nm de tamaño, determinándose dichos tamaños mediante dispersión de luz láser a temperatura ambiente y disminuyendo dicho tamaño de las PNL a medida que dicha concentración de disolvente no acuoso aumenta,
- y
- 30 (d) mezclar una alícuota de dicha población de PNL cargadas con un disolvente acuoso para formar una población de conjunto de PNL que tiene un diámetro medio de partícula de 20 a 200 nm.
2. El método de reivindicación 1, donde dos o más moléculas pasajero diferentes se añaden a dicha solución precursora monofásica, añadiéndose una o más moléculas pasajero a dicha solución precursora monofásica antes
- 35 de diluir con dicho disolvente no acuoso, y añadiéndose una o más moléculas pasajero a dicha disolución precursora monofásica después de la adición de dicho disolvente no acuoso.
3. El método de reivindicación 1, donde dicho disolvente acuoso añadido en la etapa (d) comprende además una molécula pasajero soluble en agua, además de añadir la molécula pasajero en la etapa (c).
- 40 4. El método de la reivindicación 3, donde dichas moléculas pasajero solubles en agua se asocian con el exterior de dichas PNL.
5. El método de reivindicación 1, donde dicha población de conjunto de PNL tiene un diámetro medio de partícula de
- 45 30 nm a 200 nm.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de calentar dicha población del conjunto de PNL cargadas con la molécula pasajero a una temperatura de hasta 104,4 grados Celsius (220 grados Fahrenheit), reduciendo dicho calentamiento el diámetro medio de dicha población
- 50 del conjunto de PNL.
7. El método de reivindicación 1, donde dicha solución precursora comprende fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste en fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol (PI) y mezclas de los mismos.
- 55 8. El método de reivindicación 1, donde dicho disolvente no acuoso usado en la etapa (c) para diluir el precursor es etanol.
9. Una población de conjunto de partículas nanolipídicas (PNL) formada de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde cada una de dicha PNL tiene un diámetro medio de partícula de 1 nm a
- 60 20 nm, determinándose dichos tamaños mediante dispersión de luz láser a temperatura ambiente y formándose dichas poblaciones de conjunto de PNL cuando dichas PNL se diluyen con un disolvente acuoso.
10. La población de conjunto de PNL de la reivindicación 9, donde el diámetro medio de la población de conjunto de
- 65 PNL medio es de 30 nm a 200 nm, determinándose dichos tamaños por dispersión de luz láser a temperatura ambiente.

11. La población de conjunto de PNL de la reivindicación 9, donde el diámetro medio de la población de conjunto es de 80 nm a 110 nm, determinándose dichos tamaños por dispersión de luz láser a temperatura ambiente.
- 5 12. La población de conjunto de PNL de la reivindicación 9, donde dicha población comprende una preparación para consumo oral.
13. La población de conjunto de PNL de la reivindicación 12, donde las PNLP cargadas de moléculas pasajero contienen moléculas pasajero cuyo sabor se enmascarará tras la ingestión oral por parte de un usuario.
- 10 14. La población de conjunto de PNL de la reivindicación 12, donde dicha preparación comprende PNL a las que se ha asociado un agente con dicha NLP exterior para proporcionar una propiedad deseada a dicha PNL.