

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 060**

51 Int. Cl.:

B01J 13/04 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61K 47/34 (2007.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2006 PCT/JP2006/301342**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2006 WO06080451**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2006 E 06712508 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1852178**

54 Título: **Proceso para producir una partícula fina revestida**

30 Prioridad:

28.01.2005 JP 2005022240

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

31.10.2017

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHEMACHI CHIYODA-KU
TOKYO 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**YAGI, NOBUHIRO;
TOKUDA, TAKUYA;
NAKAKURA, MASASHI y
KATO, YASUKI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 060 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

Proceso para producir una partícula fina revestida

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de producción de partículas finas revestidas.

Antecedentes de la técnica

10

Hasta la fecha, se han divulgado multitud de técnicas relacionadas con métodos de producción de partículas finas revestidas, para productos farmacéuticos, alimentos, sustancias agroquímicas, fármacos para animales y similares. El revestimiento de partículas finas (partículas finas objeto de revestimiento) con componente(s) de la capa de revestimiento se lleva a cabo para conferir una función a las partículas finas, tal como la inhibición de un efecto proporcionado por un factor externo, o para recibir selectivamente un efecto proporcionado por un factor externo como un accionador que provoca un cambio en las partículas finas por medio del efecto. Como uno de ellos, se ha presentado un método de revestimiento de partículas finas con una membrana lipídica en un líquido (véase documento de patente 1). En el método, las partículas finas se revisten con una membrana lipídica reduciendo la relación de un disolvente orgánico polar en la solución acuosa que comprende el disolvente orgánico polar en el que se dispersan las partículas finas y se disuelve un lípido, se lleva a cabo el revestimiento en el líquido, y por ejemplo, se producen de forma muy eficiente las partículas finas revestidas con un tamaño apropiado para inyección intravenosa de dichas partículas finas y similares.

15

20

25

30

35

Se han presentado métodos de revestimiento de una partícula de micela con una membrana lipídica (véase, documentos de patente 2 y 3). En el documento de patente 2, por ejemplo, se disuelve un lípido catiónico en cloroformo de antemano, se añaden una solución acuosa de un oligodesoxinucleótido (ODN) y metanol y se mezclan con la solución de cloroformo, se centrifuga la mezcla obtenida para introducir un complejo lípido catiónico/ODN en la fase de cloroformo, y se aísla la fase de cloroformo. Después, se añaden un fosfolípido modificado con polietilenglicol, un lípido neutro y agua a la fase de cloroformo para formar una emulsión de aceite en agua (W/O), y se somete la emulsión obtenida a evaporación de fase reversa para producir un liposoma que comprende ODN. Por otra parte, en el método del documento de patente 3, por ejemplo, se forma un complejo (una micela) de un componente lipídico y un plásmido u ADN de oligonucleótido que tiene un conjugado de histidina/péptido fusogénico en etanol al 10 a 90 %. Se diluye el líquido con agua y se mezcla con liposoma o lípido preparado por adelantado, para convertir la micela en liposoma, se somete el liposoma a diálisis y se hace pasar a través de una membrana, de forma que se produce el liposoma con el plásmido o el oligonucleótido inmovilizado.

40

El documento de patente 4 se refiere a un método para revestir partículas finas que comprende dispersar las partículas finas en una solución acuosa que contiene un disolvente polar; añadir un lípido disuelto en una solución acuosa que comprende un disolvente polar; y añadir agua a la mezcla acuosa resultante con el fin de disminuir la tasa de disolvente orgánico polar en la mezcla acuosa.

45

Documento de patente 1: Documento WO 02/28367

Documento de patente 2: Traducción japonesa publicada de una solicitud internacional PCT N.º 2002-508765

Documento de patente 3: Traducción japonesa publicada de una solicitud internacional PCT N.º 2003-535832

Documento de patente 4: EP 1 323 415 A1

Descripción de la Invención

Problemas a solucionar por medio de la invención

50

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción sencilla de partículas finas revestidas en el cual las partículas finas nucleares se revisten con un componente de capa de revestimiento. Medios para resolver los problemas

55

La presente invención se refiere a la materia objetivo divulgada en las presentes reivindicaciones 1-14.

Efecto de la invención

60

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método simple de producción de partículas finas revestidas en el cual las partículas finas nucleares se revisten con un componente(s) de capa de revestimiento. Además, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de producción de partículas finas revestidas en las cuales se encierra un fármaco de forma efectiva y/o firme.

Breve descripción del dibujo

65

[Fig. 1] Se muestran cinéticas sanguíneas de preparaciones obtenidas en el Ejemplo 4 y Ejemplo comparativo 2 tras administración de las misas a ratas. Los círculos sólidos representan los resultados de administración de la

preparación del Ejemplo 4 y los círculos huecos representan los resultados de administración de la preparación del Ejemplo comparativo 2.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

5 En la presente invención, las partículas finas revestidas contienen al menos partículas finas nucleares y una capa de revestimiento, y se generan por medio de revestimiento de la superficie externa de las partículas finas nucleares con un componente(s) de la capa de revestimiento para la formación de la capa de revestimiento.

10 Las partículas finas nucleares en la presente invención son partículas finas que comprenden como componente constituyente, por ejemplo, un fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide de metal, una preparación de partículas finas o similar. Los ejemplos preferidos incluyen partículas finas que comprenden al menos un fármaco como componente constituyente. Las partículas finas nucleares de la presente invención pueden contener, como componente constituyente, un complejo obtenido mediante combinación de dos o
15 más de un fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide de metal, una preparación de partículas finas y similares, o puede contener, como componente constituyente, un complejo obtenido mediante combinación de un fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide de metal, una preparación de partículas finas o similar con otro compuesto (tal como un azúcar, un lípido o un compuesto inorgánico). Los ejemplos preferidos incluyen partículas finas que comprende, como componente
20 constituyente, un complejo de un fármaco y uno o más de un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y una preparación de partículas finas. Los ejemplos más preferidos incluyen partículas finas que comprenden, como componente constituyente, un complejo de un fármaco y liposoma.

25 El fármaco incluye un fármaco que adopta la forma de partículas finas en el disolvente en el líquido que contiene un disolvente orgánico polar, un fármaco que forma un complejo con otro componente que constituye las partículas finas nucleares y adopta la forma de las partículas finas en el disolvente, y similares, y ejemplos de los mismos incluyen sustancias que tienen actividad farmacológica entre una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un compuesto de bajo peso molecular, un sacárido, un polímero, un compuesto lipídico, un compuesto metálico y similares. Los ejemplos preferidos incluyen un ácido nucleico y los ejemplos más preferidos incluyen una o más
30 sustancia(s) escogida(s) entre un gen, ADN, ARN, un oligonucleótido (ODN), plásmido, y ARNsi.

Los ejemplos de la proteína o el péptido incluyen bradiquinina, angiotensina, oxitocina, vasopresina, adrenocorticotropina, calcitonina, insulina, glucagón, colecistoquinina, β -endorfina, factor de inhibición de melanocitos, hormona estimuladora de melanocitos, antagonista de gastrina, neurotensina, somatostatina, brucina, ciclosporina, encefalina, transferrina, péptido Arg-Gly-Asp (RGD), hormona tiroidea, hormona de crecimiento, hormona gonadotrópica, hormona luteinizante, asparaginasa, arginasa, uricasa, carboxipeptidasa, glutaminasa, superóxido dismutasa, activador del plasminógeno tisular, estreptoquinasa, interleucina, interferones, dipéptido de muramilo, timopoyetina, factor estimulador de colonia de granulocitos, factor estimulador de colonia de macrófagos de granulocitos, eritropoyetina, trombopoyetina, inhibidor de tripsina, lisozima, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento procedente de plaquetas, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento de células endoteliales, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento glial, timosina y anticuerpos específicos (tales como anticuerpo receptor anti-EGF) y similares.

45 Los ejemplos de ácido nucleico incluyen ODN tal como oligonucleótido antisentido y un oligonucleótido de sentido, un gen, ADN, ARN, plásmido, ARNsi y similares. El ácido nucleico incluye derivados en los cuales se ha sustituido un átomo de oxígeno o similar presente en un resto de fosfato, un resto de éster, o similar en la estructura de ácido nucleico por otro átomo tal como un átomo de azufre. Accidentalmente, ARNsi significa un ARN de bicatenario corto.

50 Los ejemplos de compuesto de bajo peso molecular incluyen ácido ϵ -aminocaproico, clorhidrato de arginina, L-aspartato de potasio, ácido tranexámico, sulfato de bleomicina, sulfato de vincristina, cefazolina de sodio, cefalotina de sodio, citicolina, citarabina, sulfato de gentamicina, clorhidrato de vancomicina, sulfato de canamicina, sulfato de ampicilina y similares.

55 Los ejemplos del sacárido incluyen condroitin sulfato de sodio, heparina de sodio, dextrano fluoresceína y similares.

Los ejemplos de polímero incluyen poli(etilen sulfonato) de sodio, un copolímero de éter divinílico con anhídrido maleico (DIVEMA), un producto unido de un copolímero de estireno-anhídrido maleico con neocarcinostatina (SMANCS) y similares.

60 Los ejemplos del compuesto lipídico incluyen vitamina D, vitamina E y similares.

Los ejemplos de compuesto metálico incluyen cisplatino y similares.

65 El conjunto lipídico o el liposoma está formado por, por ejemplo, un lípido y/o un tensioactivo o similares. El lípido puede ser un lípido simple, un lípido complejo y un lípido derivado, y ejemplos de los mismos incluyen un fosfolípido,

un gliceroglicolípido, un esfingoglicolípido, un esfingoide, un esteroil, un lípido catiónico, y similares, y ejemplos preferidos incluyen un fosfolípido, un lípido catiónico y similares. Además, los ejemplos del lípido también incluyen tensioactivos (que tienen la misma definición que el tensioactivo descrito anteriormente), un polímero (que tiene la misma definición que el polímero descrito a continuación, específicamente dextrano, etc.) y un derivado lipídico tal como un poli(derivado de oxietileno) (específicamente, polietilén glicol, etc.) y los ejemplos preferidos incluyen un poli(lípido etilén glicolado). Los ejemplos del tensioactivo incluyen un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo zwitteriónico y similares.

Los ejemplos de fosfolípido incluyen fosfolípidos naturales y sintéticos tales como fosfatidilcolina (específicamente, fosfatidilcolina de semilla de soja, fosfatidilcolina de yema de huevo (EPC), fosfatidilcolina de diestearoil, fosfatidilcolina de dipalmitoil, fosfatidilcolina de dimiristoil, fosfatidilcolina de dioleil, etc.), fosfatidiletanolamina (específicamente diestearoil fosfatidiletanolamina (DSPE), dipalmotil fosfatidiletanolamina, dioleoil fosfatidiletanolamina, etc.), glicerofosfolípido (específicamente, fosfatidilserina, ácido fosfátidico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina, etc.) esfingofosfolípido (específicamente esfingomielina, fosfoetanolamina de ceramida, fosfoglicerol de ceramida, fosfoglicerofosfato de ceramida, etc.) glicerofosfono lípido, esfingofosfonolípido, lecitina natural (específicamente, lecitina de yema de huevo, lecitina de semilla de soja, etc.) y fosfolípido hidrogenado (específicamente fosfatidilcolina hidrogenada, etc.).

Los ejemplos de gliceroglicolípido incluyen sulfoxiribosil glicérido, diglicosil diglicérido, digalactosil diglicérido, galactosil diglicérido, glicosil diglicérido y similares.

Los ejemplos de esfingoglicolípido incluyen galactosil cerebrósido, lactosil cerebrósido, gangliósido y similares.

Los ejemplos de esfingoide incluyen esfingano, icosaesfingano, esfingosina, un derivado del mismo y similares. Los ejemplos de un derivado del mismo incluyen aquellos en los que $-NH_2$ de esfingano, icosaesfingano, esfingosina o similar se sustituyen por $-NHCO(CH_2)_xCH_3$ (en la fórmula, x representa un número entero de 0 a 18, en particular, se prefiere 6, 12 o 18) y similares.

Los ejemplos del esteroil incluyen colesterol, dihidrocolesterol, lanosterol, β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brasicasterol, ergocasterol, fucosterol, 3β -[N-(N'-dimetilaminoetil)carbamoil] colesterol (DC-Chol) y similares.

Los ejemplos de lípido catiónico incluyen cloruro de N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), N-[1-(2,3-dioleoilpropil)]-N,N-dimetilamina (DODAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2-(espermincarboxiamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de N-[1-(2,3-ditetradeciloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3-dioleiloxipropil)]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DORIE) y similares.

Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen poli(monooleato de oxietilén sorbitán) (específicamente, Polysorbate 80, etc.), polioxietilén polioxipropilén glicol (específicamente, Pluronic F68, etc.), un ácido graso de sorbitán (específicamente, monolaurato de sorbitán, monooleato de sorbitán, etc.), un poli(derivado de oxietileno) (específicamente aceite de ricino 60 polioxietilén hidrogenado, poli(alcohol oxietilén laurílico), etc.), un éster de ácido graso de glicerol y similares.

Los ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen acilsarcosina, alquilsulfato de sodio, sulfonato de alquilbenceno, un ácido graso de sodio que tiene de 7 a 22 átomos de carbono y similares. Los ejemplos específicos incluyen dodecil sulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio y similares.

Los ejemplos de tensioactivos catiónicos incluyen sal de alquilamina, sal de acilamina, una sal de amonio cuaternario, un derivado de amina y similares. Los ejemplos específicos incluyen cloruro de benzalconio, una sal de acilaminoetil dietilamina, una sal de N-alquilpolialquilpoliamina, una poli(poliámida de etileno) de ácido graso, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, alquilpolioxietilénamina, N-alquilaminopropilamina, un éster de ácido graso de trietanolamina y similares.

Los ejemplos de tensioactivos zwitteriónicos incluyen sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano, sulfonato de N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano y similares.

En el liposoma, estos lípidos y tensioactivos se usan solos o en combinación, y preferentemente se usan en combinación. Como combinación en el caso de que se usen en combinación, por ejemplo, se puede poner como ejemplo una combinación de dos o más componentes escogidos entre fosfatidilcolina de semilla de soja hidrogenada, un poli(fosfolípido glicolado de etileno) y colesterol, una combinación de dos o más componentes escogidos entre diestearoil fosfatidilcolina, un poli(fosfolípido glicolado de etileno) y colesterol, una combinación de EPC y DOTAP, una combinación de EPC, DOTAP y un poli(fosfolípido etilén glicolado), una combinación de EPC, DOTAP, colesterol y un poli(fosfolípido etilén glicolado), y similares.

Además, el liposoma puede contener un estabilizador de membrana tal como un esteroil que incluye un colesterol, un antioxidante tal como tocoferol o similares, según sea necesario.

Los ejemplos de conjunto lipídico incluyen una micela esférica, una micela reversa esférica, una micela con forma de salchicha, una micela reversa con forma de salchicha, una micela con forma de placa, una micela reversa con forma de placa, hexagonal I, hexagonal II, un producto asociado que comprende dos o más moléculas lipídicas y similares.

- 5 Los ejemplos de partícula de emulsión incluyen partículas de emulsión de aceite en agua (o/w) tales como una emulsión de grasa, una emulsión formada por un tensioactivo no iónico y aceite de semilla de soja, una emulsión lipídica y una nanoesfera lipídica, partículas de emulsión de agua en aceite en agua (w/o/w) y similares.

- 10 Los ejemplos del polímero incluyen polímeros naturales tales como albúmina, dextrano, quitosano, sulfato de dextrano y ADN, polímeros sintéticos tales como poli-L-lisina, polietilenimina, poli(ácido aspártico), un copolímero de estireno con ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida con acrilpirrolidona, un dendrímero modificado con PEG, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico) y poli(ácido láctico) polietilen glicolado, una sal de los mismos y similares.

- 15 En este documento, la sal del polímero incluye, por ejemplo, una sal metálica, una sal de amonio, un sal de adición de ácido, una sal de adición de amina orgánica, una sal de adición de amino ácido y similares. Los ejemplos de sal metálica incluyen sales de metales alcalinos tales como una sal de litio, una sal de sodio y una sal de potasio, sales de metales alcalino térreas tales como una sal de magnesio y una sal de calcio, una sal de aluminio, una sal de cinc y similares. Los ejemplos de sal de amonio incluyen sales de amonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de sal de adición de ácido incluyen inorganatos tales como un hidrocloreto, un sulfato, un nitrato y un fosfato, y organatos tales como un acetato, un maleato, un fumarato y un citrato. Los ejemplos de sal de adición de amina orgánica incluyen sales de adición de morfolina, piperidina y similares, y los ejemplos de sal de adición de amino ácido incluyen sales de adición de glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y similares.

- 25 Los ejemplos de coloide metálico incluyen coloides metálicos que incluyen oro, plata, platino, cobre, rodio, sílice, calcio, aluminio, hierro, indio, cadmio, bario, plomo y similares.

Los ejemplos de preparación de partículas finas incluyen una microesfera, una microcápsula, un nanocrystal, nanopartículas lipídicas, una micela polimérica y similares.

- 30 Las partículas finas nucleares producidas por medio del método de acuerdo con la presente invención preferentemente contienen un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogidas entre, por ejemplo, azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o un tensioactivo o similar. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogidas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo pueden estar presentes en los componentes de constituyente de las partículas finas nucleares o se pueden usar mediante adición de los mismos a los componentes de constituyente de las partículas finas nucleares.

- 40 Los ejemplos preferidos del derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogida entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo incluye un glicolípido o un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua, y ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua. El derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogida(s) entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo es preferentemente una sustancia que tiene un carácter dual ya que una parte de la molécula tiene una propiedad de unión a otro componente constituyente de las partículas finas nucleares debido a, por ejemplo, afinidad hidrófoba, interacción electrostática o similar, y la otra parte tiene una propiedad de unión a un disolvente usado en la producción de las partículas finas nucleares debido a, por ejemplo, afinidad hidrófila, interacción electrostática o similares.

- 50 Los ejemplos de derivado lipídico o derivado de ácido graso de un azúcar, un péptido o un ácido nucleico incluyen los que comprenden un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa, un péptido tal como un péptido procedente de caseína, un péptido derivado de clara de huevo, un péptido derivado de semilla de soja o glutatión, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, plásmido, ARNsi u ODN y cualquier lípido ilustrado en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares o el ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido laúrico unidos uno a otro y similares. Los ejemplos del derivado lipídico o derivado de ácido graso de un azúcar incluyen los glicolípidos tales como gliceroglicolípidos o esfingoglicolípidos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares y similares.

- 60 Los ejemplos del derivado lipídico o del derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua incluyen los que comprenden polietilen glicol, poliglicerol, polietilenimina, poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), oligosacárido, dextrina, una celulosa soluble en agua, dextrano, sulfato de condroitina, poliglicerol, quitosano, polivinilpirrolidona, poli(amida de aspartato), poli-L-lisina, manano, pululano, oligoglicerol o similares o un derivado del mismo y cualquier lípido ilustrado en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares o un ácido graso tal como ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico o ácido laúrico unidos uno a otro y similares.
- 65 Más preferiblemente, se puede poner de ejemplo un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un poli(derivado de etilen glicol) o un poli(derivado de glicerol), y aún más preferentemente, se puede poner de ejemplo

un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un poli(derivado de etilen glicol).

5 Los ejemplos de derivado lipídico o derivado de ácido graso de un poli(derivado de etilen glicol) incluyen un poli(lípido etilen glicolado) [específicamente, fosfatidil etanolamina de polietilenglicol (más específicamente, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilen glicol)-2000] (PEG-DSPE) y similares), aceite de ricino 60 polioxietilen hidrogenado, Cremophor EL y similares], un éster de poli(ácido graso de sorbitán de etilen glicol) (específicamente, poli(monooleato de oxietilen sorbitán) y similares), un éster de poli(ácido graso de etilen glicol) y similares, y ejemplos más preferidos incluyen un poli(lípido etilen glicolado).

10 Los ejemplos de derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un pol(derivado de glicerol) incluyen un poli(lípido glicerolado) (específicamente, poli(fosfatidil etanolamina de glicerol) y similares), un poli(éster de ácido graso de glicerol) y similares, y ejemplos más preferidos incluyen un poli(lípido glicerolado).

15 Los ejemplos de tensioactivo incluyen los tensioactivos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares, un poli(alquil éter de etilen glicol) y similares, y ejemplos preferidos del mismo incluyen polioxietilen polioxipropilen glicol, un éster de ácido graso de glicerol, un poli(alquil éter de oxietilen glicol) y similares.

20 En el caso de que las partículas finas nucleares contengan el complejo de un fármaco y uno o más componentes de constituyentes escogidos entre el grupo que consiste en un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y una preparación de partículas finas, es preferible que el componente tenga una carga electrostática opuesta a la del fármaco. La carga electrostática del componente, opuesta a la del fármaco, puede ser una carga, una polarización de superficie, etc. que genera una atracción electrostática junto con una carga intramolecular, una polarización intramolecular, etc. del fármaco. Para que un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y la preparación de partículas finas tengan una carga electrostática opuesta a la del fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y la preparación de partículas finas preferentemente comprenden una sustancia carga que tiene la carga electrostática opuesta a la del fármaco, y más preferentemente comprende un lípido que tiene la carga electrostática opuesta a la del fármaco (el lípido catiónico anteriormente mencionado o el lípido aniónico objeto de descripción a continuación).

30 La sustancia carga que tiene la carga electrostática opuesta a la del fármaco tal como un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico, y las preparaciones de partículas finas se pueden clasificar en una sustancia catiónica que exhibe una propiedad catiónica y una sustancia aniónica que exhibe una propiedad aniónica. Sin embargo, incluso si es una sustancia zwitteriónica que tiene tanto un grupo catiónico como un grupo aniónico, la electronegatividad relativa varía dependiendo del pH, uniéndose con otra sustancia o similar, y se puede clasificar en una sustancia catiónica o una sustancia aniónica dependiendo de las condiciones. Dicha sustancia cargada se puede usar, como componente constituyente, de las partículas finas nucleares o se puede usar mediante adición de la misma al componente constituyente de las partículas finas nucleares.

40 Los ejemplos de la sustancia catiónica incluyen las sustancias catiónicas entre las ilustradas en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares (específicamente, un lípido catiónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un esteroide catiónico, un tensioactivo catiónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un polímero catiónico y similares), una proteína o un péptido con los cuales se puede formar un complejo a un pH igual o menor que el punto isoeléctrico, y similares.

45 Los ejemplos del esteroide catiónico incluyen DC-Chol y similares.

Los ejemplos del polímero catiónico incluyen poli-L-lisina, polietiliminina, polifect, quitosano y similares.

50 La proteína o el péptido con los cuales se puede formar un complejo a un pH igual o menor que un punto isoeléctrico no se encuentran particularmente limitados, con tal de que sea una proteína o un péptido con los cuales se puede formar un complejo a un pH igual o menor que el punto isoeléctrico de la sustancia. Ejemplos de los mismos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, pepsina, ribonucleasa T1 y similares.

55 Los ejemplos de la sustancia aniónica incluyen sustancias aniónicas entre las ilustradas en la definición anteriormente mencionada de las partículas finas nucleares [específicamente, un lípido aniónico, un tensioactivo aniónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un polímero aniónico y similares], una proteína o un péptido, con los cuales se puede formar un complejo a un pH igual o mayor que el punto isoeléctrico, un ácido nucleico y similares.

60 Los ejemplos de lípido aniónico incluyen fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y similares.

65 Los ejemplos del polímero aniónico incluyen ácido poliaspártico, un copolímero de estireno con ácido maleico, un copolímero de isopropilacrilamida con acrilpirrolidona, un dendrímero modificado con PEG, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico) poli(ácido glicólico), poli(ácido oxietilen glicolado láctico), sulfato de dextrano, dextran sulfato de sodio, sulfato de condroitina, condroitin sulfato de sodio, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dertamano, sulfato

de heparano, heparina, sulfato de quetarano, fluoresceína de dextrano aniónica y similares.

La proteína o el péptido con los cuales se puede formar un complejo a un pH igual o mayor que el punto isoelectrico no están particularmente limitados, con tal de que sean una proteína o un péptido con los cuales se pueda formar un complejo a un pH igual o mayor que el punto isoelectrico de la sustancia. Ejemplos de los mismos incluyen albúmina, orosomucoide, globulina, fibrinógeno, histona, protamina, ribonucleasa, lisozima y similares.

Los ejemplos del ácido nucleico como sustancia aniónica incluyen ADN, ARN, plásmido, ARNsi, ODN y similares. Puede tener cualquier longitud y cualquier secuencia con tal de que no exhiba una actividad fisiológica.

En el caso de que las partículas finas nucleares contengan el complejo de un fármaco y uno o más componentes de constituyente escogidos entre el grupo que consiste en un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico, y una preparación de partículas finas, y un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico o la preparación de partículas finas tenga una carga electrostática opuesta a la del fármaco, es preferible además que las partículas finas nucleares contengan un agente competitivo de adhesión.

Como agente competitivo de adhesión de la presente invención, por ejemplo, se puede mencionar una sustancia que tenga la misma carga electrostática que el fármaco y similares, y una sustancia electrostáticamente adherida a un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico o la preparación de partículas finas que es un componente constituyente de las partículas finas nucleares, debido a la atracción electrostática a un catión o un anión por medio de una carga eléctrica en la molécula, se incluye la polimerización intramolecular o similares. Los ejemplos de los mismos incluyen un lípido, tensioactivos, un ácido nucleico, una proteína, un péptido, un polímero y similares. Los ejemplos del lípido, el tensioactivo, el ácido nucleico, la proteína, el péptido y el polímero incluyen los lípidos catiónicos, los lípidos aniónicos, los tensioactivos catiónicos, los tensioactivos aniónicos, los ácidos nucleicos, las proteínas, los péptidos, los polímeros catiónicos y los polímeros aniónicos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de la sustancia cargada y similares. Los ejemplos preferidos incluyen los polímeros catiónicos y los polímeros aniónicos ilustrados en la definición anteriormente mencionada de la sustancia cargada y similares, y los ejemplos más preferidos incluyen una o más sustancia(s) escogida(s) entre sulfato de dextrano, dextran sulfato de sodio, sulfato de condroitina, condroitin sulfato de sodio, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de dertamano, sulfato de heparano, heparina, sulfato de quetarano, fluoresceína de dextrano aniónica, poli-L-lisina, polietilenimina, polifect, quitosano y similares. Preferentemente, el agente competitivo de adhesión se adhiere electrostáticamente a un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico o la preparación de partículas finas que es un componente constituyente de las partículas finas nucleares, y es preferentemente una sustancia con un tamaño que no permite la formación de reticulación para agregar el conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico o la preparación de partículas finas que es un componente constituyente de las partículas finas nucleares, incluso si la sustancia se adhiere a un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico o la preparación de partículas finas, o una sustancia que tenga un resto en su molécula, que repela la adhesión del conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, el polímero, el coloide metálico o la preparación de partículas finas, evitando de este modo la agregación del conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, el polímero, el coloide metálico o la preparación de partículas finas.

Las partículas finas nucleares producidas de acuerdo con el método de la presente invención se pueden producir por medio de, o de acuerdo con, un método de producción conocido, y se pueden producir por medio de cualquier método de producción. Por ejemplo, en la producción de partículas finas nucleares que comprenden, como componente constituyente, liposoma, que es una de las partículas finas nucleares, se puede aplicar un método conocido de preparación de liposoma. Como método conocido de preparación de liposoma, por ejemplo, método de preparación de liposomas de Bangham, et al. [véase "Journal of Molecular Biology" (J. Mol. Biol.), vol. 13, pp. 238-252 (1965)], un método de inyección de etanol [véase "Journal of Cell Biology" (J. Cell Biol.), vol. 66, pp. 621-634 (1975)], un método de prensa francés [véase "FEBS Letters" (FEBS Lett.), vol. 99, pp. 210-214 (1979)], un método de congelación-descongelación [véase "Archives of Biochemistry and Biophysics" (Arch. Biochem. Biophys.), vol. 212, pp. 186-194 (1981)], un método de evaporación en fase reversa [véase "Proceedings of the National Academy of Science United States of America" (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU), vol. 75, pp. 4194-4198 (1978)], un método de gradiente de pH (véase, por ejemplo, Patente Japonesa N.º 2.572.554, Patente Japonesa N.º 2.659.136, etc.) y similares. Como solución para dispersar el liposoma en la producción del liposoma, por ejemplo, se puede usar agua, un ácido, un álcali, cualquiera de diversos tampones, una solución salina fisiológica, una infusión de amino ácidos o similares. Además, en la producción del liposoma, también es posible añadir un antioxidante tal como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína o ácido etilendiamino tetracético (EDTA), un agente isotónico tal como glicerol, glucosa, cloruro sódico o similares. Además, el liposoma se puede preparar por medio de solución del lípido o similar en, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como etanol, destilación del disolvente, adición de una solución salina fisiológica o similar y agitación de la mezcla por medio de sacudidas, formándose de este modo el liposoma.

Además, la mejora superficial del liposoma se pueden llevar a cabo opcionalmente usando, por ejemplo, un tensioactivo no iónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un tensioactivo catiónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un tensioactivo aniónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un

polímero, un poli(derivado de oxietileno) o similar, y dicho liposoma de mejora superficial también se usa como componente constituyente de las partículas finas nucleares de la presente invención [véase "Stealth Liposome", editado por D. D. Lasic y F. Martin, CRC Press Inc., USA, pp. 93-102 (1995)]. Los ejemplos de polímero incluyen dextrano, pululano, manano, amilopectina, hidroxietilalmidón y similares. Los ejemplos de poli(derivado de oxietileno) incluyen Polysorbate 80, Pluronic F68, aceite de ricino 60 polioxi-etileno hidrogenado, poli(alcohol oxietileno laurílico), PEG-DSPE y similares. La mejora superficial del liposoma se puede emplear como uno de los métodos de incorporación del derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogidas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o un tensioactivo en las partículas finas nucleares.

El diámetro medio de partícula del liposoma se puede escoger de forma libre según demanda. Los ejemplos de un método de ajuste del diámetro medio de partícula incluyen un método de extrusión y un método en el que la vesícula liposómica multi-lamelar de gran tamaño (MLV) se pulveriza por medios mecánicos (específicamente usando un Manton-gaulin, un microfluidizador o similares) [véase "Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs", editado por R. H. Muller, S. Benita y B. Bohm, Scientific Publishers, Stuttgart, Alemania, pp. 267-294 (1998)] y similares.

Además, el método de producción de un complejo obtenido mediante combinación de dos o más sustancias escogidas entre, por ejemplo, un fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide de metal, preparación de partículas finas y similares, que constituyen las partículas finas nucleares (ejemplos específicos incluyen un complejo de liposoma o un conjunto lipídico que comprende un lípido catiónico y un ácido nucleico, un complejo de un polímero que comprende un polímero catiónico tal como poli-L-lisina y un ácido nucleico, un complejo de liposoma o un conjunto lipídico que comprende un lípido aniónico tal como un ácido fosfatídico y una proteína, un complejo de un polímero que comprende un polímero aniónico tal como ácido estireno-maleico y una proteína, un complejo de liposoma o un conjunto lipídico que comprende un lípido catiónico y una proteína, un complejo de un polímero que comprende un polímero catiónico tal como poli-L-lisina y una proteína y similares) puede ser, por ejemplo, un método de producción en el que se mezcla simplemente un fármaco con un conjunto lipídico, liposoma, un polímero o similar en agua. En este momento, se puede añadir una etapa de tamizado, una etapa de esterilización o similar, según sea necesario. Además, también es posible llevar a cabo la formación del complejo en cualquiera de los diversos disolventes tales como acetona y éter. Por ejemplo, se disuelven un ácido nucleico y un lípido en un disolvente orgánico tal como etanol, se destilan los disolventes, se añade una solución salina fisiológica o similar, y se agita la mezcla mediante sacudidas, de modo que se puede formar también un complejo de ácido nucleico.

En cuanto al tamaño de las partículas finas nucleares de la presente invención, preferentemente es diámetro medio de partícula es de varios nanómetros a varios cientos de micrómetros, más preferentemente de 10 nm a 5 µm, aún más preferentemente de 50 nm a 300 nm, del modo más preferido de 50 nm a 200 nm.

En la presente invención, el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se dispersa(n) en el líquido C que comprende el disolvente orgánico polar a concentración controlada del disolvente orgánico polar. Los ejemplos del(de los) componente(s) de la capa de revestimiento incluyen un lípido, un tensioactivo, un polímero y similares, descritos en la definición anterior de las partículas finas nucleares. El(los) componente(s) de la capa de revestimiento preferentemente comprende(n) una o más sustancia(s) escogida(s) entre el grupo que consiste en lípidos y tensioactivos descritos en la definición anterior de las partículas finas nucleares, más preferentemente comprende(n) una o más sustancias escogidas entre el grupo que consiste en lípidos y tensioactivos para la formación de una capa de revestimiento de una membrana lipídica, y más preferentemente comprende(n) un lípido neutro entre los lípidos y los tensioactivos. Los lípidos neutros incluyen lípidos diferentes de los lípidos catiónicos, tensioactivos catiónicos, lípidos aniónicos y tensioactivos aniónicos, entre los lípidos y los tensioactivos descritos en la definición anterior de las partículas finas nucleares. Los ejemplos más preferidos de lípidos neutros incluyen fosfolípidos, glicoglicerolípidos, glicoesfingolípidos, y similares, incluyendo ejemplos más preferidos de los mismos fosfolípidos, e incluyendo los ejemplos más preferidos de los mismos EPCs.

La combinación de partículas finas nucleares con componente(s) de la capa de revestimiento de la presente invención no se encuentra particularmente limitada, sin embargo, se prefiere una combinación de partículas finas nucleares que son partículas finas que comprenden, como componente constituyente, un complejo de un fármaco y un liposoma con el(los) componente(s) de la capa de revestimiento que es un lípido y/o un tensioactivo. Las partículas finas revestidas en las cuales las partículas finas nucleares son partículas que comprenden, como componente constituyente, liposoma, el(los) componente(s) de la capa de revestimiento es(son) un lípido y/o un tensioactivo y la capa de revestimiento es una membrana lipídica, se clasifican en liposomas en sentido estricto, basándose en sus estructura. Las partículas finas revestidas en las cuales las partículas finas nucleares son otras partículas finas que comprenden, como componente constituyente, liposoma, el(los) componente(s) de la capa de revestimiento es un lípido y/o un tensioactivo y la capa de revestimiento es una membrana lipídica, se clasifican en liposomas en sentido amplio. En la presente invención, es más preferible que el componente constituyente de las partículas finas nucleares y las partículas finas revestidas sean liposomas.

Es preferible que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento presente, intramolecularmente, un resto

5 hidrófobo con una afinidad por el disolvente orgánico polar usado en la presente invención, y sea(n) soluble(s) en el disolvente orgánico polar debido al resto hidrófobo, y es más preferible que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento presente, intramolecularmente, una resto hidrófilo además del resto hidrófobo. Además, el(los) componente de la cara revestimiento preferentemente forma(n) un agregado o micela, que preferentemente tiene un tamaño de 0,1 a 1000 nm, más preferentemente tiene un tamaño de 0,3 a 500 nm. El tamaño del agregado o micela se puede medir examinando si puede pasar a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro deseado.

10 En la presente invención, se considera que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento es(son) solubles en el disolvente orgánico polar en caso de que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se pueda(n) disolver en el disolvente orgánico polar, y en caso de que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se pueda(n) disolver usando un agente de disolución o similar en el disolvente orgánico polar. Es preferible que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se pueda(n) disolver por sí mismo(s) en el disolvente orgánico polar.

15 Además, los ejemplos del lípido a usar cuando la capa de revestimiento es una membrana lipídica incluyen un lípido sintético y similares. Los ejemplos de lípido sintético incluyen fosfatidilcolina fluorada, tensioactivos fluorados, bromuro de dialquilamonio y similares. Estos se pueden usar solos o en combinación con otros lípidos o similares. Además, cuando la capa de revestimiento es una membrana lipídica, el(los) componente(s) de la capa de revestimiento preferentemente contiene(n) un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua, o el derivado lipídico anteriormente mencionado o el derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogidas entre azúcares, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua o el tensioactivo, más preferentemente contiene el derivado lipídico anteriormente mencionado o el derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua, aún más preferentemente contiene el fosfolípido polietilen glicolado mencionado anteriormente, y del modo más preferido contiene poli(fosfatidil etanolamina de etilen glicol).

20 Los ejemplos de derivado lipídico, derivado de ácido graso o derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua de la presente invención incluyen el derivado lipídico anteriormente mencionado o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogida(s) entre azúcares, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua del derivado de hidrocarburo alifático de una o más sustancia(s) escogidas entre azúcares, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua, incluyendo los ejemplos preferidos de los mismos un glicolípido y un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua, e incluyendo los ejemplos más preferidos de los mismos un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de un polímero soluble en agua.

30 Los ejemplos de derivado de hidrocarburo alifático o de una sustancia soluble en agua incluyen los que comprenden una sustancia soluble en agua y, por ejemplo, un alcohol alifático de cadena larga, polioxipropileno alquilo, un residuo alcohólico de un éster de ácido graso de glicerina o similar, unido uno a otro.

35 Los ejemplos de derivado de hidrocarburo alifático de un azúcar, un péptido o un ácido nucleico incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un azúcar tal como sacarosa, sorbitol o lactosa, un péptido tal como un péptido procedente de caseína, un péptido derivado de clara de huevo, un péptido derivado de semilla de soja o glutatión, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, plásmido, ARNsi u ODN.

40 Los ejemplos del derivado de hidrocarburo alifático de un polímero soluble en agua incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de polietilen glicol, poliglicerol, polietilenimina, poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida), oligosacárido, dextrina, una celulosa soluble en agua, dextrano, sulfato de condroitina, poliglicerol, quitosano, polivinilpirrolidona, poli(amida de aspartato), poli-L-lisina, manano, pululano, oligoglicerol o similares o un derivado de los mismos, y los ejemplos más preferidos de los mismos incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un poli(derivado de etilen glicol) o un poli(derivado de glicerol), y los ejemplos más preferidos incluyen un derivado de hidrocarburo alifático de un poli(derivado de etilen glicol).

45 La expresión "las partículas finas nucleares se dispersan" significa que las partículas finas nucleares se suspenden, emulsionan o dan lugar a la formación de una emulsión, preferentemente se suspenden. Una pequeña parte de las partículas finas nucleares se puede depositar en el líquido C, mientras que una gran parte de las mismas se dispersa. Es preferible que todas las partículas finas nucleares se dispersen en el líquido C. La expresión "el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se dispersa(n)" significa que el(los) componente(s) de la capa de revestimiento forma(n) un agregado, micela o similar y se suspende(n), emulsionan o dan lugar a la formación de una emulsión, preferentemente se emulsiona(n) y da(n) lugar a la formación de una emulsión. Una pequeña parte del(de los) componente(s) de la capa de revestimiento se puede disolver en el líquido C, mientras que una gran parte del(de los) mismo(s) forma el agregado, micela o similar y se emulsiona o da lugar a la formación de una emulsión. Además, una pequeña parte del(de los) componente(s) de la capa de revestimiento se puede depositar en el líquido C, mientras que una gran parte del(de los) mismo(s) forma el agregado, micela o similar y se suspende(n), emulsionan o dan lugar a la formación de una emulsión, preferentemente, se emulsiona o da lugar a la formación de una emulsión. No existen limitaciones particulares en cuanto a la preparación del líquido de dispersión C, siempre y cuando el(los) componente(s) de la capa de revestimiento sea(n) soluble(s) en el disolvente orgánico polar, y la

concentración de disolvente orgánico polar del líquido de dispersión sea tal que las partículas finas nucleares no se disuelvan y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento esté(n) en estado dispersado en el líquido como se divulga en la reivindicación 1.

- 5 No existen limitaciones particulares en cuanto al período de abandono o mezcla del líquido C, con tal de que la etapa de abandono o mezcla no se detenga inmediatamente después de que las partículas finas nucleares y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se dispersen en el líquido que comprende el disolvente orgánico polar. El período se puede escoger dependiendo de los tipos de componente(s) de la capa de revestimiento y el líquido que comprende el disolvente orgánico polar, y es preferentemente tal que el rendimiento de las partículas finas revestidas que se producen sea estacionario. El período es de 3 segundos a 30 minutos.

15 El método de acuerdo con la invención comprende particularmente las etapas de: preparar un líquido A que comprende el disolvente orgánico polar como se ha descrito anteriormente en el que se disuelve el(los) componente(s) de la capa de revestimiento; preparar un líquido B que se puede mezclar con el líquido A, en el que las partículas finas nucleares se dispersan y un disolvente orgánico polar como se ha descrito anteriormente no está presente o el disolvente orgánico polar está presente en una relación menor que la del líquido A; y mezclar el líquido A con el líquido B para preparar un líquido C como se ha descrito anteriormente. No existen limitaciones particulares sobre la preparación de los líquidos A y B, con tal de que la concentración de disolvente orgánico polar de líquido mixto C sea tal que las partículas finas nucleares no se disuelvan y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento pueda(n) estar en estado dispersado. El líquido C se deja o se mezcla durante un período de 3 segundos a 30 minutos para revestir las partículas finas nucleares con el componente de la capa de revestimiento.

25 Los ejemplos de los disolventes orgánicos polares que se puede usar en la presente invención incluyen alcoholes tales como metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, n-butanol, 2-butanol, y terc-butanol; glicoles tales como glicerina, etilen glicol y propilen glicol; polialquilen glicoles tales como polietilen glicol, aceite de ricino endurecido con polioxietileno y éter o éster de ácido graso de polioxietilen sorbitán; y similares. Preferentemente, el disolvente orgánico polar es etanol. Los ejemplos de disolventes que se pueden usar en la invención, diferentes del disolvente orgánico polar, incluyen agua, dióxido de carbono líquido, hidrocarburos líquidos, carburos halogenados, hidrocarburos halogenados y similares, y entre ellos se prefiere agua. El líquido C puede contener un componente de tampón, o similar.

35 La combinación del disolvente orgánico polar y el disolvente diferente del disolvente orgánico polar es preferentemente tal que los disolventes se pueden mezclar uno con el otro, y se pueden escoger basándose en las solubilidades de las partículas finas nucleares anteriormente mencionadas y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento anteriormente mencionado(s) en cada disolvente del líquido que comprende el disolvente orgánico polar en cada proceso, etc. Preferentemente, las partículas finas nucleares tienen una baja solubilidad en el líquido que comprende el disolvente orgánico polar en cada proceso, y preferentemente tienen una baja solubilidad en cada uno del disolvente orgánico polar y el disolvente diferente del disolvente orgánico polar. Preferentemente, el(los) componente(s) de la capa de revestimiento tiene(n) una elevada solubilidad en el disolvente orgánico polar, y preferentemente tiene baja solubilidad en el disolvente diferente del disolvente orgánico polar.

45 En caso de que las partículas finas nucleares sean solubles en el disolvente orgánico polar, la solubilidad de las partículas finas nucleares en el disolvente orgánico polar es preferentemente menor que la del componente de la capa de revestimiento. La expresión "la solubilidad de las partículas finas nucleares es baja" significa que cada componente constituyente de las partículas finas nucleares tiene baja capacidad de elución en el disolvente, y la solubilidad de cada componente constituyente puede ser elevada, siempre y cuando cada componente constituyente tenga una baja capacidad de elución debido a la unión entre los componentes, etc.

50 No existen limitaciones particulares en cuanto a la relación del disolvente orgánico polar en el líquido C, siempre y cuando las partículas finas nucleares y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento se pueden dispersar. La concentración de disolvente orgánico polar del líquido C se puede escoger dependiendo de los tipos de disolvente, las partículas finas nucleares y el componente de la capa de revestimiento, etc., y es de un 30 a un 60 % en volumen, preferentemente de un 30 a un 40 % en volumen.

55 Es preferible que la interacción hidrófila se produzca entre el(los) componente(s) de la capa de revestimiento y la superficie de las partículas finas nucleares en el líquido de dispersión C. De este modo, las partículas finas nucleares y el(los) componente(s) de la capa de revestimiento preferentemente tienen un resto hidrófilo.

60 No existen limitaciones particulares en cuanto a los métodos de mezcla o dispersión en las etapas anteriores. Los ejemplos de los métodos incluyen los que usan un mezclador en línea, un mezclador estático, un mezclador con impulsor, un mezclador de rotor/estator, un mezclador de turbina, una hoja de sierra, un molino de coloides, un homogeneizador de alta presión, o similar, y los ejemplos preferidos de los mismos incluyen los que usan un mezclador en línea, un mezclador estático, un mezclador con impulsor, un mezclador con rotor/estator o un mezclador de turbina.

65 Por ejemplo, las partículas finas revestidas que tienen la capa de revestimiento de la membrana lipídica, de acuerdo

con la invención, se pueden producir preferentemente por medio de las siguientes etapas.

(Etapa 1). Se disuelven o dispersan un lípido y/o un tensioactivo que es una capa de revestimiento (componentes de la membrana lipídica) en el disolvente orgánico polar o una solución acuosa que comprende el disolvente orgánico polar. Se puede añadir de forma adicional al líquido un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogida(s) entre sacáridos, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua, o un tensioactivo (por ejemplo un derivado lipídico modificado con polietilen glicol), y la cantidad del mismo no se encuentra particularmente limitada.

(Etapa 2) Las partículas finas nucleares se dispersan (suspenden) en una solución acuosa.

(Etapa 3) Los líquidos obtenidos en las etapas 1 y 2 se mezclan.

Las partículas finas revestidas de la presente invención se pueden producir sustancialmente de la misma forma que anteriormente, independientemente de los tipos de partículas finas nucleares y el componente de la capa de revestimiento.

En el método de la presente invención para producir las partículas finas revestidas, no existen limitaciones particulares sobre la concentración de partículas finas nucleares en el líquido C, con tal de que las partículas finas nucleares se puedan revestir con la capa de revestimiento como se divulga por medio de la reivindicación 1. Preferentemente, la concentración de las partículas finas nucleares es de 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente, de 0,1 a 500 mg/ml. No existen limitaciones particulares sobre la concentración de(de los)componente(s) de la capa de revestimiento (por ejemplo, un lípido) en el líquido C, siempre y cuando las partículas finas nucleares puedan revestirse con el(los) mismo(s) como se divulga en la reivindicación 1 y la concentración del(de los) componente(s) de la capa de revestimiento es preferentemente de 1 µg/ml a 1 g/ml, más preferentemente, de 0,1 a 400 mg/ml. En las partículas finas revestidas obtenidas por medio del método de la presente invención, la relación en peso del(de los) componente(s) de la capa de revestimiento con respecto a las partículas finas es preferentemente de 1:0,1 a 1:1000, más preferentemente de 1:1 a 1:10.

El diámetro medio de partícula de las partículas finas revestidas obtenidas por medio del método de la invención es preferentemente de 300 nm o menos, más preferentemente de 200 nm o menos, más preferentemente de 130 nm o menos, del modo más preferido de 115 nm o menos, y por ejemplo, el tamaño de las partículas finas revestidas es preferentemente tal que las partículas finas revestidas se pueden administrar por medio de inyección. El tamaño de las partículas finas revestidas se puede aumentar al incrementar el tamaño de las partículas finas nucleares objeto de revestimiento, al tiempo que se puede reducir el tamaño de las partículas finas revestidas mediante disminución del tamaño de las partículas finas nucleares.

Las partículas finas revestidas anteriores se pueden modificar con una proteína tal como un anticuerpo, un sacárido, un glicolípido, un aminoácido, un ácido nucleico, un compuesto diverso de bajo peso molecular, un compuesto polimérico, o similar, y las partículas finas revestidas de la presente invención incluyen las partículas modificadas de esta forma. La membrana lipídica de las partículas finas revestidas se puede modificar en superficie con una proteína tal como un anticuerpo, un péptido, un compuesto de ácido graso, o similar, por ejemplo con el fin de aplicar las partículas finas revestidas para el marcaje [editado por D. D. Lasic y F. Martin, "Stealth Liposome", Estados Unidos, CRC Press Inc., 1995, p. 93-102]. Además, las partículas finas revestidas se pueden modificar en superficie con un tensioactivo no iónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un tensioactivo catiónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un tensioactivo aniónico (que tiene la misma definición que anteriormente), un polímero (que tiene la misma definición que anteriormente), un poli(derivado de oxietileno) (que tiene la misma definición que anteriormente), o similar, como con el liposoma usado como componente de las partículas finas. Las partículas finas revestidas de la invención incluyen partículas modificadas en superficie. De forma análoga, las partículas finas revestidas se pueden modificar superficialmente con un derivado lipídico, un derivado de ácido graso o un derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua; un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia(s) escogida(s) entre un sacárido, un péptido, un ácido nucleico, o un polímero soluble en agua; un tensioactivo; o similares. El derivado lipídico, derivado de ácido graso, o derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua, el derivado lipídico o el derivado de ácido graso de un sacárido, un péptido, un ácido nucleico, o un polímero soluble en agua, y el tensioactivo, usado para la modificación superficial, tienen las mismas definiciones que el derivado lipídico mencionado anteriormente, derivado de ácido graso, o derivado de hidrocarburo alifático de una sustancia soluble en agua, usados como componente para la membrana lipídica, y el derivado lipídico descrito anteriormente o el derivado de ácido graso de un sacárido, un péptido, un ácido nucleico, o un polímero soluble en agua, y el tensioactivo, usado para la preparación de partículas finas nucleares que tienen un resto hidrófilo sobre parte o la totalidad de las superficies de las partículas finas nucleares, y los componentes de la membrana lipídica incorporan los mismos.

Se pueden usar las partículas finas revestidas producidas mediante el método de la presente invención, por ejemplo, como preparación farmacéutica destinada a estabilizar un fármaco en un componente de organismo vivo tal como un componente sanguíneo (por ejemplo, sangre o un fluido digestivo), reduciendo el efecto secundario, aumentando la acumulación de un fármaco en un órgano diana de un tumor, etc., mejorando la absorción de un fármaco en administración oral o transmucosal, o similar.

En caso de que al menos un componente constituyente de las partículas finas nucleares sea un fármaco tal como un fármaco antitumoral o un fármaco anti-inflamatorio, las partículas finas revestidas producidas mediante el método de la presente invención se pueden usar como vehículo que comprende fármaco para transportar el fármaco hasta un punto tumoral o un punto de inflamación, y de este modo se puede suministrar el fármaco al punto de tumoral o punto de inflamación mediante administración de las partículas finas revestidas. Cuando el fármaco es un fármaco antitumoral, se pueden administrar las partículas finas revestidas como agente terapéutico tumoral para el tratamiento del tumor. Cuando el fármaco es un fármaco anti-inflamatorio, las partículas finas revestidas se pueden administrar como agente terapéutico para el tratamiento de la inflamación. Un tejido u órgano en el que se mejora la neovascularización es uno de los puntos en los cuales se pueden administrar las partículas finas revestidas producidas mediante el método de la presente invención. Cuando al menos un componente constituyente de las partículas finas revestidas es un fármaco terapéutico para una enfermedad en el tejido u órgano, se pueden administrar las partículas finas como agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad.

En caso de usar las partículas finas revestidas producidas mediante el método de acuerdo con la presente invención como preparación farmacéutica, se puede usar el líquido de dispersión de las partículas finas revestidas preparadas de la forma anterior como tal, por ejemplo, en forma de una preparación de inyección, etc. La relación de disolvente orgánico polar en el líquido de dispersión se puede reducir mediante adición de un disolvente que comprende un disolvente diferente de un disolvente orgánico polar presente en el líquido de dispersión, que se puede mezclar con el disolvente orgánico polar, y/o se puede retirar selectivamente el disolvente orgánico polar mediante evaporación, separación a través de membrana semipermeable, destilación fraccionada o similar. Además, el líquido de dispersión o el líquido de dispersión modificado que tiene la relación reducida de disolvente orgánico polar se puede someter a filtración, centrifugación o similar para retirar los disolventes. El líquido de dispersión o el líquido de dispersión en el que se añade un excipiente tal como manitol, lactosa, trehalosa, maltosa, o glicina se puede someter a liofilización cuando se usa como preparación farmacéutica.

En el caso de una preparación de inyección, es preferible que la preparación de inyección se prepare por medio de mezcla de, por ejemplo, agua, un ácido, un álcali, cualquiera de diversos tampones, una solución salina fisiológica, una infusión de amino ácido o similar con el líquido de dispersión o las partículas finas revestidas mencionadas anteriormente, el líquido de dispersión en el que la relación de disolvente orgánico polar es reducida o las partículas finas revestidas anteriormente mencionadas obtenida mediante retirada del disolvente o mediante liofilización. Además, es posible preparar una preparación de inyección mediante adición de un antioxidante tal como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína o EDTA, un agente isotónico tal como glicerol, glucosa, cloruro sódico o similares. Además, también se puede crio-conservar mediante adición de un agente de crio-conservación tal como glicerol.

Además, las partículas finas revestidas producidas mediante el método de acuerdo con la presente invención se pueden formular para dar lugar a una preparación oral tal como una cápsula, un comprimido o un gránulo mediante granulación junto con un excipiente apropiado o similar, secado o similar.

Se puede usar un kit en el método de producción de la invención. El kit puede comprender al menos las partículas finas nucleares, el componente de capa de revestimiento, y un líquido que comprende el disolvente orgánico polar, para la preparación de partículas finas revestidas mediante el método de la presente invención. Por ejemplo, los componentes para la preparación de las partículas finas revestidas mediante el método de la presente invención, tal como las partículas finas nucleares, el componente de la capa de revestimiento, y el líquido que comprende el disolvente orgánico polar, se introducen en pequeños recipientes respectivamente, y las partículas finas revestidas se pueden preparar mediante mezcla de los componentes de acuerdo con el método de la invención. No existen limitaciones en la mezcla, tal como la limitación de que los componentes deban mezclarse de forma gradual, y de este modo el kit sea ventajoso en el sentido de que las partículas finas revestidas se puedan preparar de forma sencilla.

La invención se describe específicamente a continuación con referencia a los Ejemplos sin intención de restringir el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Disolución de los componente(s) de la capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron 60 mg de EPC (disponible en NOF Corporation, lo mismo aplica en los siguientes ejemplos) y 12,5 mg de PEG-DSPE (disponible en NOF Corporation, lo mismo aplica en los siguientes ejemplos) en 2 ml de disolvente mixto de etanol/agua (8/5) para preparar un líquido A1.

Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se dispersaron 10 mg de fluoresceína de dextrano aniónica (FD, disponible en Molecular Probes, Inc., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos), 60 mg de DOTAP (disponible en Avanti Polar Lipids, Inc., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos), y PEG-DSPE (24 mg) en agua (2 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm (disponible en Whatman, Inc., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos) 31 veces para preparar un líquido B1.

Se añadió el líquido B1 (0,5 ml) al líquido A1 gota a gota de forma que la concentración de etanol fuese de 50 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener el líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

- 5 Se mezcló el líquido de dispersión obtenido con agua (22,5 ml) y se sometió a ultracentrifugación (1 hora, 110.000 x g, 25 °C) y se retiró el sobrenadante para obtener una preparación.

Ejemplo 2 (no de acuerdo con la invención)

- 10 Líquido de dispersión de componente(s) de capa de revestimiento (líquido D); Se dispersaron EPC (60 mg) y PEG-DSPE (12,5 mg) en 1,6 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (1/1) para preparar un líquido D2.

- 15 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido E); Se dispersaron FD (10 mg), DOTAP (60 mg) y PEG-DSPE (24 mg) en agua (1 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm, 31 veces para preparar un líquido de dispersión nuclear. Se añadió etanol (0,25 ml) al líquido obtenido (0,25 ml) de forma que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 50 % en volumen, para preparar un líquido E2.

- 20 Se mezcló el líquido D2 con el líquido E2 de forma que la concentración de etanol fuese aproximadamente 50 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

- 25 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (23 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 1, para obtener una preparación.

Ejemplo 3 (no de acuerdo con la invención)

- 30 Líquido de dispersión de componentes de capa de revestimiento y partículas finas nucleares (líquido H); Se dispersaron FD (10 mg), DOTAP (60 mg) y PEG-DSPE (24 mg) en agua (1 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm, 31 veces. Se dispersaron, por separado EPC (120 mg) y PEG-DSPE (25 mg) en agua (2 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,4 µm (disponible en Whatman, Inc., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos) 11 veces, y se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm, 21 veces. Se mezcló el líquido de dispersión obtenido de este modo de FD, DOTAP y PEG-DSPE con el líquido de dispersión de EPC y PEG-DSPE para preparar un líquido H3.

- 40 Se añadió etanol (1,25 ml) al líquido H3 de manera que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 50 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

- 45 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (22,5 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 1, para obtener una preparación.

Ejemplo comparativo 1

Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC (60 mg) y PEG-DSPE (12,5 mg) en etanol (1 ml) para preparar un líquido a1.

- 50 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se dispersaron FD (30 mg), DOTAP (180 mg) y PEG-DSPE (72 mg) en agua (9 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm, 31 veces, para preparar un líquido b1.

- 55 Se mezcló el líquido a1 (0,25 ml) con el líquido b1 (0,75 ml) de forma que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 62,5 % en volumen, y se disolvieron los componentes de la capa de revestimiento y se dispersaron las partículas finas nucleares a la concentración. Se añadió agua destilada (23 ml) a la mezcla a una tasa de 1 ml/minuto al tiempo que se agitaba, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

- 60 Se sometió el líquido de dispersión obtenido a ultracentrifugación de la misma manera que en el Ejemplo 1, para obtener una preparación.

Ejemplo de ensayo 1

- 65 Se examinaron el diámetro medio de partícula, las tasas de recuperación de FD y EPC, y la estabilidad en suero bovino fetal (FBS) de cada una de las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 1 a 3 y Ejemplo Comparativo 1 por medio de los siguientes métodos. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Diámetro medio de partícula

Se midió el diámetro medio de partícula de las partículas finas revestidas en una solución salina de fosfato (PBS) con un método de dispersión de luz dinámica (DLS) usando un aparato A MODELO ELS-800 (fabricado por Otsuka Electronics, Co., Ltd., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos).

Tasas de recuperación de FD y EPC

Se diluyó cada preparación con PBS de forma que la concentración total de lípidos fuese de 30 mg/ml y posteriormente se diluyó 1000 veces con PBS. Se añadieron 50 µl de 10% p/v de TRITON X-100 (disponible en Wako Pure Chemical Industries, Ltd., lo mismo aplica en los ejemplos siguientes) y PBS (400 µl) a cada líquido diluido (50 µl) y se agitó mediante un mezclador vorticial. Se diluyó el sobrenadante obtenido por medio de ultracentrifugación en cada uno de los Ejemplos y Ejemplos comparativos anteriores, 10 veces con PBS, y se añadieron 10 % en p/v de TRITON X-100 (50 µl) y PBS (400 µl) a cada líquido diluido (50 µl) y se agitó mediante un mezclador vorticial. Se colocaron 100 µl de los líquidos obtenidos de este modo en una microplaca de 96 pocillos respectivamente, y se midieron sus intensidades de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 530 nm, usando un lector de placas de fluorescencia (ARV0sx-4 fabricado por Wallac, lo mismo aplica en los siguientes ejemplos). Entre tanto, se midieron las intensidades de fluorescencia de los líquidos FD-PBS que tenían concentraciones de 1, 0,5 y 0,25 µg/ml respectivamente, para obtener una curva de calibración. Se obtuvo la concentración de FD de cada preparación usando la curva de calibración. Además, se obtuvo la concentración de EPC de cada preparación mediante el uso de Phospholipid C-TEST WAKO (disponible en Wako Pure Chemical Industries, Ltd., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos).

Se calcularon la tasa de recuperación de FD y la tasa de recuperación de EPC de cada preparación usando las siguientes ecuaciones (1) y (2).

[Ecuación 1]

$$\text{Tasa de Recuperación de FD (\%)} = A_1 / (A_1 + B_1) \times 100 \quad (1)$$

A₁: contenido de FD de las partículas finas revestidas (µg) = Concentración de FD en la fracción de partículas finas revestidas (µg/ml) x Volumen de partículas finas revestidas (ml)

B₁: contenido de FD del sobrenadante (µg) = concentración de FD en el sobrenadante (µg/ml) x Volumen de sobrenadante (ml)

[Ecuación 2]

$$\text{Tasa de Recuperación de EPC (\%)} = A_2 / (A_2 + B_2) \times 100 \quad (2)$$

A₂: contenido de EPC de las partículas finas revestidas (µg) = Concentración de EPC en la fracción de partículas finas revestidas (µg/ml) x Volumen de partículas finas revestidas (ml)

B₂: contenido de EPC del sobrenadante (µg) = Concentración de EPC en el sobrenadante (µg/ml) x Volumen de sobrenadante (ml)

Estabilidad en FBS

Se diluyó cada preparación con PBS de forma que la concentración total de lípidos fuese de 30 mg/ml y se añadió FBS (2970 µl) y se mezcló con 30 µl de líquido diluido.

Se aislaron partes de 500 µl a partir de la mezcla obtenida inmediatamente después de la mezcla y posteriormente se permitió el reposo de la mezcla a 37 °C durante 3 horas, y se sometió a cromatografía de permeabilidad de gel (GPC), de forma respectiva. Se recuperaron 10 fracciones (cada una comprendía 100 gotas) a partir de cada porción, y se agitaron las fracciones mediante sacudidas con un mezclador vorticial para preparar las muestras. Para determinar el contenido de FD de cada muestra, se añadieron 10 % en p/v de TRITON X-100 (50 µl) y PBS (400 µl) a 50 µl de la muestra y se agitó mediante un mezclador vorticial. Se colocaron 100 µl de los líquidos obtenidos de esta forma en una microplaca de 96 pocillos respectivamente, y se midieron sus intensidades de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 530 nm usando ARV0sx-4. Se calcularon las retenciones de fármaco de las partículas finas trascurridas 0 y 3 horas usando la siguiente ecuación (3).

[Ecuación 3]

$$\begin{aligned} \text{Retención de FD tras 0 horas (\%)} &= A_3 / B_3 \times 100 \\ \text{Retención de FD tras 3 horas (\%)} &= C_3 / D_3 \times 100 \quad (3) \end{aligned}$$

A₃ = Σ{(Intensidad de fluorescencia de fracción) Fracciones de partículas finas revestidas (tras 0 horas) x

(Volumen de fracción) Fracciones de partículas finas revestidas (tras 0 horas)}

$B_3 = \Sigma\{(\text{Intensidad de fluorescencia de fracción}) \text{ Todas las fracciones (tras 0 horas)} \times (\text{Volumen de fracción}) \text{ Todas las fracciones (tras 0 horas)}\}$

$C_3 = \Sigma\{(\text{Intensidad de fluorescencia de fracción}) \text{ Fracciones partículas finas revestidas (tras 3 horas)} \times (\text{Volumen de fracción}) \text{ Fracciones de partículas revestidas (tras 3 horas)}\}$

$D_3 = \Sigma\{(\text{Intensidad de fluorescencia de fracción}) \text{ Todas las fracciones (tras 3 horas)} \times (\text{Volumen de fracción}) \text{ Todas las fracciones (tras 3 horas)}\}$

[Tabla 1]

| | Diámetro medio de partícula (nm) | Tasa de recuperación (%) | | Retención en FBS (%) | |
|-------------|----------------------------------|--------------------------|-----|----------------------|-----------|
| | | FD | EPC | 0 horas | 3 horas |
| Ej. 1 | 128 | 92 | 93 | No medido | No medido |
| Ej. 2 | 150 | 85 | 84 | 61 | 58 |
| Ej. 3 | 114 | 86 | 82 | 63 | 59 |
| Comp. Ej. 1 | 145 | 96 | 88 | 68 | 67 |

Como se muestra en la Tabla 1, las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 1 a 3 tuvieron diámetros de partícula pequeños como con la preparación obtenida en el Ejemplo Comparativo 1 y las preparaciones de los Ejemplos 1 y 3 tuvieron diámetros de partícula pequeños de 130 nm o menos y 115 nm o menos, de forma respectiva. Además, en las preparaciones de los Ejemplos 1 a 3, el fármaco se encerró de forma eficiente y firme en las partículas finas revestidas como la preparación del Ejemplo comparativo 1. El método de la presente invención para producir las partículas finas revestidas es más simple que los métodos convencionales, y sin limitación de que los componentes tengan que mezclarse de forma gradual, etc. A pesar de esto, se pueden obtener excelentes partículas finas revestidas similares a las obtenidas en los métodos convencionales.

Ejemplo 4

Se añadió PBS a la preparación del Ejemplo 1 para ajustar la concentración de EPC en 24 mg/ml, y se mezclaron 0,5 ml del líquido obtenido con una solución preparada mediante disolución de PEG-DSPE (2,5 mg) en etanol (0,02 ml). Se calentó la mezcla a 70 °C durante 2 minutos para obtener la preparación con superficie modificada con PEG.

Ejemplo comparativo 2

Se añadió PBS a la preparación del Ejemplo Comparativo 1 para ajustar la concentración de EPC en 24 mg/ml y se mezclaron 0,5 ml del líquido obtenido con una solución preparada mediante disolución de PEG-DSPE (2,5 mg) en etanol (0,02 ml). Se calentó la mezcla a 70 °C durante 2 minutos para obtener la preparación con superficie modificada con PEG.

Ejemplo de ensayo 2

Se examinaron las cinéticas sanguíneas de las preparaciones obtenidas en el Ejemplo 4 y Ejemplo comparativo 2 mediante los siguientes métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 1.

Cinéticas sanguíneas

Se diluyó cada preparación con PBS de forma que la concentración total de lípidos fuese 5 mg/ml y se administró a una rata a una relación de lípido/peso de rata de 10 mg/kg. Se tomaron muestras sanguíneas de la rata transcurridos 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas desde la administración, y se sometieron a centrifugación para obtener plasmas, de forma respectiva. Para determinar el contenido de FD de cada plasma, se añadieron 10 % p/v de TRITON X-100 (50 µl) y PBS (400 µl) a 50 µl de plasma y se agitó mediante un mezclador vorticial. Se colocaron 100 µl de los líquidos obtenidos de esta forma en una microplaca de 96 pocillos respectivamente, y se midieron sus intensidades de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 530 nm usando ARVOSx-4. Entre tanto, se midieron respectivamente las intensidades de fluorescencia de los líquidos FD-PBS que tenían concentraciones de 1, 0,5 y 0,25 µg/ml, para obtener una curva de calibración. Se obtuvo la concentración de FD del plasma usando la curva de calibración. Se consideró la cantidad de plasma por cada 100 g de rata como 7,8 ml, y de este modo se calculó la retención de fármaco en la sangre (%) con respecto a la dosis de administración, y se calculó $AUC_{0-24 \text{ h}}$ (µg min/dosis) mediante un método trapezoidal.

| [Tabla 2] | | |
|-------------|----------------------------------|--------------------|
| | Diámetro medio de partícula (nm) | AUC (µg min/dosis) |
| Ej. 4 | 128 | 423 |
| Comp. Ej. 2 | 145 | 342 |

5 Como se muestra en la Tabla 2, la preparación obtenida en el Ejemplo 4 exhibió una retención excelente en sangre de un cuerpo vivo como la preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 2. El método de la presente invención para producir partículas finas revestidas es un método simple, y a pesar de esto, se pueden obtener excelentes partículas finas revestidas similares a las obtenidas en los métodos convencionales.

Ejemplo 5

10 Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC (15 mg) y PEG-DSPE (3,125 mg) en 1 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (8/5) para preparar un líquido A5.

15 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se dispersaron DOTAP (90 mg) y PEG-DSPE (36 mg) en agua (2 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,4 µm 11 veces, se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm 11 veces, y se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,05 µm (disponible en Whatman, Inc., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos) 25 veces. A 0,167 ml del líquido de dispersión se añadió una solución que comprendía 0,083 ml de agua y 1,87 mg de ODN (fluoresceína marcada con isocianato, fosforotioato oligooxiribonucleótido, que tenía una secuencia de (5') CCT CTT ACC TCA G (3'), un número de bases de 13 y un peso molecular de 4573,57, disponible en SciMedia Ltd., lo mismo aplica en los siguientes ejemplos), para preparar un líquido B5.

20 Se mezcló el líquido A5 con el líquido B5 de forma que la concentración de etanol fuese aproximadamente 50 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

Se mezcló el líquido de dispersión obtenido de partículas finas con agua (11,25 ml) y se sometió a ultracentrifugación (1 hora, 110.000 x g, 25 °C) y se retiró el sobrenadante para obtener una preparación.

30 Ejemplo 6

Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC y PEG-DSPE en 0,9 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (8/5), siendo las cantidades de EPC y PEG-DSPE las mismas que las de líquido A1 del Ejemplo 5, para preparar un líquido A6.

35 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se añadió agua destilada (0,1 ml) al líquido B5 del Ejemplo 5 para preparar un líquido B6.

40 Se mezcló el líquido A6 con el líquido B6 de manera que la concentración de etanol fuese aproximadamente 45 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

45 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (10 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo 7

50 Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC y PEG-DSPE en 0,8 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (8/5), siendo las cantidades de EPC y PEG-DSPE las mismas que las de líquido A5 del Ejemplo 5, para preparar un líquido A7.

Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se añadió agua (0,2 ml) al líquido B5 del Ejemplo 5 para preparar un líquido B7.

55 Se mezcló el líquido A7 con el líquido B7 de manera que la concentración de etanol fuese aproximadamente 40 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

60 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (8,75 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo 8

5 Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC y PEG-DSPE en 0,7 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (8/5), siendo las cantidades de EPC y PEG-DSPE las mismas que las de líquido A5 del Ejemplo 5, para preparar un líquido A8.

Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se añadió agua destilada (0,3 ml) al líquido B5 del Ejemplo 5 para preparar un líquido B8.

10 Se mezcló el líquido A8 con el líquido B8 de manera que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 35 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

15 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (7,5 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo 9 (no de acuerdo con la invención)

20 Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC y PEG-DSPE en 0,5 ml de un disolvente mixto de etanol/agua (8/5), siendo las cantidades de EPC y PEG-DSPE las mismas que las de líquido A5 del Ejemplo 5, para preparar un líquido A9.

25 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se añadió agua destilada (0,5 ml) al líquido B5 del Ejemplo 5 para preparar un líquido B9.

Se mezcló el líquido A9 con el líquido B9 de manera que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 25 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

30 El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (5 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo comparativo 3

35 Disolución de componente(s) de capa de revestimiento (líquido A); Se disolvieron EPC (30 mg) y PEG-DSPE (6,25 mg) en etanol (1 ml) para preparar un líquido a3.

40 Líquido de dispersión de partículas finas nucleares (líquido B); Se dispersaron DOTAP (60 mg) y PEG-DSPE (24 mg) en agua (2 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,4 µm 11 veces, se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm 11 veces, y se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,05 µm 21 veces. A 0,5 ml de la dispersión líquida se añadió una solución que comprendía 0,25 ml de agua y 3,75 mg de ODN para preparar un líquido b3.

45 Se mezclaron 0,25 ml del líquido a3 con el líquido b3 de manera que la concentración de etanol fuese aproximadamente 62,5 % en volumen y se disolvieron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración. Se añadió agua (23 ml) a la mezcla a una tasa de 1 ml/minuto al tiempo que se agitaba, para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

50 Se sometió el líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas a ultracentrifugación de la misma manera que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo de ensayo 3

55 Se examinaron el diámetro medio de partícula, las tasas de recuperación de ODN y EPC, y la estabilidad en FBS de cada una de las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 5 a 9 y Ejemplo comparativo 3 mediante los siguientes métodos. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Diámetro medio de partícula

60 Se midió el diámetro medio de partícula de las partículas finas revestidas en PBS mediante DLS.

Tasas de recuperación de ODN y EPC

65 Se diluyó cada preparación con PBS de forma que la concentración total de lípidos fuese de 30 mg/ml y posteriormente se diluyó 1000 veces con PBS. Se añadieron 10 % p/v de TRITON X-100 (50 µl) y PBS (400 µl) a 50

[Tabla 3]

| | Diámetro medio de partícula (nm) | Tasa de recuperación (%) | | Retención en FBS (%) | |
|-------------|----------------------------------|--------------------------|--------|----------------------|-----------|
| | | ODN | Lípido | 0 horas | 3 horas |
| Ej. 5 | 124 | 84 | 45 | 68 | 43 |
| Ej. 6 | 125 | 85 | 57 | 84 | 62 |
| Ej. 7 | 119 | 88 | 70 | 87 | 73 |
| Ej. 8 | 129 | 88 | 70 | 79 | 61 |
| Ej. 9 | 110 | 85 | 29 | 55 | 32 |
| Comp. Ej. 3 | 145 | 97 | 59 | No medido | No medido |

Como se muestra en la Tabla 3, las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 5 a 9 tuvieron diámetros de partícula pequeños como la preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 3 y las preparaciones de los Ejemplos 5 a 8 tuvieron diámetros de partícula más pequeños, de 130 nm o menos, respectivamente, y la preparación del Ejemplo 9 tuvo un diámetro de partícula más pequeño, de 115 nm o menos. Además, en las preparaciones de los Ejemplos 5 a 9, el fármaco se encerró de forma eficiente y firme en las partículas finas revestidas como la preparación del Ejemplo comparativo 3. El método de la invención llevado a cabo en los Ejemplos 5 a 9 comprendió las etapas de: preparar el líquido A que comprendía el disolvente orgánico polar, en el que se disolvieron los componentes de la capa de revestimiento; preparar el líquido B apto para mezcla con el líquido A, en el que se dispersaron las partículas finas nucleares y el disolvente orgánico polar no estuvo presente o el disolvente orgánico polar estuvo presente en una relación menor que en el líquido A; y mezclar el líquido A con el líquido B para preparar el líquido C, produciendo de este modo las partículas finas revestidas que comprendían las partículas finas nucleares con los componentes de capa de revestimiento. El método es más simple que los métodos convencionales, y sin limitación de que los componentes se tengan que mezclar de forma gradual, etc. A pesar de esto, se podrían obtener excelentes partículas finas revestidas mediante el método de la presente invención similares a las obtenidas en los métodos convencionales, incluso en el caso de usar un fármaco relativamente grande de ODN como las partículas finas nucleares.

20 **Ejemplo 10 (no de acuerdo con la invención)**

Líquido de dispersión de componentes de capa de revestimiento y partículas finas nucleares (líquido H); Se dispersaron EPC (30 mg) y PEG-DSPE (6,25 mg) en agua (0,75 ml). Se hizo pasar el líquido de dispersión resultante a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,4 µm 11 veces, y se hizo pasar a través de una membrana de policarbonato que tenía un diámetro de poro de 0,1 µm 25 veces, para obtener un líquido de dispersión lipídica. Se mezclaron 0,375 ml del líquido de dispersión lipídica con el líquido B5 del Ejemplo 5 para preparar un líquido H10.

Se añadió etanol (0,625 ml) al líquido H10 de manera que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 50 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración. Se agitó el líquido obtenido durante 30 minutos para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (11,25 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

35 **Ejemplo 11 (no de acuerdo con la invención)**

Líquido de dispersión de componentes de capa de revestimiento y partículas finas nucleares (líquido H); Se preparó un líquido H11 de la misma forma que el líquido H10 del Ejemplo 10, exceptuando que la cantidad de agua fue de 1 ml y se mezclaron 0,5 ml del líquido de dispersión lipídica con el líquido B5 del Ejemplo 5.

Se añadió etanol (0,5 ml) al líquido H11 de manera que la concentración de etanol fuese de aproximadamente 40 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración. Se agitó el líquido obtenido durante 30 minutos para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (8,75 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

50 **Ejemplo 12 (no de acuerdo con la invención)**

Líquido de dispersión de componentes de capa de revestimiento y partículas finas nucleares (líquido H); Se preparó un líquido H12 de la misma forma que el líquido H10 del Ejemplo 10 exceptuando que la cantidad de agua fue de 1.

ml y 0. Se mezclaron 563 ml del líquido de dispersión lipídica con el líquido B5 del Ejemplo 5.

Se añadió etanol (0,438 ml) al líquido H12 de manera que la concentración de etanol fuese aproximadamente 35 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración. Se agitó el líquido obtenido durante 30 minutos para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (7,5 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo 13 (no de acuerdo con la invención)

Líquido de dispersión de componentes de capa de revestimiento y partículas finas nucleares (líquido H); Se preparó un líquido H13 de la misma forma que el líquido H10 del Ejemplo 10 exceptuando que la cantidad de agua fue de 1,375 ml y se mezclaron 0,688 ml del líquido de dispersión lipídica con el líquido B5 del Ejemplo 5.

Se añadió etanol (0,313 ml) al líquido H13 de manera que la concentración de etanol fuese aproximadamente 25 % en volumen y se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares a la concentración. Se agitó el líquido obtenido durante 30 minutos para obtener un líquido de dispersión de partículas finas revestidas.

El líquido de dispersión obtenido de partículas finas revestidas se mezcló con agua (5 ml) y se sometió a ultracentrifugación de la misma forma que en el Ejemplo 5, para obtener una preparación.

Ejemplo de ensayo 4

Se examinaron el diámetro medio de partícula, las tasas de recuperación de ODN y EPC, y la estabilidad en FBS de cada una de las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 10 a 13 de la misma manera que en el Ejemplo de ensayo 3. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

| | Diámetro medio de partícula (nm) | Tasa de recuperación (%) | | Retención en plasma (%) | |
|-------------|----------------------------------|--------------------------|-----|-------------------------|-----------|
| | | ODN | EPC | 0 horas | 3 horas |
| Ej. 10 | 108 | 79 | 43 | 56 | 29 |
| Ej. 11 | 98 | 90 | 76 | 82 | 61 |
| Ej. 12 | 99 | 93 | 74 | 88 | 70 |
| Ej. 13 | 95 | 90 | 79 | 73 | 60 |
| Comp. Ej. 3 | 145 | 97 | 59 | No medido | No medido |

Como se muestra en la Tabla 4, las preparaciones obtenidas en los Ejemplos 10 a 13 tuvieron diámetros de partícula pequeños como la preparación obtenida en el Ejemplo comparativo 3 y la preparación del Ejemplo 10 tuvo un diámetro de partícula pequeño de 115 nm o menos y las preparaciones de los Ejemplos 11 a 13 tuvieron diámetros de partícula de 100 nm o menos, de forma respectiva. Además, en las preparaciones de los Ejemplos 10 a 13, el fármaco se encerró de forma eficiente y firme en las partículas finas revestidas como la preparación del Ejemplo comparativo 3. El método de la presente invención llevado a cabo en el ejemplo 13 comprendió las etapas de: preparar el líquido H, en el que se dispersaron los componentes de la capa de revestimiento y las partículas finas nucleares; y mezclar el líquido H con el líquido apto para mezcla con el líquido H, en el que el disolvente orgánico polar estuvo presente, para preparar el líquido I, produciendo de este modo las partículas finas revestidas que comprendían las partículas finas nucleares con los componentes de capa de revestimiento. El método es más simple que los métodos convencionales, y sin limitación de que los componentes se tengan que mezclar de forma gradual, etc. A pesar de esto, se pudieron obtener excelentes partículas finas revestidas por medio del método de la presente invención, similares a las obtenidas en los métodos convencionales, incluso en el caso de usar el fármaco relativamente grande de ODN en las partículas finas nucleares.

Como resulta evidente a partir de las Tablas 3 y 4, el método de la presente invención de producción de partículas finas revestidas resulta ventajoso también debido a que la cantidad del disolvente orgánico polar usado puede ser más pequeña en comparación con los métodos convencionales.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para producir de forma sencilla partículas finas revestidas en el cual las partículas finas nucleares se revisten con un componente de capa de revestimiento y

similares. Además, se proporciona un método de producción de partículas finas nucleares en el que se encierra un fármaco de forma eficiente y/o firme.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de partículas finas revestidas en el que las partículas finas nucleares se revisten con un componente de capa de revestimiento, que comprende las etapas de:
 - 5 preparar un líquido A que comprende un componente de capa de revestimiento o componentes de capa de revestimiento disueltos en el mismo y un disolvente orgánico polar;
 - preparar un líquido B apto para mezcla con el líquido A, en el que están dispersas las partículas finas nucleares y en el no está contenido un disolvente orgánico polar, o dicho disolvente orgánico polar está contenido en una
 - 10 relación menor que en el líquido A; y
 - mezclar el líquido A con el líquido B para preparar un líquido C de manera que la concentración del disolvente orgánico polar en el líquido C sea del 30 al 60 % en volumen, las partículas finas nucleares no se disuelvan en el líquido C y el componente o componentes de capa de revestimiento está/están en estado dispersado en el líquido C; y
 - 15 dejar o mezclar el líquido C durante 3 segundos a 30 minutos.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el componente o componentes de la capa de revestimiento es/son una o más sustancia o sustancias seleccionadas entre lípidos y tensioactivos para la formación de una capa de revestimiento de una membrana lipídica.
 - 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el componente o componentes de la capa de revestimiento es/son una sustancia o sustancias seleccionadas entre lípidos y tensioactivos para la formación de una capa de revestimiento de una membrana lipídica, y un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia o sustancias seleccionadas entre sacáridos, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua, o un tensioactivo.
 - 25
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las partículas finas nucleares comprenden un derivado lipídico o un derivado de ácido graso de una o más sustancia o sustancias seleccionadas entre sacáridos, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua, o un tensioactivo.
 - 30
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que el derivado lipídico o el derivado de ácido graso de una o más sustancia o sustancias seleccionadas entre sacáridos, péptidos, ácidos nucleicos y polímeros solubles en agua, o un tensioactivo, es una o más sustancia o sustancias seleccionadas entre poli(lípidos etilen glicolados), poli(lípidos modificados con glicerina), poli(éteres alquílicos de etilen glicol), poli(ésteres de ácido graso de sorbitán y etilen glicol), poli(ésteres de ácido graso de etilen glicol), poli(ésteres de ácido graso de glicerina), polioxietilen polioxipropilén glicoles y ésteres de ácido graso de glicerina.
 - 35
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que comprenden, como componente constituyente, uno o más componente o componentes seleccionados entre un fármaco, un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y una preparación de partículas finas.
 - 40
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que comprenden un fármaco como componente constituyente.
 - 45
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que comprenden, como componente constituyente, un complejo de un fármaco y uno o más componente o componentes seleccionados entre un conjunto lipídico, liposoma, partículas en emulsión, un polímero, un coloide metálico y una preparación de partículas finas.
 - 50
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el conjunto lipídico, el liposoma, las partículas en emulsión, el polímero, el coloide metálico o la preparación de partículas finas tienen una carga electrostática opuesta a la del fármaco.
 - 55
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que comprenden, como componente constituyente, un complejo de un fármaco aniónico y un liposoma que comprende un lípido catiónico.
 - 60
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que comprenden, como componente constituyente, un complejo de un fármaco catiónico y un liposoma que comprende un lípido aniónico.
 - 65
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que las partículas finas nucleares son partículas finas que además comprenden un agente competitivo de adhesión.
 - 65
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que el fármaco es uno o más

componente o componentes seleccionados entre péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, compuestos de bajo peso molecular, sacáridos y compuestos poliméricos.

- 5 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en el que el fármaco es uno o más componente o componentes seleccionados entre genes, ADN, ARN, oligonucleótidos, plásmidos y ARNs.

Figura 1

