

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 299**

51 Int. Cl.:

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2010 PCT/US2010/021684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10096231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2010 E 10744101 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2398476**

54 Título: **Nanopartículas de policosanol**

30 Prioridad:

23.02.2009 US 154712 P

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**NANORX, INC. (100.0%)
6 Devoe Place
Chappaque, NY 10514, US**

72 Inventor/es:

RAGHAVAN, PALAYAKOTAI, R.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 299 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

Nanopartículas de policosanol

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de nanopartículas que comprenden al menos un policosanol, a nuevas formulaciones de policosanol nanoparticuladas, y a los usos de éstas. En diversas formas de realización, las partículas nanoparticuladas de policosanol tienen un tamaño promedio efectivo de partículas de menos de aproximadamente 100 nm.

Antecedentes de la invención

10 El policosanol es una mezcla compleja de N-alquilalcoholes concentrados de cadena larga derivados de fuentes vegetales, tales como caña de azúcar. Los estudios iniciales en Cuba para estudiar los efectos de policosanol sobre los niveles séricos de lípidos y de lipoproteínas en voluntarios sanos indicaron que, con dosis de 2-40 mg/d, la administración de policosanol redujo los niveles séricos de lípidos y lipoproteínas (Hernandez et al., Curr. Ther. Res. Clin. Exp. 1992; 51: 568), y redujo la hipercolesterolemia (Pons et al., Curr. Ther. Res. Clin. Exp.; 1992; 52: 507). Sin embargo, a pesar de numerosos estudios posteriores, los investigadores fuera de Cuba no han podido verificar las reivindicaciones realizadas en conjunción con la investigación original. La falta de efectividad del policosanol sobre los niveles séricos de lípidos/colesterol ha sido ampliamente documentada en publicaciones respetadas revisadas por expertos.

20 Por ejemplo, Francini-Pesenti y colaboradores llevaron a cabo estudios doble ciego, aleatorizados, controlados por placebo de policosanol en sujetos con hipercolesterolemia y concluyeron que dosis de 10 mg/d y 20 mg/d de policosanol no mostraron efectos de reducción de lípidos (Complement Ther. Med.; 2008; 16(2): 61; y Phytother. Res.; 2008; 22(3): 318). En un estudio ciego similar, controlado por placebo, Berthold y colaboradores mostraron que dosis de 10, 20, 40 y 80 mg/d de policosanol no dieron por resultado menores niveles séricos de lípidos que los observados en sujetos a las cuales se administró placebo (JAMA; 2006; 295(19): 2262). Dullens *et al.* encontraron que ni los componentes individuales de policosanol (C24, C26, C28, o C30) ni la mezcla natural de policosanol (25 todos los componentes, 30 mg/100 g de dieta) redujeron las concentraciones séricas de colesterol en ratones con receptor de LDL inactivado (J. Lipid Res.; 2008; 49(4): 790). Kassis y colaboradores estudiaron la eficacia de los policosanolos de la caña de azúcar cubana para el tratamiento de hipercolesterolemia en seres humanos a una dosis de 10 mg/d y concluyeron que el policosanol no tenía efectos beneficiosos sobre los indicadores lipídicos en sujetos hipercolesterolemicos (Am. J. Clin. Nutr.; 2006; 84(5): 1003). Lin y colaboradores estudiaron los efectos de 30 20 mg/d de dosis de policosanol de germen de trigo en sujetos con colesterol plasmático normal a levemente elevado y no detectaron reducción del colesterol en plasma (Metabolism; 2004; 53(10): 1309). Lukashevich *et al.* encontraron que el policosanol de la cera de abejas (10 mg o 40 mg) administrado diariamente en formulaciones de comprimidos o geles blandos no tenía efecto sobre los lípidos séricos en sujetos con hipercolesterolemia leve a moderada (Circulation; 2006; 114: 892). Murphy *et al.* encontraron que la suplementación en la dieta de conejos con 35 policosanol proveniente de aceite de girasol no tenía ningún efecto reductor del colesterol. (J. Am. College Nutr, 2008; 27(4): 476).

40 En consecuencia, a pesar de los resultados iniciales aparentemente prometedores de la investigación cubana, la conclusión a que se debe llegar a partir de los estudios ciegos, controlados por placebo contemporáneos es que las formulaciones de policosanol conocidas en la técnica no son efectivas para modular los niveles séricos de lípidos/colesterol.

La investigación sobre la utilidad de las formulaciones de policosanol sobre otros parámetros metabólicos y fisiológicos ha producido resultados negativos similares. Por ejemplo, se mostró que el policosanol no tiene efecto sobre los niveles de azúcar en sangre, el control de la glucemia (Crespo et al., Int. J. Clin. Pharm. Res.; 1999: 117) o el estado diabético (Shinbori et al., Eur. J. Pharmacol; 2007; 139-144).

45 Durante un tiempo hubo una controversia sobre si la composición o la formulación de policosanol usada en los estudios cubanos era responsable de la inconsistencia de los resultados entre la investigación cubana y las de otros investigadores. Esta controversia se dejó de lado en investigaciones seminales (Kassis, British Journal of Nutrition (2007), 97, 381-388; Kassis, Lipids Health Dis.(2008); 7:17; Kassis Appl. Physiol. Nutr. Metab; (2008); 33(3): 540 y Dullens J. Lipid Res. (2008), 49: 790). Estos autores utilizaron diferentes formulaciones de policosanol derivado de 50 caña de azúcar, incluyendo la formulación usada en la investigación cubana. Sus estudios concluyeron que ninguna de las formulaciones de policosanol ensayadas mejoró significativamente los parámetros lipídicos en seres humanos o animales respecto al control. Además, la evaluación *in vivo* de oxidación de LDL no mostró alteración significativa de la concentración de LDL oxidado respecto a la línea base y control. En consecuencia, hacia mediados de 2008, la controversia respecto de los efectos reductores de los lípidos séricos de las formulaciones cubanas de policosanol así como de otras de caña de azúcar se resuelve fuera de Cuba.

55 WO 2007/092509 describe partículas de lípido con diámetros de 0,2-10 micrómetros que comprenden policosanol y tocoferoles. Las composiciones de WO 2007/092509 se pretenden para reducción del colesterol, sin embargo, TPGS (succinato de tocoferol polietilen glicol (1000)) no se describe en WO 2007/092509. WO 2007/092509 no

enseña el uso de succinato de tocoferil polietilen glicol (1000) ("TPGS"). WO 2007/092509 describe el uso de partículas de policosanol que incluyen tocoferol. Sin embargo, el tocoferol no es el mismo compuesto que TPGS. El tocoferol no incluye un resto PEG, y el tocoferol tampoco incluye un resto succinato.

Resumen de la invención

- 5 La presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones nanoparticuladas de policosanol, así como también métodos para preparar dichas nanopartículas y formulaciones según las reivindicaciones 1-8, respectivamente. Bastante sorprendentemente, las formulaciones de policosanol de la invención reducen el colesterol y los lípidos séricos y reducen la presión arterial sistólica y diastólica. Además, las formulaciones de la invención ejercen efectos antioxidantes, mitigan la resistencia a insulina y sus consecuencias, elevan los niveles de vitamina C y regulan los niveles de azúcar en sangre. En consecuencia, la invención también proporciona una formulación de nanopartículas según la reivindicación 7 para uso en el tratamiento de enfermedades según la reivindicación 9.

Otros objetos, ventajas y formas de realización de la invención se establecen en la descripción detallada siguiente.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La FIG. 1 muestra el tamaño del tamaño de las partículas de la invención respecto de otras nanopartículas.
- La FIG. 2 muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas de la invención con un pico a aproximadamente 48 nm medido por dispersión de la luz.
- La FIG. 3 muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas de la invención con un pico a aproximadamente 55 nm medido por dispersión de la luz.
- 20 La FIG. 4 muestra la distribución de tamaños de las nanopartículas de la invención con un pico a aproximadamente 53 nm medido por dispersión de la luz.
- La FIG. 5 muestra los niveles de resistencia a insulina en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención a 1 mg/kg y 2 mg/kg.
- 25 La FIG. 6 muestra los niveles plasmáticos de adiponectina en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 7 muestra niveles sanguíneos de fosfatasa alcalina en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención a 1 mg/kg y 2 mg/kg.
- La FIG. 8 muestra los niveles de la relación de colesterol total/HDL ratio en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención a 1 mg/kg y 2 mg/kg.
- 30 La FIG. 9 muestra niveles sanguíneos de proteína C reactiva en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención a 1 mg/kg y 2 mg/kg.
- La FIG. 10 muestra niveles de glucosa sanguínea en ayunas en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 11 muestra niveles de glutatión en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- 35 La FIG. 12 muestra niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 13 muestra niveles de HDL en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 14 muestra los niveles de ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- 40 La FIG. 15 muestra los niveles de MCP-1 (proteína quimiotáctica 1 de monocitos) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 16 muestra los niveles de H₂S (sulfuro de hidrógeno) plasmático en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- 45 La FIG. 17 muestra los niveles de PAI-1 (inhibidor de la activación de plasminógeno) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 18 muestra los niveles de óxido nítrico en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.
- La FIG. 19 muestra los niveles de oxidación de proteínas en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la

invención.

La FIG. 20 muestra los niveles de glucosa aleatorios en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

5 La FIG. 21 muestra los niveles de peroxidación de lípidos en eritrocitos sanguíneos en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 22 muestra los niveles de RBP-4 (proteína de unión retinal) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 23 muestra los niveles de TNF-alfa (factor de necrosis tumoral) en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

10 La FIG. 24 muestra los niveles de colesterol total en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 25 muestra los niveles de triglicéridos en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 26 muestra los niveles de vitamina C en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

15 La FIG. 27 muestra las intensidades de proteínas p50 y p65 de NF-KB (factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas) por análisis de transferencia western en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 28 muestra la relación de p-50-nf-kb/beta actina en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

La FIG. 29 muestra la relación de p-50-nf-kb/beta actina en ratas no tratadas y ratas tratadas con partículas de la invención.

20 **Descripción detallada de la invención y las formas de realización preferidas**

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen generalmente el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

25 El término "policosanol" se refiere a una mezcla de N-alquilalcoholes concentrados. Los ejemplos de fuentes de policosanol son caña de azúcar y cera de abejas. Los policosanoles se extraen por métodos conocidos. Los alcoholes de cadena larga en los policosanoles son principalmente 1-octacosanol, 1-triacontanol, 1-tetracosanol, y 1-hexacosanol. Las composiciones disponibles comercialmente típicas están compuestas por 90% como mínimo de alcoholes grasos de (a) 1-tetracosanol: 0-10%; (b) 1-hexacosanol: 2-15%; (c) 1-heptacosanol: 0-0,5%; (d) 1-octacosanol: 55-70%; (e) 1-nonacosanol: 0-10%; (f) 1-triacontanol: 5-20%; (g) 1-dotriacontanol: 0,1- 10%; y (h) 1-tetratriacontanol: 0,1-10%.

30 Los términos "tamaño promedio efectivo de partículas", "tamaño de partícula" y "tamaño" se usan indistintamente. Los términos se refieren al tamaño de partícula que esencialmente corresponde al ápice de un pico producido en una evaluación de tamaño de partícula mediante el uso de dispersión de la luz. Los métodos útiles para determinar el tamaño de las partículas de la invención no se limitan a la dispersión de la luz.

35 Los métodos y las formulaciones se pueden usar con fines profilácticos o terapéuticos. En algunas formas de realización, los términos "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de sus síntomas clínicos). En otras formas de realización, "tratar" o "tratamiento" se refieren a mejorar al menos un parámetro físico, el cual puede no ser discernible por el sujeto. En aun otras formas de realización, "tratar" o "tratamiento" se refieren a inhibir la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización o erradicación de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización o erradicación de un parámetro físico) o ambos. En aun otras formas de realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a retrasar el inicio de la enfermedad o trastorno.

40 "Cantidad terapéuticamente efectiva" se usa indistintamente en la presente memoria con "una cantidad efectiva para". Cuando se usan en referencia a una dosis de policosanol, estos términos se refieren a una dosificación que proporciona la respuesta farmacológica específica para la cual se administra el policosanol en un número significativo de sujetos con necesidad de dicho tratamiento. Se destaca que "cantidad terapéuticamente efectiva" administrada a un sujeto particular en una instancia particular puede no ser efectiva para el 100% de los pacientes tratados para una enfermedad específica, y no siempre será efectiva para tratar las enfermedades descritas en la presente memoria, aun cuando dicha dosis es considerada una "cantidad terapéuticamente efectiva" por los expertos en la técnica. También se debe entender que las dosis de policosanol se miden, en instancias particulares, como dosis orales, o con referencia a niveles de fármaco según se miden en sangre.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente cuando se refieren a un animal, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

A. Las composiciones

5 En diversas formas de realización, la invención proporciona una nanopartícula de policosanol. Una nanopartícula representativa de la invención incluye una fracción de policosanol que comprende de aproximadamente 70% a 90% de octacosanol; y una fracción estabilizadora. En un ejemplo de forma de realización, la fracción estabilizadora incluye un éster de poli(etilenglicol). En diversas formas de realización, la fracción estabilizadora incluye un éster de tocoferilo. Los ejemplos de componentes de la fracción estabilizadora incluyen ésteres de tocoferil poli(etilenglicol), por ejemplo, succinato de tocoferil polietilenglicol (1000) ("TPGS"). Los ejemplos de nanopartículas de la invención tienen un diámetro de menos de aproximadamente 100 nm. También se proporcionan formulaciones que incorporan una pluralidad de las nanopartículas de la invención, incluyendo formulaciones farmacéuticas.

10 En diversas formas de realización, las nanopartículas incluyen una fracción de policosanol que incluye al menos aproximadamente 70% de octacosanol, al menos aproximadamente 71% de octacosanol, al menos aproximadamente 72% de octacosanol, al menos aproximadamente 73% de octacosanol, al menos aproximadamente 74% de octacosanol, al menos aproximadamente 75% de octacosanol, al menos aproximadamente 76% de octacosanol, al menos aproximadamente 77% de octacosanol, al menos aproximadamente 78% de octacosanol, al menos aproximadamente 79% de octacosanol, al menos aproximadamente 80% de octacosanol, al menos aproximadamente 81% de octacosanol, al menos aproximadamente 82% de octacosanol, al menos aproximadamente 83% de octacosanol, al menos aproximadamente 84% de octacosanol, al menos aproximadamente 85% de octacosanol o al menos aproximadamente 86% de octacosanol, al menos aproximadamente 87% de octacosanol, al menos aproximadamente 88% de octacosanol, al menos aproximadamente 89% de octacosanol, o al menos aproximadamente 90% de octacosanol.

15 En diversas formas de realización, las nanopartículas incluyen una fracción de policosanol que incluye no más de aproximadamente 90% de octacosanol, no más de aproximadamente 89% de octacosanol, no más de aproximadamente 88% de octacosanol, no más de aproximadamente 87% de octacosanol, no más de aproximadamente 86% de octacosanol, no más de aproximadamente 85% de octacosanol, no más de aproximadamente 84% de octacosanol, no más de aproximadamente 83% de octacosanol, no más de aproximadamente 82% de octacosanol, no más de aproximadamente 81% de octacosanol, no más de aproximadamente 80% de octacosanol, no más de aproximadamente 79% de octacosanol, no más de 78% de octacosanol, no más de 77% de octacosanol, no más de 76% de octacosanol, no más de 75% de octacosanol, no más de 74% de octacosanol, no más de 73% de octacosanol, no más de 72% de octacosanol, o no más de 71% de octacosanol.

20 En un ejemplo de forma de realización, las nanopartículas incluyen una fracción de policosanol que tiene octacosanol en el rango desde aproximadamente 70% hasta aproximadamente 90%, desde aproximadamente 71% hasta aproximadamente 89%, desde aproximadamente 72% hasta aproximadamente 88%, desde aproximadamente 73% hasta aproximadamente 87%, desde aproximadamente 74% hasta aproximadamente 86%, desde aproximadamente 75% hasta aproximadamente 85%, desde aproximadamente 76% hasta aproximadamente 84%, desde aproximadamente 77% hasta aproximadamente 83%, desde aproximadamente 78% hasta aproximadamente 82%, desde aproximadamente 79% hasta aproximadamente 81%, o aproximadamente 80%.

25 En diversas formas de realización, la fracción de policosanol incluye tanto octacosanol como triacontanol. En un ejemplo de forma de realización, el policosanol usado tiene una relación de octacosanol-triacontanol desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 17:1, desde aproximadamente 9:1 hasta aproximadamente 16:1, desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 15:1, desde aproximadamente 11:1 hasta aproximadamente 14:1, desde aproximadamente 12:1 hasta aproximadamente 13:1, desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 15:1, desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 13:1, desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 11:1, o desde aproximadamente 8:1 hasta aproximadamente 9:1.

30 En diversas formas de realización, la fracción de policosanol incluye tanto octacosanol como hexacosanol. En un ejemplo de forma de realización, el policosanol usado tiene una relación de octacosanol:hexacontanol que varía desde aproximadamente 16:1 hasta aproximadamente 50:1; desde aproximadamente 18:1 hasta aproximadamente 45:1; desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 40:1; desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 35:1; desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 30:1; desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 25:1; desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 22:1; o desde aproximadamente 19:1 hasta aproximadamente 20:1.

35 En diversas formas de realización, la fracción de policosanol incluye tanto triacontanol como hexacosanol. En un ejemplo de forma de realización, el policosanol usado tiene una relación de triacontanol: hexacontanol de un máximo de aproximadamente 1,5:1, un máximo de aproximadamente 1,3:1; un máximo de aproximadamente 1:1; un máximo de aproximadamente 0,8:1; un máximo de aproximadamente 0,6:1; un máximo de aproximadamente 0,4:1; o un máximo de aproximadamente 0,2:1.

En un ejemplo de forma de realización, las nanopartículas incluyen una fracción de policosanol que incluye desde 70% hasta aproximadamente 95% de octacosanol en mezcla con triacontanol en una relación de aproximadamente 9:1 hasta aproximadamente 16:1 y una fracción estabilizadora que esencialmente está totalmente formada por TPGS (por ejemplo, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% TPGS).

5 En diversas formas de realización, la fracción de policosanol y TPGS están en una relación de aproximadamente 1:2,8.

La presente invención usa policosanol o un componente de policosanol adquirido o aislado a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 5.663.156; 5.856.316; 6.197.832; 6.225.354; y 6.596.776 describen composiciones de policosanol que son específicas para el material de inicio y los procesos de extracción usados. En diversas formas de realización, el policosanol útil para fabricar una nanopartícula de la invención incluye al menos aproximadamente 80% de octacosanol, al menos aproximadamente 81% de octacosanol, al menos aproximadamente 82% de octacosanol, al menos aproximadamente 83% de octacosanol, al menos aproximadamente 84% de octacosanol, al menos aproximadamente 85% de octacosanol, al menos aproximadamente 86% de octacosanol, al menos aproximadamente 87% de octacosanol, al menos aproximadamente 88% de octacosanol, al menos aproximadamente 89% de octacosanol o al menos aproximadamente 90% de octacosanol. En diversas formas de realización, el policosanol usado incluye entre aproximadamente 80% y aproximadamente 85% de octacosanol. En un ejemplo de forma de realización, la cantidad de octacosanol es desde aproximadamente 82% hasta aproximadamente 83%.

10 Diversos ejemplos de agentes tensioactivos útiles como fracción estabilizadora en la nanopartícula de la invención y sus formulaciones incluyen vitamina E TPGS (succinato de tocoferol propilenglicol, una forma hidrosoluble de vitamina E), monolaureato de sorbitano (Span 20), monopalmitato de sorbitano (Span 40), poloxámero, monoestearato de sorbitano (Span 60), monooleato de sorbitano (Span 80), polioxietileno (20) monolaureato de sorbitano (Tween 20, polisorbato 20), polioxietileno (20) monopalmitato (Tween 40, polisorbato 40), polioxietileno (20) monoestearato (Tween 60, polisorbato 60), polioxietileno (20) triestearato (Tween 65, polisorbato 65), polioxietileno (20) monooleato (Tween 80, polisorbato 80), monomiristato de sacarosa, palmitato/estearato de sacarosa, estearato de sacarosa, sal sódica de dioctilsulfosuccinato, monooleato de monoglicérido, monolaureato de monoglicérido, monopalmitato de monoglicérido, lecitina, mezclas de diglicéridos, ésteres de ácido cítrico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres diaciltartáricos de monoglicéridos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ciclodextrinas, ésteres de propilenglicol de ácidos grasos, lactilatos de estearoilo, ácidos grasos C₈₋₁₈ libres, PTS (Patente U.S. No. 6.045.826) o sus combinaciones. En diversas formas de realización, la fracción estabilizadora no incluye una ciclodextrina. En otras formas de realización, la fracción estabilizadora no incluye un éster de ácido graso de polioxietileno sorbitano.

15 Las nanopartículas de la invención pueden incluir cualquier relación útil de fracción de policosanol respecto de la fracción estabilizadora que proporciona una nanopartícula que tiene un diámetro menor o igual a aproximadamente 100 nm. En un ejemplo de forma de realización, la relación de fracción de policosanol:fracción estabilizadora es desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:4, por ejemplo, desde aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 1:3,5. De modo similar, en diversas formas de realización, la relación de octacosanol:estabilizador varía desde aproximadamente 1:1,6 hasta aproximadamente 1:2,8, por ejemplo, desde aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 1:2,5. En un ejemplo de forma de realización, la relación es aproximadamente 1:2,25. La relación de triacontanol:estabilizador en ejemplos de nanopartículas de la invención varía desde aproximadamente 1:10 hasta aproximadamente 1:40, por ejemplo, desde aproximadamente 1:11: hasta aproximadamente 1:35. En un ejemplo de forma de realización, el estabilizador es un éster de vitamina E, tal como TPGS (succinato de d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000).

20 La mezcla a partir de la cual se producen las nanopartículas también puede incluir un agente tensioactivo, además de la fracción estabilizadora. Los ejemplos de agentes tensioactivos se establecieron con anterioridad y en general son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, TWEEN 20, TWEEN 80, ésteres (por ejemplo, ésteres de palmitato de sacarosa y monoésteres de ácido esteárico), pectina, agar y similares.

25 La formulación resultante de policosanol nanoparticulado se puede utilizar en formulaciones de formas de dosificación sólidas o líquidas, tales como dispersiones líquidas, geles, aerosoles, pomadas, cremas, formulaciones de liberación controlada, formulaciones de fusión rápida, formulaciones liofilizadas, comprimidos, cápsulas, formulaciones de liberación retardada, formulaciones de liberación prolongada, formulaciones de liberación pulsátil, formulaciones de liberación mixta inmediata y formulaciones de liberación controlada, etc.

30 Las nanopartículas y formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden comprender uno o más agentes aglutinantes, agentes de relleno, agentes lubricantes, agentes de suspensión, edulcorantes, agentes saporíferos, conservantes, tampones, agentes humectantes, disgregantes, agentes efervescentes, y otros excipientes. Dichos excipientes son conocidos en la técnica.

35 Los ejemplos de excipientes que se pueden usar en una nanopartícula o una formulación de nanopartículas incluyen, sin limitaciones, lecitina de soja, derivados de lecitina de soja, macrogol-8 glicéridos de caprilcaproilo, triglicéridos de cadena mediana, aceite de oliva refinado, saporíferos líquidos, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitano, ésteres de azúcar, éteres alquílicos de polioxietileno, propilenglicol, dexpantenol, aceite de almendras,

- aceite de arroz, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de sésamo, glicerina, palmitoestearato de glicerilo, aceite de almendras dulces, ácido oleico, oleato de poliglicerilo, sacarosa, poloxámero, hidroxistearato de macrogol-15, éster de ácido graso de sorbitano, palmitato de ascorbilo, poletilenglicol, ceralutión F, ceralutión H, ceralutión C, glicéridos de lauroil macrogol-32, glicéridos, mono-, di- y triglicéridos C₁₂-C₁₈, estearato de glicerilo, laureato de propilenglicol, caprilato de propilenglicol, dipergonato de propilenglicol. En algunas formas de realización, la formulación incluye uno o más excipientes seleccionados de ácido cítrico anhidro, sorbato de potasio, benzoato de sodio y laureato de sacarosa.
- Los ejemplos de agentes de relleno son lactosa monohidrato, lactosa anhidra y diversos almidones; los ejemplos de agentes aglutinantes son diversas celulosas y polivinilpirrolidona entrecruzada, celulosa microcristalina, tales como Avicel™, PH101 y Avicel™ PH102, celulosa microcristalina, y celulosa microcristalina silicificada (ProSolv SMCC™).
- Los lubricantes adecuados, incluso los agentes que actúan sobre la fluidez del polvo que se comprime, son dióxido de silicio coloidal, tal como Aerosil™200, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, y gel de sílice.
- Los ejemplos de edulcorantes son cualquier edulcorante natural o artificial, tales como sacarosa, xilitol, sacarina de sodio, ciclamato, aspartamo y acesulfamo. Los ejemplos de agentes saporíferos son Magnasweet™ (marca comercial de MAFCO), saporífero de goma de mascar y saporíferos frutales, y similares.
- Los ejemplos de conservantes son sorbato de potasio, metilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico y sus sales, otros ésteres de ácido para hidroxibenzoico tales como butilparabeno, alcoholes tales como alcohol etílico o bencílico, compuestos fenólicos tales como fenol, o compuestos cuaternarios tales como cloruro de benzalconio. Los ejemplos de conservantes incluyen, sin limitaciones, nitrito de potasio, nitrito de sodio, ácido benzoico, benzoato de sodio, benzoato de potasio y benzoato de calcio
- Los diluyentes adecuados incluyen rellenos inertes farmacéuticamente aceptables, tales como celulosa microcristalina, lactosa, fosfato de calcio dibásico, sacáridos, y/o mezclas de cualquiera de los anteriores. Los ejemplos de diluyentes incluyen celulosa microcristalina, tal como Avicel™ PH101 y Avicel™ PH102; lactosa tal como lactosa monohidrato, lactosa anhidra, y Pharmatose™ DCL21; fosfato de calcio dibásico tal como Emcompress™; manitol; almidón; sorbitol; sacarosa; y glucosa.
- Los disgregantes adecuados incluyen polivinilpirrolidona ligeramente entrecruzada, almidón de maíz, almidón de patata y almidones modificados, croscarmelosa de sodio, crospovidona, glicolato sódico de almidón, y sus mezclas.
- Los ejemplos de agentes efervescentes son pares efervescentes tales como un ácido orgánico y un carbonato o bicarbonato. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácidos y anhídridos cítrico, tartárico, málico, fumárico, adípico, succínico y alginico y las sales de ácidos. Los carbonatos y bicarbonatos incluyen, por ejemplo, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de magnesio, carbonato de sodio y glicina, carbonato de L-lisina, y carbonato de arginina. Alternativamente, puede estar presente solo el componente de bicarbonato de sodio del par efervescente.
- En diversas formas de realización, las composiciones de la invención contienen nanopartículas de policosanol nanoparticulado, las cuales tienen un tamaño promedio de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido por métodos de dispersión de la luz, microscopía u otros métodos apropiados.
- En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos 99% de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.
- En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos 95% de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.
- En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 90% de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.
- En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 85% (por ejemplo, desde aproximadamente 85% hasta aproximadamente 99%, 95%, o 90%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm,

o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

5 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 80% (por ejemplo, desde aproximadamente 80% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, o 85%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

10 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 75% (por ejemplo, desde aproximadamente 75% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, o 80%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

15 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 70% (por ejemplo, desde aproximadamente 70% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, 80% o 70%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

20 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 65% (por ejemplo, desde aproximadamente 65% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 70%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

25 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos aproximadamente 60% (por ejemplo, desde aproximadamente 60% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, o 65%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

30 En una forma de realización de la invención, se proporciona una formulación en la cual al menos 55% (por ejemplo, desde aproximadamente 55% hasta aproximadamente 99%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, o 60%) de las nanopartículas de policosanol tienen un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 90 nm, menos de aproximadamente 80 nm, menos de aproximadamente 70 nm, menos de aproximadamente 60 nm, o menos de aproximadamente 50 nm, medido mediante los métodos antes mencionados.

35 Los métodos para determinar el tamaño de la nanopartícula son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de difracción óptica (es decir dispersión óptica). Estas técnicas incluyen dispersión de banda ancha (Pat. U.S. Nos. 5.607.800; 5.867.276 y 5.963.329), elipsometría espectral (Pat U.S. No. 5.739.909) así como también reflectancia de perfil de haz de longitud de onda única y elipsometría de perfil de haz (Pat U.S. No. 6.429.943). Además, puede ser posible emplear láser BPR o BPE de longitud de onda única con el fin de obtener mediciones de CD en líneas aisladas o vías y mesas aisladas (ver solicitud de patente U.S. No. de Ser. 10/243.245, presentada el 13 de septiembre de 2002).

40 En un ejemplo de forma de realización, la invención proporciona una formulación de dosis unitaria de nanopartículas de policosanol de la invención que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de policosanol. En un ejemplo de forma de realización, la formulación de dosis unitaria es una formulación de nanopartículas que contiene una fracción de policosanol y una fracción estabilizadora y la formulación de dosis unitaria incluye desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg. En diversas formas de realización, la dosis unitaria es una dosis diaria. Un experto en la técnica apreciará que las cantidades terapéuticamente efectivas de policosanol se pueden determinar empíricamente y se pueden emplear en forma pura o, cuando dicha forma existe, en una sal farmacéuticamente aceptable, éster, o forma de profármaco. Los niveles reales de dosis de policosanol en las composiciones de nanopartículas de la invención se pueden variar con el fin de obtener una cantidad de policosanol que sea efectiva para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y método de administración particulares. En consecuencia, el nivel de dosis seleccionado depende del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la potencia del policosanol administrado, la duración deseada de tratamiento, y otros factores.

55 Las composiciones de dosis unitaria pueden contener dichas cantidades de dichos submúltiplos correspondientes que se pueden usar para conformar la dosis diaria. Sin embargo, se debe entender que el nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores: el tipo y grado de respuesta celular o fisiológica que se busca lograr; la actividad del agente o composición específicos empleados; los agentes específicos o composición empleados; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración, y la tasa de excreción del agente; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentemente con el agente específico; y factores similares bien conocidos en las

técnicas médicas.

En un ejemplo de método para preparar una nanopartícula de la invención, se fusionan juntos una cantidad preseleccionada de un estabilizador y policosanol con agitación para asegurar la homogeneidad. Se agrega agua o una solución acuosa de un aditivo, conservante, excipiente, etc., al fundido a una temperatura elevada, y se mantiene a una temperatura deseada, por lo general desde aproximadamente 60 °C hasta aproximadamente 90 °C mientras se agita. En un método de ejemplo, la mezcla de agua a los sólidos incluye más agua que sólidos, por ejemplo, es aproximadamente 10:1 en peso. La mezcla se agita mientras se enfría hasta temperatura ambiente. En diversas formas de realización, el método produce una suspensión de las partículas.

A. Los métodos

Además de las nanopartículas de policosanol y las formulaciones que incluyen estas nanopartículas, la presente invención proporciona estas nanopartículas y formulaciones para uso en el tratamiento y prevención de enfermedades y para regular el metabolismo. En diversas formas de realización, las nanopartículas de la invención son útiles para regular la hipertensión, el metabolismo del colesterol y tratar la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia, la inflamación, etc. En diversas formas de realización, las formulaciones se usan para regular o reducir la oxidación de proteínas. En un ejemplo de forma de realización, la formulación es útil para gestionar los niveles de glucemia, la resistencia a insulina, la diabetes, y otras afecciones relacionadas con los niveles de azúcar en sangre. En aun otras formas de realización, las formulaciones son útiles para regular, por ejemplo, incrementar, los niveles plasmáticos de vitamina C y para reducir la presión arterial sistólica y diastólica. En otras formas de realización, las formulaciones son útiles para inhibir la activación de NF-κB.

En un ejemplo de forma de realización, las formulaciones son útiles para tratar una enfermedad o trastorno particular y en donde el sujeto no se encuentra de otro modo en la necesidad de tratamiento con un policosanol. En diversas formas de realización, las nanopartículas son útiles para tratar una única enfermedad o regular un único factor metabólico. En consecuencia, en un ejemplo de forma de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el tratamiento de la resistencia a insulina en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipertensión, etc. En un ejemplo de forma de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación del azúcar en la sangre en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hiperlipidemia, hipercolesterolemia, etc. En diversas formas de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el tratamiento de la diabetes (por ejemplo, diabetes tipo II) en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hiperlipidemia, hipercolesterolemia, etc. En diversas formas de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la reducción o prevención de la oxidación de proteínas en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hipertensión, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, etc. En un ejemplo de forma de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento de los niveles séricos de vitamina C en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hiperlipidemia, hipercolesterolemia, etc. En otras formas de realización, la invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la inhibición de la activación de NF-κB en un sujeto que no se encuentra en la necesidad de tratamiento para hiperlipidemia, hipercolesterolemia, etc.

Los ejemplos no limitantes de indicaciones terapéuticas se establecen a continuación:

Oxidación de proteínas

La invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la disminución de la oxidación de proteínas en un sujeto y, en consecuencia, en la reducción de las consecuencias deletéreas de esta oxidación.

Se ha implicado el estrés oxidativo en la patogénesis de enfermedades crónicas y agudas y la lesión en diversas afecciones fisiopatológicas tales como exposiciones a hepatotoxina, colestasis intrahepática, lesión por hígado alcohólico, lesión hepática por isquemia/reperfusión y hepatitis viral (Stehbens, *Exp. Mol. Pathol.*; 2003; 75(3): 265; Jaeschke et al., *Toxicol. Lett.*; 2003; 144(3): 279- 88; McDonough, *Toxicology*.2003; 189(1- 2): 89; Jaeschke et al., *J. Clin. Invest.*; 1988; 81(4): 1240). La sobreproducción de especies de oxígeno reactivas (ROS) y especies de nitrógeno reactivas (RNS), junto con disminución significativa de la defensa antioxidante en estas afecciones patológicas, deterioran diversas funciones celulares a través de los procesos de peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y oxidación de bases nucleicas. La peroxidación de lípidos, por ejemplo, causa cambios en las propiedades físicas y químicas de las membranas celulares, en consecuencia, alteran su fluidez y permeabilidad, lo cual conduce a la alteración de la transducción de las señales de membrana e intercambio iónico, lo cual da por resultado hinchazón, citólisis y finalmente la muerte celular. La oxidación de las proteínas y ADN también se relaciona directamente con la disfunción y la muerte celulares (Fang Y Z et al. *Nutrition*. 2002; 18(10): 872-9).

Las enfermedades relacionadas con la oxidación de proteínas incluyen, sin limitaciones, artritis reumatoide (IgG, inhibidor de α-1-proteinasa), lesión por isquemia por reperfusión, enfisema (inhibidor de α-1-proteinasa, elastasa), enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, de Alzheimer, Parkinson), distrofia muscular, trastornos asociados

con envejecimiento (glutamina sintetasa, anhidrasa carbónica III, aconitasa), pancreatitis aguda, cataractogénesis (α -cristalinas), cáncer, ingestión crónica de etanol, síndrome de distrés respiratorio del adulto. Las formulaciones de la invención también se pueden usar para tratar o mejorar los efectos de Kwashikor (Manory, J. *Pediatr*, 2000; 137: 421).

- 5 Un ejemplo de dosis terapéuticamente relevante es una que conduce a una reducción en un marcador clínico estándar de oxidación de proteínas, por ejemplo, la carboxilación de proteínas. El contenido proteico de carbonilo (PCC) es el marcador de modificación oxidativa de proteínas más ampliamente usado. Hay diversas metodologías para la cuantificación de PCC; en diversos métodos convencionales, se permite reaccionar 2,4-dinitrofenilhidrazina con los carbonilos proteicos para formar la correspondiente hidrazona, la cual puede ser analizada ópticamente por
10 recuento radiactivo o por inmunohistoquímica. Véase, por ejemplo, Yan et al., *Arch.Biochem. Biophys.*327:330-334, 1996.

Las nanopartículas de la invención pueden administrarse por vía oral. Las nanopartículas pueden administrarse a una dosis de desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg por día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg por día.

- 15 Incremento de vitamina C sérica

La invención también proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento de la vitamina C sérica en un sujeto.

- 20 Dado que la resistencia a insulina y la diabetes se acompañan de descenso de los niveles séricos de vitamina C en comparación con los niveles observados en sujetos sanos, se ha sugerido la administración oral de suplemento de vitamina C como un tratamiento para las consecuencias de la resistencia a insulina y la diabetes, incluyendo la disfunción endotelial. Sin embargo, se encontró que el suplemento de vitamina C no era efectivo cuando se usó solo (Kaneto et al., *Diabetes*; 1999; 48(12): 2398), muy posiblemente debido a que los suplementos de vitamina C administrados por vía oral no mejoran la disfunción endotelial o la resistencia a insulina (Chen et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 2006; 290(1): H137).

- 25 La presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación de la vitamina C endógena y, en consecuencia, nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el tratamiento de la resistencia a insulina, la diabetes y las consecuencias de estos síndromes.

- 30 Un ejemplo de dosis terapéuticamente relevante es uno que conduce a un incremento en un marcador clínico estándar de la concentración sérica de vitamina C, por ejemplo, un método de ELISA en sandwich que utiliza los kits disponibles comercialmente de Fisher Thermo Scientific Co, Rockford, Ill. Véase, por ejemplo, Washko et al., *Anal. Biochem.* 1992; 204:1- 14.

Las nanopartículas de la invención pueden administrarse por vía oral. Las nanopartículas pueden administrarse a una dosis de desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg por día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg por día.

- 35 Resistencia a insulina

La presente invención también proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el tratamiento de la resistencia a insulina y las consecuencias que se originan de la resistencia a insulina incluyendo sin limitaciones, diabetes.

- 40 La resistencia a insulina se define como una respuesta inadecuada por parte de los tejidos blanco de la insulina, tales como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo, a los efectos fisiológicos de la insulina circulante. Los puntos de referencia de deterioro de la sensibilidad a la insulina en estos tres tejidos son la disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina en el músculo esquelético, el deterioro de la inhibición mediada por la insulina de la producción de glucosa hepática en el hígado, y una capacidad reducida de la insulina para inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. De hecho, la resistencia a insulina es uno de los principales predictores para el
45 desarrollo de diabetes tipo II.

- En la diabetes tipo II, se ha establecido ampliamente que la resistencia a insulina precede al desarrollo de hiperglucemia manifiesta. Las causas de resistencia a insulina pueden ser genéticas y/o adquiridas. La diabetes tipo II también predispone a los pacientes a elevación del colesterol y a enfermedades cardiovasculares. En las culturas occidentales, los principales factores adquiridos causales de resistencia a insulina son la obesidad, un estilo de vida
50 sedentario, y el envejecimiento, todos los cuales están interrelacionados. En presencia de una fuerte respuesta secretora compensatoria de insulina a la resistencia a insulina, los niveles de glucosa pueden mantenerse relativamente normales. Sin embargo, cuando las células β pancreáticas productoras de insulina ya no pueden compensar la disminución de la sensibilidad tisular a la insulina, la homeostasis de la glucosa se deteriora y se desarrolla una la tolerancia a la glucosa alterada y eventualmente diabetes tipo II.

- 55 Los individuos que padecen diabetes también tienen disminución de los niveles de vitamina C en el torrente

sanguíneo. Algunos estudios han descubierto que los diabéticos tienen al menos niveles 30% inferiores circulantes de ácido ascórbico respecto a los individuos normales. (Will et al., Nutr. Rev. 54(7): 193 (1996)). Sin embargo, la administración de altas dosis orales de vitamina C no mejora esta deficiencia (Chen et al., J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 290(1):H137-45 (2006)). Sin embargo, tal como se verá en los Ejemplos más adelante, la administración de la presente invención aborda esta deficiencia.

Las enfermedades o trastornos comunes asociados con resistencia a insulina incluyen acantosis nigricans, acné vulgar, alergias, asma, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, trastorno bipolar, cáncer de mama, enfermedad cardiovascular, cataratas, cáncer cervical, depresión, diabetes mellitus, dislipidemia, enfermedad de hígado graso, diabetes tipo 2 de la infancia, fatiga crónica, cáncer de colon y rectal, caspa, enfermedad de Graves, enfermedad cardiaca, colesterol LDL elevado, triglicéridos elevados, hirsutismo, hipoglucemia, hipotiroidismo, inflamación, enfermedad renal, colesterol HDL bajo, lupus, neuropatía, neuritis, osteoporosis, cáncer pancreático, enfermedad de Parkinson, síndrome de poliquistosis ovárica, cáncer de próstata, artritis reumatoide, esclerodermia, seborrea, accidentes cerebrovasculares, y venas varicosas.

Además de las enfermedades y los trastornos establecidos con anterioridad, algunas de las principales consecuencias de la resistencia a insulina incluyen, sin limitaciones, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, arteriosclerosis, síndrome de poliquistosis ovárica, enfermedad de hígado graso no alcohólico, alteraciones de la función del endotelio vascular, elevación de triglicéridos y colesterol, alteraciones de la coagulación, alteraciones de la función renal, alteraciones del ritmo cardiaco, y niveles elevados de ácido úrico.

Un ejemplo de dosis terapéuticamente relevante es una que conduce a una **disminución** de un marcador clínico estándar de resistencia a insulina sérica, por ejemplo, la insulina y los niveles de insulina en el plasma se pueden determinar por el método de ELISA en sandwich usando kits disponibles comercialmente de Fisher Thermo Scientific Co., Rockford, Ill).

Las nanopartículas de la invención pueden administrarse por vía oral. Las nanopartículas pueden administrarse a una dosis de desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg por día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg por día.

Enfermedades relacionadas con el colesterol

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia y/o la regulación del metabolismo lipídico en un sujeto.

La hipercolesterolemia, la hiperlipidemia y las enfermedades cardiovasculares son crecientemente prevalentes en las sociedades industriales occidentales. Las causas de ello no se conocen en su totalidad, pero pueden estar relacionadas en parte con una predisposición genética a estas afecciones y en parte con una dieta alta en grasas saturadas, junto con un estilo de vida crecientemente sedentario, dado que el trabajo manual se hace cada vez menos necesario. La hipercolesterolemia y la hiperlipidemia son muy significativas, dado que predisponen a los individuos a enfermedades cardiovasculares, incluyendo aterosclerosis, infarto de miocardio (ataque cardiaco), y accidente cerebrovascular.

Las formas específicas de hiperlipidemia incluyen, por ejemplo, hipercolesterolemia, disbetalipoproteinemia familiar, dislipidemia diabética, dislipidemia nefrótica e hiperlipidemia familiar combinada. La hipercolesterolemia se caracteriza por una elevación sérica de lipoproteína de baja densidad-colesterol y colesterol sérico total. La lipoproteína de baja densidad (LDL colesterol) transporta el colesterol en la sangre. La disbetalipoproteinemia familiar, también denominada hiperlipidemia tipo III, se caracteriza por una acumulación de partículas de lipoproteína de muy baja densidad-colesterol (VLDL-colesterol) denominadas beta VLDL en el suero. También se asocia con esta afección un reemplazo de la apolipoproteína E3 normal por una isoforma anormal de apolipoproteína E2. La dislipidemia diabética se caracteriza por múltiples anomalías de lipoproteínas, tales como sobreproducción de VLDL-colesterol, lipólisis anormal de VLDL triglicérido, reducción de la actividad de receptor de LDL-colesterol y, en ocasiones, hiperlipidemia tipo III. La dislipidemia nefrótica asociada con disfunción renal, es difícil de tratar y con frecuencia incluye hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. La hiperlipidemia familiar combinada se caracteriza por múltiples fenotipos de hiperlipidemia, es decir, tipo IIa, IIb, IV, V o hiperapobetalipoproteinemia.

Es bien conocido que la probabilidad de enfermedad cardiovascular se puede disminuir si se pueden reducir los lípidos séricos, y en particular LDL-colesterol. También es bien conocido que se puede retrasar la progresión de la aterosclerosis o que se puede inducir la regresión de la aterosclerosis si se reducen los lípidos séricos. En tales casos, los individuos con diagnóstico de hiperlipidemia o hipercolesterolemia deberían considerar una terapia de reducción de lípidos para retrasar la progresión o inducir la regresión de la aterosclerosis con la finalidad de reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, y en particular de enfermedad de las arterias coronarias. Dicha terapia reducirá el riesgo de accidente cerebrovascular e infarto de miocardio, entre otras consecuencias. Además, ciertos individuos con lo que se consideran niveles normales séricos de lípidos pueden desarrollar enfermedad cardiovascular. En estos individuos, otros factores tales como peroxidación lipídica y niveles elevados de Lp(a) o lipoproteína A pueden conducir a aterogénesis a pesar de los niveles relativamente normales de colesterol y lípidos.

Los ejemplos de marcadores de una "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en la presente memoria se refieren a la cantidad de policosanol en una formulación de la invención la cual, después de la administración (por ejemplo, administración oral) al sujeto, mantiene los perfiles lipídicos séricos sanos, en forma ilustrativa al reducir los niveles de colesterol total, reducir el LDL colesterol, elevar el HDL colesterol, reducir la relación de colesterol total / HDL, y/o reducir los triglicéridos, o contribuye a mantener el peso corporal sano.

Otro ejemplo de dosis terapéuticamente relevante es una que conduce a una disminución de proteína C reactiva, un marcador clínico estándar del metabolismo lipídico y factor de riesgo cardiovascular.

Inhibición de la activación de NF-κB

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la inhibición de NF-κB en un sujeto.

La familia de NF-κB/Rel de factores de transcripción está comprendida por varias proteínas relacionadas estructuralmente que forman homodímeros y heterodímeros e incluyen p50/p105, p52/p100, RelA (p65), c-Rel/NF-κB. El dímero más común Rel/ NF-κB en mamíferos contiene los heterodímeros p50-RelA (p50/ p65) y se denomina específicamente NF-κB. Es un factor ubicuo que reside en el citoplasma, pero cuando se activa se transloca al núcleo, en donde induce la transcripción génica. NF-κB ha sido ligado con una amplia variedad de enfermedades, dado que la mayoría de las enfermedades son causadas por la inflamación no regulada. En consecuencia, los agentes capaces de inhibir la activación de NF-κB tienen el potencial de prevenir o retrasar el inicio o tratar enfermedades ligadas a NF-κB.

NF-κB se activa por los radicales libres, estímulos inflamatorios, carcinógenos, promotores de tumor, endotoxinas, radiación gamma, luz ultravioleta (UV), y rayos x (B.B.Aggarwal et al., Nuclear transcription factor-kappa B as a target for cancer drug development *Leukemia*. 16: 1053-68). Ante la activación, NF-κB induce la expresión de más de 200 genes que se ha mostrado que suprimen la apoptosis, inducen la transformación celular, la proliferación, la invasión, la metástasis, la quimiorresistencia, la radiorresistencia, y la inflamación. Véase, Kumar A, et al., 2004. Nuclear factor-kappa B: Its role in health and diseases, *J Mol Med.*, 82:434-448.

La forma activada de NF-κB ha sido implicada en enfermedades y trastornos, incluyendo sin limitación: cáncer, alergias, cefaleas, dolor, infartos de miocardio, síndrome de dolor regional complejo, hipertrofia cardíaca, distrofia muscular (tipo 2a), desgaste muscular, trastornos catabólicos, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, obesidad, retraso del crecimiento fetal, hipercolesterolemia, aterosclerosis, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, isquemia/reperfusión, accidente cerebrovascular, aneurisma cerebral, angina de pecho, enfermedad pulmonar, fibrosis quística, lesión pulmonar inducida por ácidos, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de membrana hialina, enfermedad renal, enfermedad glomerular, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad por leptospirosis renal, enfermedades intestinales, endometriosis peritoneal, enfermedades cutáneas, sinusitis nasal, mesotelioma, displasia ectodérmica anhidrótica, enfermedad de Behcet, incontinencia pigmentaria, tuberculosis, asma, artritis, enfermedad de Crohn, colitis (rata), alergia ocular, glaucoma, apendicitis, enfermedad de Paget, pancreatitis, periodontitis, endometriosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad inflamatoria pulmonar, sepsis, inducida por sílice, apnea del sueño, SIDA (VIH-1), autoinmunidad, síndrome antifosfolípido, lupus, nefritis lúpica, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome de enfermedad crónica, fiebre del Mediterráneo familiar, síndrome de fiebre periódica hereditario, enfermedades por estrés psicosocial, enfermedades neuropatológicas, polineuropatía amiloidótica familiar, neuropatía inflamatoria, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, psoriasis, choque séptico, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad reumática, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de la retina, cataratas, y diversas enfermedades inflamatorias. Las formulaciones y los métodos de la invención demuestran la capacidad para inhibir la activación de NF-κB, lo cual a su vez puede tratar o prevenir enfermedades asociadas con la activación de NF-κB en el cuerpo.

Adiponectina

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento de los niveles de adiponectina en un sujeto.

La adiponectina es una hormona proteica que modula una cantidad de procesos metabólicos, incluyendo la regulación del catabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. Véase, Diez JJ, Iglesias P. "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease". *Eur. J. Endocrinol.* 148 (3): 293-300, 2003.

La adiponectina es secretada exclusivamente del tejido adiposo al torrente sanguíneo y es muy abundante en plasma respecto de muchas otras hormonas. Los niveles de la hormona se correlacionan inversamente con el porcentaje de grasa corporal en adultos. Véase, Ukkola O, Santaniemi, "Adiponectin: a link between excess adiposity and associated co-morbidities" *J. Mol. Med.* 80 (11): 696-702, 2002.

La hormona juega un papel importante en la supresión del desequilibrio metabólico que puede dar como resultado diabetes tipo 2, obesidad, aterosclerosis, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y un factor de riesgo independiente para síndrome metabólico. Véase, Renaldi O. et al., 2009 "Hypo adiponectinemia: a risk factor for

metabolic syndrome" *Acta Med Indones* 41 (1): 20-4.

Inhibidor de activación de plasminógeno

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación, por ejemplo, disminución, del nivel de la proteína PAI-1 en un sujeto. PAI-1 es un inhibidor de serina proteasa que inhibe la fibrinólisis al inactivar el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y de tipo tisular. La actividad plasmática de PAI-1 es máxima entre las 12 de la noche y las 6 de la mañana. (Kluft C, et al., *Thromb Haemost.* 1988 abr 8; 59(2):329-32).

PAI-1 está presente en mayores niveles en diversos estados de enfermedad (tales como numerosas formas de cáncer), así como también en la obesidad y el síndrome metabólico. Se ha relacionado con el aumento de aparición de trombosis en pacientes con estas afecciones. (Mimuro J (1991)"[Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions]". *Rinsho Ketsueki* 32 (5): 487- 9. PMID 1870265.); Binder BR, et al. (2002). "Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles". *News Physiol. Sci.* 17: 56-61. PMID 11909993; Hoekstra T, et al., (2004). "Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk". *Thromb. Haemost.* 91 (5): 861- 72; Lijnen HR (2005). "Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1". *J. Thromb. Haemost.* 3 (1): 35-45; De Taeye B, et al., (2005). "Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease". *Current opinion in pharmacology* 5 (2): 149-54; Dellas C, Loskutoff DJ (2005). "Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease". *Thromb. Haemost.* 93 (4): 631-40.

TNF alfa

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación, por ejemplo, disminución, de los niveles de TNF alfa en un sujeto. El factor de necrosis tumoral (TNF alfa) promueve la respuesta inflamatoria, lo cual a su vez causa muchos de los problemas clínicos asociados con trastornos autoinmunes tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, enfermedad de Alzheimer y asma refractaria. Estos trastornos en ocasiones se tratan mediante el uso de un inhibidor de TNF. La desregulación de la producción de TNF ha sido implicada en diversas enfermedades humanas que incluyen enfermedad de Alzheimer (Perispinal Etanercept for Treatment of Alzheimer's Disease Edward Tobinick* *Current Alzheimer Research*, 2007, 4, 550-552) así como también cáncer. Véase, Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001). "The TNF and TNF receptor super families: integrating mammalian biology". *Cell* 104 (4): 487-501.

Los roedores obesos y los humanos obesos tienen un aumento de la expresión de TNF α en el tejido adiposo. La expresión de TNF α en tejido adiposo en consecuencia se correlaciona positivamente con adiposidad y resistencia a insulina (*Endocr Rev.* 2003 Jun; 24(3): 278-301). La exposición crónica a TNF α exógeno in vivo e in vitro induce resistencia a insulina. Véase, *Endocrinology.* 1992 Ene;130(1):43-52 Gene deletion of TNF α or its receptors in obese rodents (fa/fa Zucker rats) improves insulin sensitivity and circulating NEFAs. *Nature.* 1997 Oct 9; 389(6651):610-4

En el tejido adiposo, TNF α suprime los genes que intervienen en la captación y el almacenamiento de NEFA y glucosa así como también la adipogénesis. También modifica la expresión de factores secretados por adipocitos tales como adiponectina (*Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Sep;285(3):E527-33. En el hígado, TNF α suprime la expresión de los genes que intervienen en la captación y el metabolismo de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos a la vez que incrementa la expresión de los genes que intervienen en la síntesis de novo de colesterol y ácidos grasos.

La señalización de la insulina está alterada indirectamente por TNF α a través del incremento de los niveles séricos de NEFA. Es sabido que las tiazolidindionas mejoran los efectos inhibitorios de TNF α sobre la acción de la insulina. Véase, *J Clin Invest.* 1997 Oct 1;100(7):1863-9. Además, se ha observado que la pérdida de peso da por resultado una reducción de los niveles de TNF α . *J Clin Invest.* 1995 May; 95(5):2111-9.

Proteína de unión a retinol

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación, por ejemplo, disminución de los niveles de RBP-4 en un sujeto. La proteína de unión a retinol 4 (RBP4) ha sido descrita recientemente como una adipocina que contribuye a la resistencia a insulina en el modelo de ratón AG4KO. Véase, Yang Q, et al., "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes", *Nature* 436 (7049): 356-62. (2005). RBP4 está elevada en suero antes del desarrollo de diabetes y parece identificar la resistencia a insulina y los factores de riesgo cardiovascular asociados en sujetos con diversas presentaciones clínicas. Estos hallazgos proporcionan un fundamento para las terapias antidiabéticas dirigidas a reducir los niveles séricos de RBP4. Véase, Graham TE, et al. *N Engl J Med.* 2006 Jun 15; 354(24):2552-63.

Óxido nítrico

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento de los niveles de óxido nítrico en un sujeto.

5 El NOS endotelial (eNOS), también denominado óxido nítrico sintasa 3 (NOS3), genera NO en los vasos sanguíneos e interviene en la regulación de la función vascular y en la reducción de la presión arterial. Véase, Alderton WK, et al., Biochem J. 2001 Ago 1;357(Pt 3):593-615. Es sabido que NO tiene diversos efectos vasculares, incluyendo vasodilatación directa (dependiente del flujo y mediada por receptor); vasodilatación indirecta por inhibición de influencias vasoconstrictoras (por ejemplo, inhibe la angiotensina II y la vasoconstricción simpática), efecto antitrombótico (inhibe la adhesión plaquetaria al endotelio vascular), efecto antiinflamatorio (inhibe la adhesión de leucocitos al endotelio vascular), la capacidad para secuestrar el anión superóxido; y un efecto antiproliferativo (por ejemplo, inhibe la hiperplasia de músculo liso).

10 Debido a las acciones antes mencionadas de NO, el deterioro de su producción o reducida biodisponibilidad pueden dar como resultado la vasoconstricción (por ejemplo, vasoespasmo coronario, aumento de la resistencia vascular sistémica, hipertensión); trombosis debido a agregación plaquetaria y adhesión al endotelio vascular; inflamación debida a regulación al alza de las moléculas de adhesión de leucocitos y endotelial; hipertrofia vascular y estenosis. Véase, Nitric Oxide: Biology and Pathobiology; Por: Louis J. Ignarro (Editor) ISBN-10: 0123738660; ISBN-13: 9780123738660 Editor: Academic Press - 2009. Las enfermedades o afecciones patológicas asociadas con producción y biodisponibilidad anormales de NO incluyen, sin limitación, hipertensión; obesidad; dislipidemias (particularmente hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia); diabetes (tipos I y II); insuficiencia cardiaca; aterosclerosis; y afecciones patológicas asociadas con el envejecimiento. Véase, Dessy, C, et al., (Septiembre 2004). "Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature" y Current Medical Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Bentham Science Publishers Ltd.) 3 (3): 207-216.

MCP-1(proteína quimiotáctica 1 de monocitos)

25 En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación, por ejemplo, disminución, de los niveles de MCP-1 en un sujeto. MCP-1 es una quimioquina que recluta monocitos a sitios de inflamación. MCP-1 es expresada y secretada por los adipocitos y las células vasculares del estroma en el tejido adiposo blanco. Los roedores obesos tienen mayores niveles circulantes de MCP-1 con aumento de la expresión en el tejido adiposo de MCP-1. Véase, J Biol Chem. 2003 Nov 21, 278(47):46654-60. Además, MCP-1 puede contribuir directamente a la resistencia a insulina al disminuir la captación de glucosa estimulada por la insulina y la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina inducida por la insulina y puede disminuir la expresión de los genes adipogénicos con el fin de inhibir el crecimiento y la diferenciación de los adipocitos.

30 La administración de MCP-1 a ratones incrementa periféricamente los monolitos circulantes, e incrementa la acumulación de monocitos en las arterias con formación neointima, lo cual sugiere un papel importante de MCP-1 en la aterogénesis. Véase, Cardiovasc Res. 2003 Jan;57(1):178-85.

Sulfuro de hidrógeno

40 En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento de los niveles de H₂S en un sujeto. H₂S promueve una cantidad de señales celulares que regulan el metabolismo, la función cardiaca y la supervivencia celular. La biodisponibilidad endógena de H₂S está regulada por varias enzimas que intervienen en la biosíntesis de cisteína. Véase, Szabo C (2007). Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. Nat Reviews 6: 917-935. Los niveles de H₂S en muestras de sangre obtenidas de personas sanas y pacientes masculinos con diabetes tipo II demostraron niveles marcadamente disminuidos de H₂S en los pacientes con diabetes. Los menores niveles de H₂S se asociaron con marcadores clínicos de deterioro de la función de la microvasculatura lo cual sugiere que la pérdida de este gas reductor de la presión arterial podría ser un factor contribuyente al desarrollo de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes. Véase, Brancaleone V, et al., (2008). Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice; Br J Pharmacol 155: 673-680; Lefer DJ (2007). A new gaseous signaling molecule emerges: cardio protective role of hydrogen sulfide; y Proc Natl Acad Sci USA 104: 17907-17908.

ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1)

50 En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en la regulación, por ejemplo, reducción, de los niveles elevados de ICAM-1 en un sujeto. ICAM-1 es la misma molécula receptora usada por la gran mayoría de virus que causan el resfriado común. Los rinovirus son la causa frecuente del resfriado común. Las moléculas de adhesión juegan un papel importante en muchos campos de la medicina que incluyen la embriología, la inmunología y las enfermedades malignas.

55 Muchos procesos fisiológicos requieren que las células entren en estrecho contacto y se adhieran a otras células o la matriz extracelular. Las interacciones entre las células o de las células con la matriz están mediadas a través de varias familias de moléculas de adhesión intercelular o "ICAM". Véase, New Cell adhesion research, Patrick Nott y otros colaboradores, ISBN-10: 1606923781; ISBN-13: 9781606923788 Editor: Nova Biomedical Books - 2009-04. En

consecuencia, ICAM-1 juega un papel esencial en los procesos normales y fisiopatológicos (Springer et al., 1987, Ann. Rev. Immunol. 5: 223-252). En consecuencia, se han desarrollado estrategias para mediar la adhesión celular mediante el bloqueo de la función o la expresión de ICAM-1. Dichas estrategias generalmente emplean anticuerpos anti-ICAM-1, ligandos que bloquean competitivamente la unión de ICAM-1, o moléculas de ácidos nucleicos antisentido dirigidas contra ARNm de ICAM-1. Sin embargo, los agentes usados en dichas terapias solo producen una reducción estequiométrica de ICAM-1, y generalmente son superados por la anormalmente elevada producción de ICAM-1 por las células enfermas o activadas.

Las enfermedades caracterizadas por la infiltración de neutrófilos a menudo están asociadas con afecciones crónicas en las cuales predomina la expresión de ICAM-1 o VCAM-1. Véase, Adams DH, Shaw S 1994 Leukocyte endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. Lancet 343:831-836. Un incremento de la expresión local, así como también de las moléculas de adhesión solubles en suero ha sido informado en diversas afecciones patológicas que incluyen arteriosclerosis, vasculitis, artritis, enfermedades renales y hepáticas, afecciones de isquemia por reperfusión, rechazo de órganos, metástasis, y muchas otras afecciones patológicas. Véase Bevilacqua MP, et al., 1994 Endothelial leukocyte adhesion molecules in human disease. Annu Rev Med 45:361-378.

Las moléculas de adhesión pueden ser importantes en formas específicas de inflamación. Véase Gorski A 1994 the role of cell adhesion molecules in immunopathology. Immunol Today 15:251-255. En consecuencia, se necesitan agentes en cantidades catalíticas o subestequiométricas que inhiban selectivamente la expresión de ICAM-1, con el fin de disminuir o bloquear efectivamente la adhesión celular mediada por ICAM-1.

Una de las muchas formas diferentes de inhibir la infección viral consiste en impedir que el virus se una a las células. La mayoría de los serotipos de rinovirus utiliza un único receptor celular, es decir la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) para unirse a las células. Esto podría conducir al desarrollo de bloqueadores de este receptor en un esfuerzo que pretende encontrar una cura para el resfriado común.

La expresión de ICAM-1 también se ha asociado con diversos trastornos inflamatorios de la piel tales como dermatitis alérgica por contacto, erupción fijada por fármacos, liquen plano y psoriasis. Véase Ho et al., 1990, J. Am. Acad. Dermatol. 22: 64-68; Griffiths y Nickoloff, 1989, Am. J. Pathology 135: 1045-1053; Lisby et al., 1989, Br. J. Dermatol. 120: 479-484; y Shiohara et al., 1989, Arch. Dermatol. 125: 1371-1376. Además, se ha detectado expresión de ICAM-1 en pacientes con artritis reumatoide (Hale et al., 1989, Arth. Rheum. 32: 22-30); en células B pancreáticas de pacientes diabéticos (Campbell et al., 1989, P.N.A.S. USA 86: 4282-4286); en células foliculares tiroideas de pacientes con enfermedad de Graves (Weetman et al., 1989, J. Endocrinol. 122: 185-191); en rechazo de aloinjerto renal y hepático (Faull y Russ, 1989, Transplantation 48: 226-230; Adams et al., 1989, Lancet 1122-1125); y en tejido de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (Springer T, 1990, Nature 346: 425-34).

Las complicaciones comúnmente observadas en diabetes tipo I también incluyen la expresión de ICAM-1. Por ejemplo, la adhesión mediada por ICAM-1 de los leucocitos al endotelio capilar puede causar isquemia de la microvasculatura en ciertos tejidos de pacientes diabéticos, tales como la retina, los nervios periféricos, y el riñón. Esto da por resultado la falta de perfusión capilar de estos tejidos, lo cual a su vez conduce a retinopatía neuropatía o nefropatía diabética, o angiogénesis inducida por la adhesión entre leucocitos polimorfonucleares y células endoteliales a través de la molécula de adhesión intercelular-1, (ICAM-1). En consecuencia, se cree que la inhibición de la leucostasia mediada por ICAM-1 puede prevenir las anomalías de la retina asociadas con diabetes. Véase Miyamoto K et al. (2000), Am. J. Pathol. 156: 1733- 1739; Miyamoto K et al. (1999), P.N.A.S USA 96: 10836-10841; Jude E B et al. (1998), Diabetologia 41:330-6; Miyamoto et al. 1999, P.N.A.S USA 96: 10836-10841; y Yong Song Gho et al. Cancer Research 59, 5128 -5132, 15 de octubre de 1999.

Glutación

En diversas formas de realización, la presente invención proporciona nanopartículas y formulaciones de nanopartículas para uso en el incremento o regulación de los niveles de GSH en un sujeto.

La forma reducida de glutación (GSH) es el tiol no proteico más importante en las células de mamíferos. Su síntesis de novo y salvaje sirve para mantener un ambiente celular reducido y el tripéptido es un cofactor para muchas enzimas citoplasmáticas y también puede actuar como importante modificación posterior a la traducción en una cantidad de proteínas celulares. El tiol de la cisteína actúa como nucleófilo en reacciones con especies electrofílicas exógenas y endógenas. En consecuencia, las especies de oxígeno reactivas (ROS) son frecuentemente diana de GSH en las reacciones espontáneas y catalíticas. Dado que ROS tiene funciones definidas en los eventos de señalización celular así como también en patologías de enfermedades humanas, se ha implicado un desequilibrio de la expresión de GSH y las enzimas asociadas en diversas circunstancias. Se han demostrado relaciones de causa y efecto entre el metabolismo de GSH y enfermedades tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, fibrosis quística (CF), VIH, y el envejecimiento. La expresión polimórfica de las enzimas que intervienen en la homeostasis de GSH influye sobre la susceptibilidad y la progresión de estas afecciones. Véase Danyelle M. Townsend, *, Kenneth D. Tew, Haim Tapiero Biomedicine & Pharmacotherapy 57 (2003) 145-155.

Las nanopartículas de la invención pueden administrarse por vía oral. En un ejemplo de forma de realización, las

nanopartículas pueden administrarse a una dosis desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg por día, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg por día.

- Los ensayos aceptados en la técnica para la alteración de la química de la sangre o el metabolismo son útiles para confirmar la eficacia de dosis terapéuticamente relevantes (u otras) de las partículas de la invención. A continuación, se proporcionan ejemplos que ilustran solo algunos de los ensayos convencionales que se pueden usar para analizar la eficacia de la presente invención en distintas dosis. Los ensayos estándar de citoquinas, insulina, peroxidación de lípidos y vitamina C, CRP, MCP-1, IL-6, TNF- α , leptina, proteína de unión a retinol y niveles de insulina en plasma pueden adoptar la forma del método de ELISA en sandwich mediante el uso de kits disponibles comercialmente de Fisher Thermo Scientific Co, Rockford, Ill. El estrés oxidativo se puede determinar por medición de malondialdehído (un producto final de la peroxidación de lípidos) por su reacción con ácido tiobarbitúrico. Véase Jain, J. Biol. Chem. 264:21340-21345, 1989; Jain et al., Diabetes 38:1539-1543, 1989). La oxidación de proteínas se puede determinar por los métodos descritos en Yan et al., Arch. Biochem Biophys. 327:330-334, 1996. La resistencia a insulina por ejemplo se puede determinar por el método HOMA (Yaturu et al., Cytokine 34:219- 23, 2006). La concentración de vitamina C en plasma se puede determinar por el método de Nino y Shaw. Véase Alan Wu (Ed). Teitz Clinical Guide to Laboratory Tests (cuarta Edición), Filadelfia, WB Saunders Co. 2006. La hemoglobina glicosilada se puede determinar mediante el uso del kit de columna de afinidad y los reactivos Glyco-Tek (cat # 5351) adquiridos de Helena Laboratories (Beaumont, TX). Los niveles de glucosa se pueden determinar mediante el uso de glucosa oxidasa mediante el glucómetro Accu-check Advantage (Boehringer Mannheim Corporation, Indianápolis, IN).
- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención. Se debe entender, sin embargo, que la invención no se debe limitar a las condiciones o detalles específicos descritos en estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una formulación líquida que contiene 1% de policosanol

1. Preparar una solución en agua (100 mL) que contiene laureato de sacarosa (0,1-0,5%) y calentar hasta 80-85°C con agitación.
2. En un vaso de precipitados, pesar el policosanol (1 g) y al menos un excipiente o estabilizador (2-5 g) y calentar hasta 80-85°C con agitación.
3. Verter la solución de éster azúcar en el vaso de precipitados con Policosanol y el excipiente con agitación fuerte y mantener a 80-85°C durante 5 min con agitación. Cuando la temperatura sea inferior a 50°C, la formulación se vuelve transparente.
4. Apagar el calentador y mantener con agitación moderada hasta alcanzar la temperatura ambiente.
5. Agregar un conservante (por ejemplo, sorbato de potasio, benzoato de sodio, ácido cítrico anhidro).
6. Verter la solución en las botellas.

Ejemplo 2

Formulación que tiene 1% de Policosanol

COMPONENTE	%
Vitamina E TPGS	4
Policosanol	1
Éster azúcar	0,95
Sorbato de potasio	0,12
Benzoato de sodio	0,2
Ácido cítrico anhidro	0,1
Agua	93,63

Formulación que tiene 2% de Policosanol

COMPONENTE	%
Vitamina E TPGS	6
Policosanol	2
Éster azúcar	0,92
Glicerina	0,12
Sorbato de potasio	0,12
Benzoato de sodio	0,2
Ácido cítrico anhidro	0,1
Agua	90,54

Formulación que tiene 3% de Policosanol

COMPONENTE	%
Vitamina E TPGS	8
Policosanol	3
Éster azúcar	0,89
Glicerina	0,18
Sorbato de potasio	0,12
Benzoato de sodio	0,2
Ácido cítrico anhidro	0,1
Agua	87,51

5 Ejemplo 3

Estudios en ratas usando solución al 1% de policosanol (10 mg/ ml) con un tamaño de partícula de 53 nm y ~ 82-83% de octacosanol.

Materiales y métodos

Se adquirieron ratas machos Zucker diabéticas grasas de 5 semanas de edad de Charles River Laboratories. Los animales se numeraron aleatoriamente y se alojaron individualmente en jaulas de colonia plásticas en una instalación para animales con clima controlado. Los animales se cuidaron y se usaron de acuerdo con los protocolos generalmente aceptados por la Comisión. Las ratas se dejaron durante 2 días para ambientarse y para aclimatarse al manejo del entrenador. Las ratas se ensayaron para la hiperglucemia por medición de la concentración de glucosa sanguínea. Se midió la glucosa sanguínea por incisión en la cola mediante el glucómetro advantage Accu-Chek® (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN). Las ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos. Cada rata del grupo de tratamiento recibió un suplemento con la dosis apropiada de una formulación nanoparticulada de policosanol de la invención diariamente durante 8 semanas por sonda oral mediante el uso de agujas de alimentación de calibre 20G (Popper and Sons, New Hyde Park, NY). El grupo control recibió un suplemento con vehículo-tampón. Se monitorizó el peso semanalmente para determinar la dosis de suplemento de policosanol. Las ratas se mantuvieron en condiciones de alojamiento estándar a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de 12:12-h de luz/oscuridad con agua y una dieta de pienso de laboratorio Purina 5008 ad libitum. Al final de 8 semanas, las ratas se dejaron en ayunas durante la noche y luego se sacrificaron por eutanasia para el análisis por exposición a halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano). Se obtuvo sangre por punción cardiaca con una aguja calibre 19 1/2 y se extrajo la sangre en una jeringa que contenía heparina, luego se transfirió inmediatamente a tubos de vacutainer EDTA.

25 Había 3 grupos de ratas ZDF: 1. Controles-ZDF; 2. policosanol (5 mg por día/kg PC) ZDF con suplemento, y (3) ratas

al inicio de la suplementación. Esto nos proporcionó el nivel de línea base de todos los parámetros analizados en la sangre de las ratas ZDF. Se usaron ratas Spraug Dawley de edad similar como ratas control normales de edad similar mantenidas con dieta normal.

5 Las ratas se mantuvieron con dieta Purina 5008 con y sin policosanol durante 8 semanas. Se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA previamente enfriados en un balde con hielo. Se usó la sangre con EDTA para los ensayos de HbA1c, y CBC (efectuados por el laboratorio de hematología clínica). La sangre con EDTA se centrifugó. Los RBC se usaron para el ensayo de GSH y de peroxidación de lípidos. Se usó el plasma límpido para la peroxidación de lípidos y los productos de oxidación de proteínas y para TNF- α , IL-6, MCP-1, CRP, adipocinas, sensibilidad a insulina por ensayos de ELISA. Todos los análisis se realizaron inmediatamente después de obtener la sangre. Las muestras para marcadores de estrés oxidativo y citoquinas proinflamatorias se almacenaron en un congelador a -70°C. También se efectuaron perfiles químicos completos (CMP2) que incluyen niveles de SGOT y SGPT para revelar cualquier signo de toxicidad durante la suplementación de policosanol. En los ensayos de citoquinas, se analizaron las muestras de sueros control en todos los tiempos para monitorizar la variación de una placa a otra y en diferentes días de análisis de citoquinas. Los ensayos se repitieron si la variación de los valores de suero control de día a día era superior al 7%.

20 Ensayos de citoquinas, insulina, peroxidación de lípidos y vitamina C: se determinaron los niveles de CRP, MCP-1, IL-6, TNF- α , leptina, proteína de unión a retinol e insulina en plasma por el método de ELISA en sandwich usando kits disponibles comercialmente de Fisher Thermo Scientific Co, Rockford, Ill). Se usaron todos los controles y estándares adecuados tal coma se especifica en el kit del fabricante. En el ensayo de citoquinas, las muestras control se analizaron cada tiempo para evaluar la variación entre placas en diferentes días de análisis. Se determinó el estrés oxidativo por medición de malondialdehído (un producto final de la peroxidación de lípidos) por su reacción con ácido tiobarbitúrico (1, 2). Véase Jain "Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells". J Biol Chem 264:21340-21345, 1989; y Jain et al. "Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes" Diabetes 38:1539-1543, 1989. La oxidación de las proteínas se determinó por los métodos de Yan et al. En "Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation" Arch Biochem Biophys 327:330-334, 1996. La resistencia a insulina se determinó por el método HOMA. Véase Yaturu et al. "Resistin and adiponectin levels in subjects with coronary artery disease and type 2 diabetes." Cytokine 34:219-23, 2006; e Ismael et al. "Bockade of sensory abnormalities and kinin 8₁ receptor expression by N-acetyl- L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance." Eur J Pharmacol. 589:66-72, 2008. La concentración de vitamina C en plasma se determinó por el método de Nino y Shaw. Véase, Wu (ed). Teitz Clinical Guide to Laboratory Tests (cuarta Edición) Filadelfia, WB Saunders Co. 2006. GSH se determinó por el método de Beutler en Red Blood Cell Metabolism: A manual of Biochemical Methods Pub: Grune y Stratton, NY. 131-134, 1984.

35 Medición de hemoglobina glucosilada (GHb), glucosa y resistencia a insulina: La hemoglobina glucosilada se determinó mediante el uso de kits de columna de afinidad y reactivos Glico-Tek Affinity (cat# 5351) adquiridos de Helena Laboratories (Beaumont, TX). Los niveles de glucosa se determinaron mediante el uso de glucosa oxidasa con el glucómetro Accu-check Advantage (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, IN).

40 Análisis de transferencia Western de extractos hepáticos: tejidos extraídos de las ratas de experimentación se congelaron inmediatamente usando nitrógeno líquido y se molieron bien hasta obtener polvo y se congelaron a -70°C hasta su uso. Los polvos de tejido congelados (<150 mg) se lavaron por resuspensión en 1 mL de PBS que contenía inhibidores de proteasa, se agitaron con vórtex suavemente y se centrifugaron a 15.000 rpm a 4°C durante 10 min. Se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos celulares se lavaron una vez más tal como se mencionó con anterioridad y luego se resuspendieron en 500 mL de tampón de extracción (25 mM de Tris, 0,5 mM de EDTA, PMSF 0,1 mM, pH 7,4) con inhibidores de proteasa y se homogeneizaron con homogeneizador y se sometieron a sonicación suave. Los tubos se centrifugaron a 15.000 rpm (4°C, 30 min) y se recogieron los sobrenadantes (extractos). Los extractos recogidos se volvieron a someter a centrifugación tal como se describió con anterioridad y se retiraron los restos celulares. El contenido proteico de los extractos se estimó mediante el uso del ensayo de proteína BCA. Se cargaron cantidades iguales de proteínas de cada grupo sobre un gel de SDS- poliacrilamida después de hervir durante 5 minutos con mercaptoetanol como agente reductor. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon con 1% de BSA en T-PBS y se incubaron durante la noche a 4°C con los respectivos anticuerpos primarios. Al día siguiente, se lavaron las membranas con T-PBS (8 minutos, 4 ciclos) y se incubaron con anticuerpos secundarios en 5% de leche descremada durante 30 min. a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar con T-PBS (8 minutos, 4 ciclos), se trataron con reactivos quimioluminiscentes durante 2 minutos y se expusieron a películas de rayos X, las cuales se revelaron mediante autorradiografía.

55 Todos los compuestos químicos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) a menos que se mencione otra cosa.

Análisis de los datos: los datos se analizaron mediante el uso de ANOVA entre diferentes grupos con software estadístico Sigma Plot (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Un valor p de menos de 0,05 se considera significativo.

60

Resultados

5 No se observó diferencia en el peso corporal en el momento del sacrificio entre los diferentes grupos de tratamiento. La ingesta semanal de la dieta por cada rata, evaluada a las 5 y 7 semanas después de comenzar la suplementación, era similar en ambos grupos. El peso corporal y la ingesta de alimento para las ratas machos Zucker-Fatty suplementados con policosanol durante 8 semanas se proporcionan en la Tabla 1 siguiente. Cada valor representa la media \pm SE.

Tabla I

Entrada	N	Peso corporal en el Sacrificio	Ingesta de Alimento 5 semanas	Ingesta de Alimento 7 semanas
	unidades	g	g/día	g/día
Normal (SD)	6	439,00 \pm 7,35	26,90 \pm 0,67	27,43 \pm 1,02
Diabético	7	370,57 \pm 3,92	37,86 \pm 0,73	38,18 \pm 1,17
5 mg/kilo policosanol	5	368,80 \pm 6,62	34,23 \pm 2,28	37,94 \pm 1,84

10 En todas las figuras, los valores marcados "*" son estadísticamente significativos en comparación con los controles ($p < 0,05$). La FIG. 30 proporciona datos sobre los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), aspartato aminotransferasa (AST), nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), creatinina y brecha aniónica en la sangre de las ratas con suplemento. El análisis de los resultados demuestra que el suplemento de policosanol redujo los niveles sanguíneos de glucosa, colesterol total, triglicéridos, oxidación de proteínas, MCP-1 y CRP y fosfatasa alcalina, y aumentó los niveles sanguíneos de vitamina C. Si bien el policosanol no modificó los niveles sanguíneos de transaminasas, redujo los niveles de fosfatasa alcalina comparados con las ratas diabéticas.

15 La Tabla II muestra que la suplementación con policosanol no afectó la hemoglobina, el hematocrito o el recuento de RBC en ratas diabéticas, lo cual descarta cualquier efecto de supervivencia alterada de los glóbulos rojos sobre los menores niveles de hemoglobina glucosilada en ratas ZDF con suplemento de policosanol y afirma la falta de cualquier signo de toxicidad en ratas con suplemento de policosanol. Los datos demuestran que el suplemento de policosanol no parece causar cualquier ninguna toxicidad según se evalúa por los ensayos de función hepática o renal.

Tabla II: Efectos de policosanol sobre hemoglobina sanguínea, hematocrito, y recuentos de células rojas sanguíneas en Ratas Zucker Fatty. Cada valor representa la media \pm SE

Entrada	N	RBC	Hemoglobina	Hematocrito
	unidades	$10^6/\mu\text{L}$	g/dL	%
Normal (SD)	6	7,99 \pm 0,13	15,27 \pm 0,20	44,48 \pm 0,61
Diabético	7	9,48 \pm 0,13	15,96 \pm 0,23	48,54 \pm 0,78
5 mg/kilo de policosanol	5	8,50 \pm 0,23	14,46 \pm 0,43	43,34 \pm 1,23

25 El hígado juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa. Véase Michael et al. "Loss of Insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction". Mol Cell. 6:87- 97, 2000. El hígado es un órgano de almacenamiento para la glucosa, las proteínas y las vitaminas. Las vías glucogénicas y gluconeogénicas que son los principales reguladores de los niveles de glucosa sanguínea son exclusivos del hígado. Varias hormonas, incluyendo la insulina, el glucagón, la hormona del crecimiento, el cortisol, y las catecolaminas contribuyen a la regulación del metabolismo de la glucosa por el hígado. En consecuencia, examinamos el papel de la activación de NF κ B en el hígado y su posible contribución al metabolismo de la glucosa en ratas con suplemento de policosanol.

30 Los resultados de nuestro estudio muestran que la diabetes experimental indujo la activación de NF κ B en los

hígados de las ratas diabéticas Zucker comparadas a los controles de línea base. Véase Yerneni et al. "Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells". Diabetes. 48:855-64, 1999. NFκB es una diana conocida de hiperglucemia. Véase Meng et al. "Akt is a downstream target of NFκB." J Biol Chem 277: 29674-29680. El estrés oxidativo asociado con diabetes es un activador conocido de NFκB, un heterodímero que consiste de dos subunidades que se unen al ADN denominadas p50 y p65. NFκB está presente en el citoplasma como complejo con su proteína inhibitoria denominada κB inhibitora (IκB). Después de la activación, IκB se disocia de NFκB y sufre ubiquitinación y degradación. NFκB se libera para sufrir translocación nuclear. Después de su translocación nuclear, NFκB sufre fosforilación de serina en el residuo 276 en su subunidad p65 y se asocia con componentes de cromatina circundantes. Posteriormente, se une a ADN y promueve la transcripción de citoquinas proinflamatorias y mediadores conocidos de resistencia a insulina. En consecuencia, la medición de la subunidad fosforilada p65 de NFκB es una herramienta efectiva para determinar la activación de NFκB. Tal como se muestra en la FIG. 27, las ratas diabéticas exhibieron elevada activación de NFκB. También hallamos que NFκB era inhibido por la administración de la formulación de policosanol descrita en la presente memoria. Nuestros resultados muestran que la suplementación con policosanol resultó en una mejora significativa de la glucemia y la inhibición del estrés oxidativo y la secreción de citoquinas proinflamatorias en ratas diabéticas.

En conclusión, el suplemento de policosanol tiene el potencial de reducir los niveles sanguíneos de glucemia y las citoquinas proinflamatorias e incrementar los niveles de vitamina C. Este efecto está mediado por la inhibición de la activación de NFκB por policosanol.

Ejemplo 4

20 Estudio de ensayo clínico

La formulación al 1% de policosanol descrita con anterioridad se usó en un estudio abierto de centro único para evaluar la efectividad y la tolerabilidad para reducir la presión arterial en pacientes diabéticos como punto final primario y para evaluar otros biomarcadores clave. Los resultados del estudio se resumen más adelante en el ejemplo 4.1.

25 Ejemplo 4.1.

Se calcularon Homa %B (función de células beta (%B) y sensibilidad a insulina (%S), y resistencia a insulina mediante el calculador HOMA v2.2.2 (Diabetes Care 1998; 21: 2191-92). El estudio incluyó 14 sujetos diabéticos con edad promedio de 48 + o - 22 años. La duración promedio de la diabetes era de 13,5 + o - 12,5 años. Los sujetos tomaron 20 mg (1 mL dos veces por día) durante 12 semanas. No hubo control sobre la dieta de los sujetos.

30 Tal como se muestra en la Tabla III siguiente, las presiones arteriales sistólica y diastólica, los niveles de proteína C reactiva, los niveles de lípidos de muy baja densidad (VLDL), la albúmina sérica, los niveles de globulina sérica, y la pérdida de la cintura en pacientes con BMI superior a 28 eran estadísticamente significativos con $p << 0,05$. Los resultados muestran que puede ser útil para tratar hipertensión, reducir el riesgo cardiovascular en pacientes con niveles elevados de proteína C reactiva y reducir VLDL (un precursor de LDL), reducir la circunferencia de cintura, y mejorar la función renal. El policosanol era extremadamente bien tolerado y no se reportaron eventos adversos por parte de las pacientes.

Tabla III

Entrada	N	valor promedio en la línea base	desviación estándar	valor promedio a las 12 semanas	desviación estándar	% de cambio	valor p
Circunferencia de cintura (cm) BMI encima de 28	4	110,25	13,07	98,75	17,73	-10,4	0,0002
albúmina sérica (g/dl)	14	4,4	0,28	3,82	0,37	-13,1	0,0003
presión arterial sistólica (mm)	14	141,71	22,94	121,07	12,16	-14,5	0,00074
relación albúmina/globulina	14	1,50	0,33	1,23	0,31	-16,6	0,003
globulina sérica (g/dl)	14	2,66	0,32	3,10	0,50	16,5	0,01

ES 2 663 299 T3

VLDI (lípidos de muy baja densidad) (mg/dl)	14	70,5	25,44	45,21	19,04	-49,2	0,0118
presión arterial diastólica (mm)	14	87,35	13,14	75,71	8,69	-12,98	0,0279
His-CRP (proteína C reactiva) mg/dL	14	3,63	2,66	2,02	1,42	-35,8	0,05
insulina en ayunas (mU/L)	14	15,07	8,80	11,77	5,31	-28,5	0,20
resistencia a insulina	14	2,6	2,13	1,9	0,84	-26,9	0,21
SGPT (U/L)	14	29,35	17,62	21,75	9,63	-26,06	0,26
Circunferencia de cintura (cm)	14	96,35	12,82	91,28	12,25	-5,26	0,31
vitamina C (mg %)	14	0,29	0,08	0,35	0,17	20,6	0,31
Homa%S	14	59,16	27,87	64,62	24,22	9,3	0,33
relación colesterol/hdl	14	4,87	1,00	4,60	1,02	-5,27	0,35
Relación cintura cadera	14	0,95	0,075	0,93	0,086	-2,1	0,38
glucosa en ayunas (mg %)	13	194,07	53,2	181,69	63,9	-6,36	0,38
SGOT (U/L)	14	22,1	9,49	19	5,05	-16,8	0,43
Hdl (mg/dl)	14	39,78	7,47	40,78	7,36	2,5	0,45
colesterol total (mg/dl)	14	191	37,46	181,29	33,03	-5,03	0,47
Cadera (cm)	14	100,42	17,32	97,71	16,32	-2,8	0,48
Homa%B	14	41,5	22,1	48,5	5,05	16,8	0,58
Triglicéridos (mg/dl)	14	208,78	137	191,50	105	-8,2	0,71
HbA1c % (hemoglobina glucosilada)	14	9,54	1,87	9,29	2,27	-2,6	0,80
Peso (kg)	14	148,50	17,3	66,56	16,2	-0,1	0,99

Sobre la base de los resultados altamente significativos en la reducción de la presión sistólica en pacientes con diabetes, se puede calcular la reducción de factores de riesgo sobre la base de UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Este estudio de 10 años de 5.000 pacientes concluyó que hay una relación directa de riesgo entre complicaciones de diabetes y presión arterial sistólica. Una disminución de 10 mm de la presión sistólica reduce los factores de riesgo en 10-20%. Esto se muestra en la Tabla IV siguiente. Véase "Systolic pressure lowers the risk of association of systolic blood pressure with macro-vascular and micro vascular complications of Type 2 diabetes: prospective observational study" *British Medical Journal* (2000) 321: 412- 419.

5

Tabla IV: Resumen de UKPDS

Entrada	% de Reducción de riesgo basado en la reducción de la presión sistólica
Cualquier punto final relacionado con diabetes	12
Muertes relacionadas con diabetes	17
Mortalidad por cualquier causa	12
Infarto de miocardio mortal y no mortal	12
Accidente cerebrovascular mortal y no mortal	19
Puntos finales microvasculares	13
Amputación o muerte por enfermedad cardiaca periférica	16
Insuficiencia cardiaca	17

Tabla V: Resultados basados en nuestro estudio en humanos.

Entrada	% de Reducción de riesgo basado en la reducción de la presión sistólica
Cualquier punto final relacionado con diabetes	33
Muertes relacionadas con diabetes	47
Mortalidad por cualquier causa	33
Infarto de miocardio mortal y no mortal	33
Accidente cerebrovascular mortal y no mortal	19
Puntos finales microvasculares	36
Amputación o muerte por enfermedad cardiaca periférica	44
Insuficiencia cardiaca	33

5 Al aplicar la metodología de evaluación de riesgo de UKPDS, es obvio que, a las 12 semanas, las reducciones de riesgo eran sustanciales. Se puede inferir que la formulación de policosanol de la invención es útil para mitigar los factores de riesgo en pacientes con diabetes y en aquellos que están en situación de riesgo de enfermedades relacionadas con hipertensión.

Ejemplo 4.2:

10 La formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria (20 mg por día) se proporcionó a un varón de 26 años de edad diagnosticado a la edad de 3 años con diabetes tipo 1. Su toma diaria de insulina antes del tratamiento era de 30 unidades cada día. Se midió la insulina en ayunas en la línea base y durante 21 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla VI siguiente.

Tabla VI

Semana	Niveles de insulina en ayunas (mU/L)
0	0,19
3	0,33
6	0,45
12	31,75

15	16
18	22
21	16,6

Sobre la base de los datos anteriores, la formulación de policosanol podría ser útil en pacientes con diabetes tipo 1 para potenciar la actividad de las células beta en el incremento de la producción endógena de insulina.

Ejemplo 4.3:

5 Una niña de 4 años de edad diagnosticada con síndrome nefrótico fue tratada con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 10 mg por día. El síndrome nefrótico es un grupo de síntomas que incluyen proteína en la orina (más de 3,5 gramos por día) bajos niveles de proteína en sangre, altos niveles de colesterol, y tumefacción. Está causado por diversos trastornos que dañan los riñones, particularmente la membrana basal del glomérulo. Esto causa inmediatamente excreción anormal de proteína en la orina. El síndrome nefrótico puede afectar todos los grupos etarios. En niños, es más común entre las edades de 2 a 6 años.

10 En la línea de base, no hubo síntomas en el tracto urinario. La relación de proteína a creatinina en orina (UPCR) era de 6,0. Después del tratamiento con la formulación de policosanol durante 2 semanas, la relación UPCR disminuyó a 1,6 y después de 4 semanas a 0,6. Sobre la base de los datos siguientes, la formulación de poliosanol podría ser de utilidad para tratar enfermedades renales como se muestra en el ejemplo 4.1, en donde la reducción de albúmina era estadísticamente significativa.

	Relación UPCR
Línea base	6
después de 2 semanas	1,6
después de 4 semanas	0,6

Ejemplo 4.4:

20 Un varón de 48 años de edad con síntomas de dolor de rodilla y articular durante el día y entumecimiento y dolor por la noche en las articulaciones fue tratado con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 20 mg por día durante 3 meses. Los niveles en plasma sanguíneo de vitamina C en la línea base eran bajos (de aproximadamente 0,15 mg %) a pesar del adecuado consumo de vitamina C por la dieta. Se descartaron artritis reumatoide y osteoartritis por rayos X e IRM. El factor RA y los niveles de ácido úrico eran normales.

	vitamina C en plasma mg %
Línea base	0,15
después de 3 meses	0,64

Porcentaje de incremento = 326

25 El dolor de rodilla y articular del paciente durante el día se suprimió por completo y el dolor por la noche se redujo a un mínimo.

Ejemplo 4.5:

Un paciente varón de 43 años, con diabetes tipo 2 (detectada a los 38 años) tenía muy bajos niveles en plasma de vitamina C en la línea base de 0,27 mg%. Para este estudio, se le proporcionó la formulación de 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 20 mg por día durante seis meses.

30 Al final de los seis meses, sus niveles plasmáticos de vitamina C habían mejorado a 3,82 mg %. También se observó una mejora en la HbA1c y los niveles de insulina en ayunas.

	vitamina C mg %	insulina en ayunas mg/l	proteína C reactiva hs mg/L	hb1ac %
Línea base	0,27	11,79	3,9	7,4
a los 6 meses	3,82	5,67	0,87	6,2

Ejemplo 4.6:

- 5 Un varón de 42 años de edad con diagnóstico de diabetes tipo II e hiperinsulinemia (diagnosticada a los 37 años) fue tratado con la formulación al 1% policosanol descrita en la presente memoria a 20 mg por día durante 6 meses. Tal coma se muestra en la tabla siguiente, demostró una reducción significativa de sus niveles de insulina en ayunas al final de los seis meses.

	insulina en ayunas mg/l
Línea base	34,38
a los 6 meses	4,59

Ejemplo 4.7:

- 10 Una paciente mujer de 47 años de edad que fue diagnosticada con diabetes de tipo 2 a los 41 años fue tratada con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 20 mg por día durante 6 meses. Al final de los seis meses, se observaron educciones significativas de la relación cintura-cadera, los niveles de glucosa en ayunas y los niveles de proteína C reactiva hs.

	relación cintura cadera	glucosa en ayunas mg/l	proteína C reactiva hs mg/L
Línea base	0,98	292	8,74
a los 6 meses	0,77	182	3,4

Ejemplo 4.8:

- 15 Un paciente varón de 48 años de edad, obeso (BMI> 30), no diabético, con muy bajo HDL en la línea base fue tratado con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 40 mg por día durante 8 semanas. Los resultados indicaron amplia mejora de HDL, LDL, las relaciones CHOL/HDL (colesterol total /HDL) y una reducción de 6 kg en peso y mejora de la relación BMI.

	Colesterol Total mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	Triglicéridos	VLDL mg/dl	relación CHOL/HDL	BMI
Línea base	200	24	120	278	55,6	8,33	30,3
a las 8 semanas	183	55	76	258	51,6	3,32	28,3
% de cambio	-8,5	129	-36,6	-7,2	-7,1	-60	-6,6

- 20 Ejemplo 4.9:

Una mujer de 50 años de edad diagnosticada con hipertensión y diabetes de tipo 2 fue tratada con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 20 mg por día. Los resultados indicaron una gran mejora de la presión arterial a los 6 meses.

	presión sistólica mm de Hg	presión diastólica en mm de Hg
Línea base	183	112
a los 6 meses	130	80

Ejemplo 4.10:

5 Una niña de diez años de edad fue diagnosticada con infección renal con albúmina en la orina. Fue tratada con la formulación al 1% de policosanol descrita en la presente memoria a 10 mg por día. El ensayo de orina después de 10 días mostro remisión completa de la infección y ausencia de trazas de albúmina en la orina. Los resultados demuestran la utilidad de la presente invención para tratar infección renal que exhibe la presencia de albúmina.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas de policosanol, en las que cada nano-partícula comprende:
 - (a) una fracción de policosanol que comprende aproximadamente 70% a 90% de octacosanol; y
 - (b) una fracción estabilizadora que comprende succinato de tocoferol polietilén glicol (1000) ("TPGS"), en la que la relación de la fracción octacosanol:estabilizador varía desde 1:1,6 hasta 1:2,8 y las nanopartículas tienen un tamaño entre 40 nm y 100 nm en diámetro y en el que al menos 99% de las nanopartículas tienen un tamaño de menos de 70 nm como se determina por un método de dispersión de la luz.
2. Nanopartículas según la reivindicación 1, en las que dicha fracción de policosanol comprende además: triacontanol y/o hexacosanol.
3. Nanopartículas según la reivindicación 2, en las que dichas nanopartículas tienen una relación de octacosanol:triacontanol de desde 9:1 hasta 15:1.
4. Nanopartículas según la reivindicación 2, en las que dichas nanopartículas tienen una relación de octacosanol:hexacosanol de desde 16:1 hasta 20:1.
5. Nanopartículas según la reivindicación 1, en las que dichas nanopartículas tienen un tamaño de 60 nm en diámetro.
6. Pluralidad de nanopartículas según la reivindicación 1.
7. Formulación farmacéutica que comprende dicha pluralidad de nanopartículas según la reivindicación 6, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Formulación de dosificación unitaria que comprende desde 10 hasta 30 mg/mL (peso/vol) de dicha pluralidad de nanopartículas según la reivindicación 1.
9. Formulación farmacéutica según la reivindicación 7 para uso en:
 - el tratamiento de resistencia a la insulina en un sujeto;
 - el tratamiento de aterosclerosis en un sujeto;
 - el tratamiento de enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), síndrome metabólico en un sujeto;
 - el tratamiento de diabetes: diabetes tipo I o diabetes tipo II en un sujeto;
 - el tratamiento de dolores de cabeza, síndrome de dolor regional complejo, hipertrofia cardíaca, distrofia muscular (tipo 2a), desgaste muscular, trastornos catabólicos, retraso del crecimiento fetal, isquemia/reperfusión, aneurisma cerebral, enfermedad pulmonar tal como enfermedad pulmonar inflamatoria, lesión pulmonar inducida por ácidos, enfisema, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma refractario, asma, enfermedad de membrana hialina y síndrome de distrés respiratorio del adulto, fibrosis quística, sinusitis nasal, mesotelioma, displasia ectodérmica anhidrótica, enfermedad de Behcet, incontinencia pigmentaria, tuberculosis, artritis tal como espondilitis anquilosante y artritis reumatoide, glaucoma, apendicitis, enfermedad de Paget, pancreatitis, periodontitis, endometriosis, enfermedad inflamatoria intestinal tal como enfermedad de Crohn, sepsis, apnea del sueño, SIDA (VIH-1), autoinmunidad, síndrome antifosfolipídico, lupus, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome de enfermedad crónica, fiebre del Mediterráneo familiar, síndrome de fiebre periódica hereditario, enfermedades por estrés psicosocial, neuropatía tal como polineuropatía amiloidótica familiar y neuropatía inflamatoria, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, psoriasis, choque séptico, enfermedad reumática, enfermedades neurodegenerativas tal como enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington, enfermedad de la retina, cataratas en un sujeto;
 - el tratamiento de trombosis en un sujeto;
 - el tratamiento de arteriosclerosis, vasculitis, enfermedades renales y hepáticas tal como enfermedad glomerular, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad por leptospirosis renal y rechazo de aloinjerto renal y hepático, afecciones por isquemia reperfusión, rechazo de órganos, metástasis, resfriado común, una variedad de trastornos inflamatorios de la piel tal como dermatitis alérgica por contacto, erupción por fármacos fija, liquen plano, enfermedad de Graves, en un sujeto;
 - el tratamiento de cataratogénesis (α -cristalinas), Kwashiorkor en un sujeto;
 - el tratamiento de enfermedad cardiovascular tal como infartos de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica, angina de pecho y accidente cerebrovascular, enfermedad de hígado graso, síndrome de ovario poliquístico en un sujeto;

- el tratamiento de acantosis nigricans, acné vulgar, alergias tal como alergia ocular, trastorno bipolar, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, depresión, fatiga crónica, cáncer de colon y rectal, caspa, hirsutismo, hipotiroidismo, osteoporosis, cáncer pancreático, cáncer de próstata, escleroderma, seborrea, venas varicosas en un sujeto.

5 10. Uso no terapéutico de la formulación farmacéutica según la reivindicación 7 para reducir la circunferencia de la cintura en un sujeto.

FIGURA 1

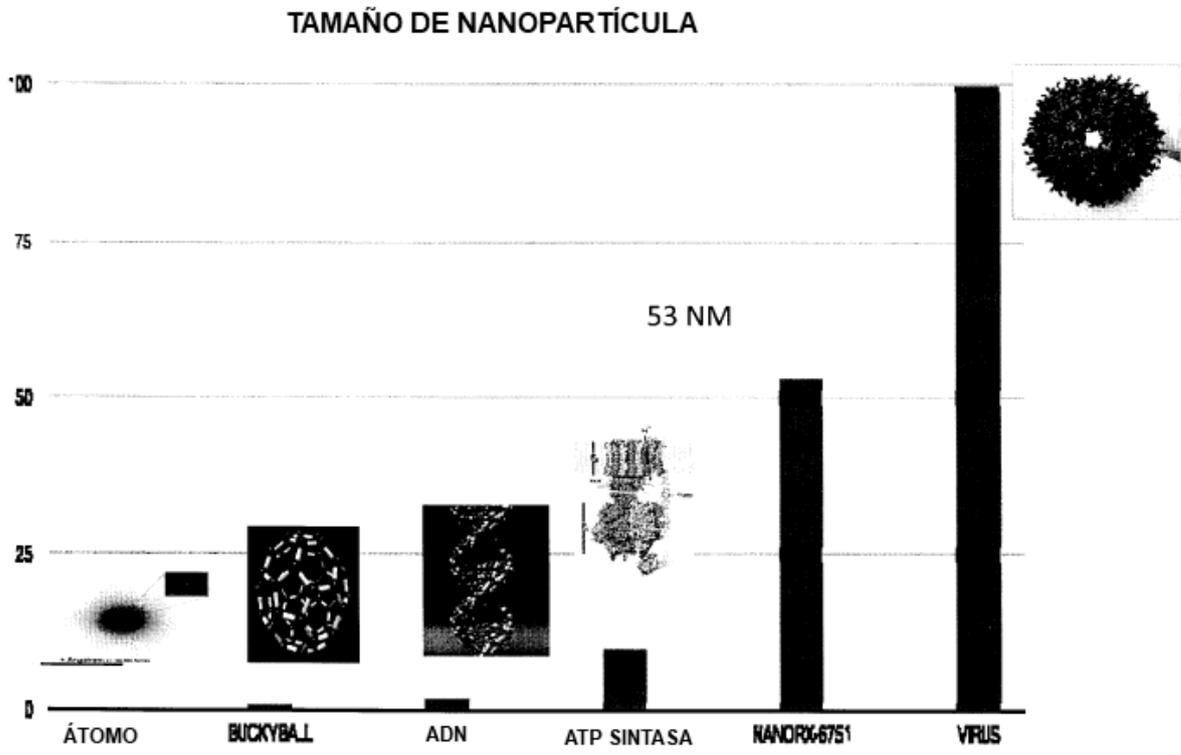


FIGURA 2

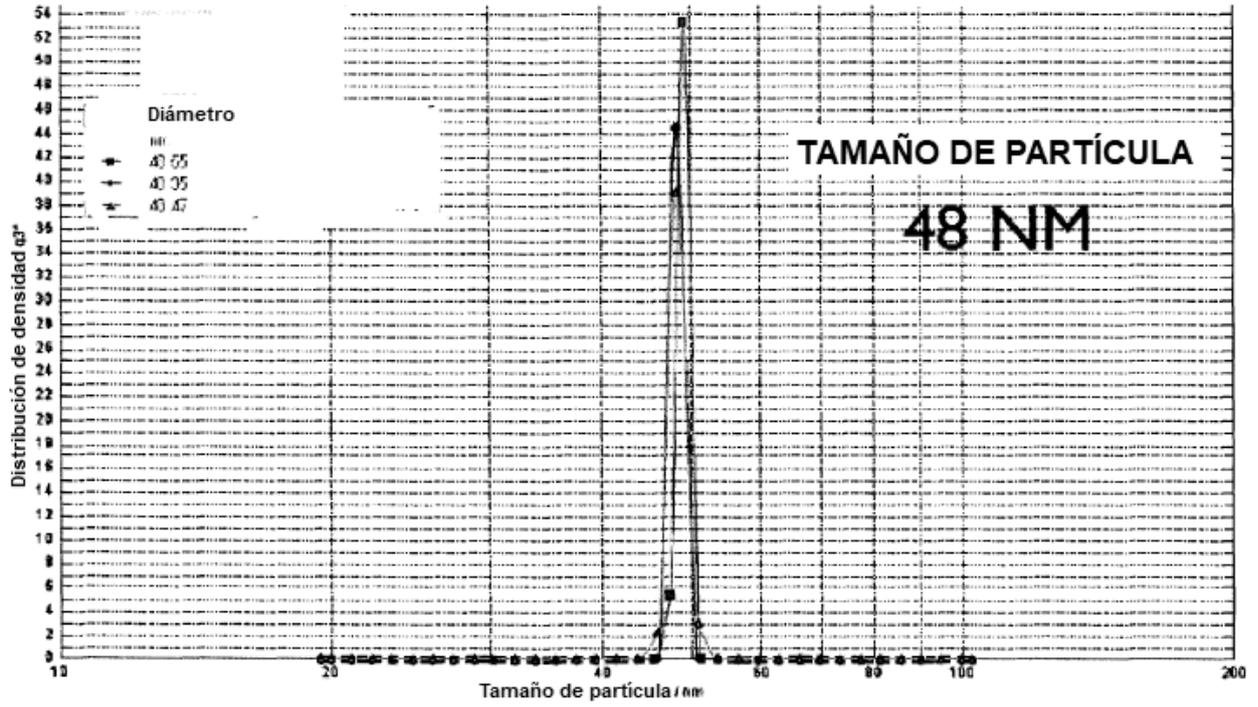


FIGURA 3

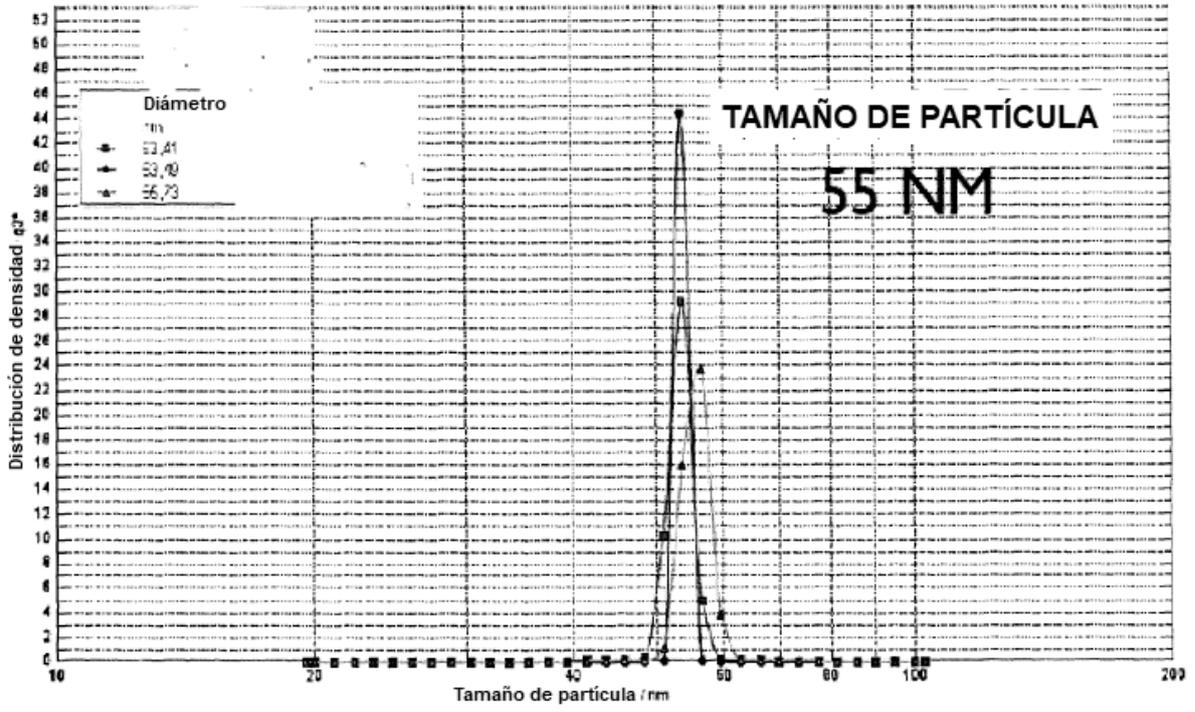


FIGURA 4

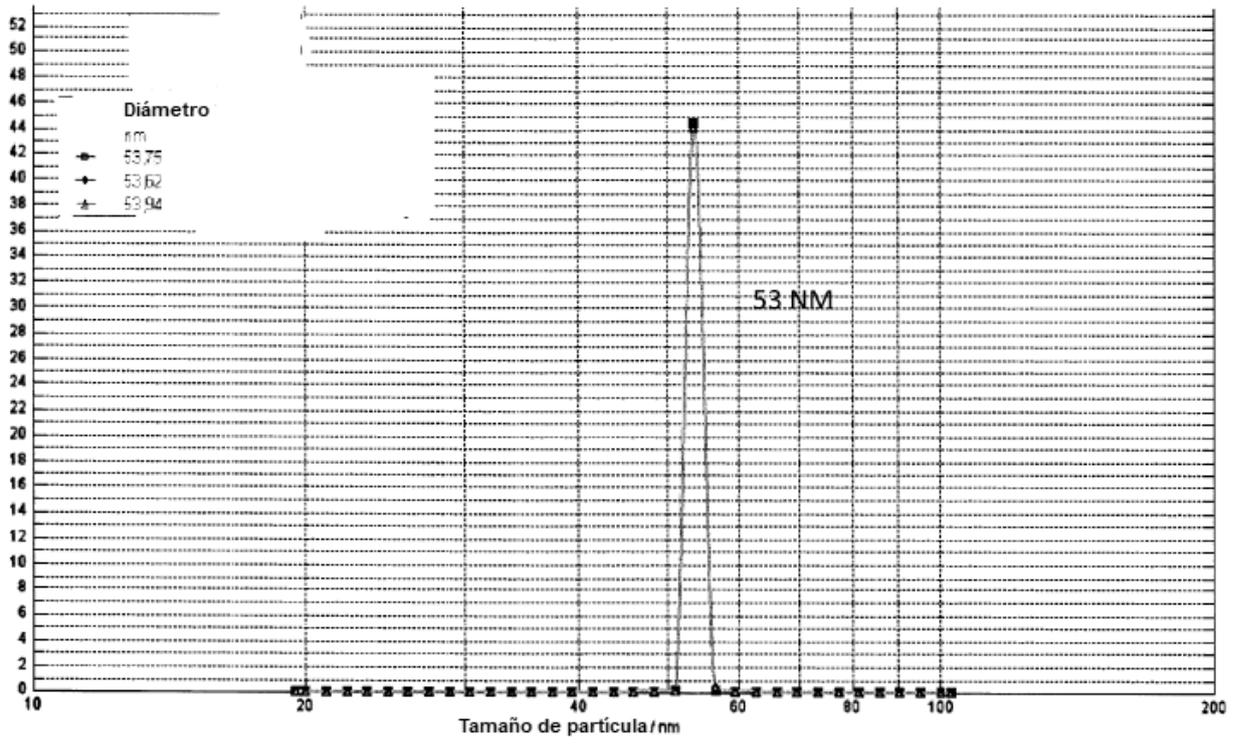


FIGURA 5

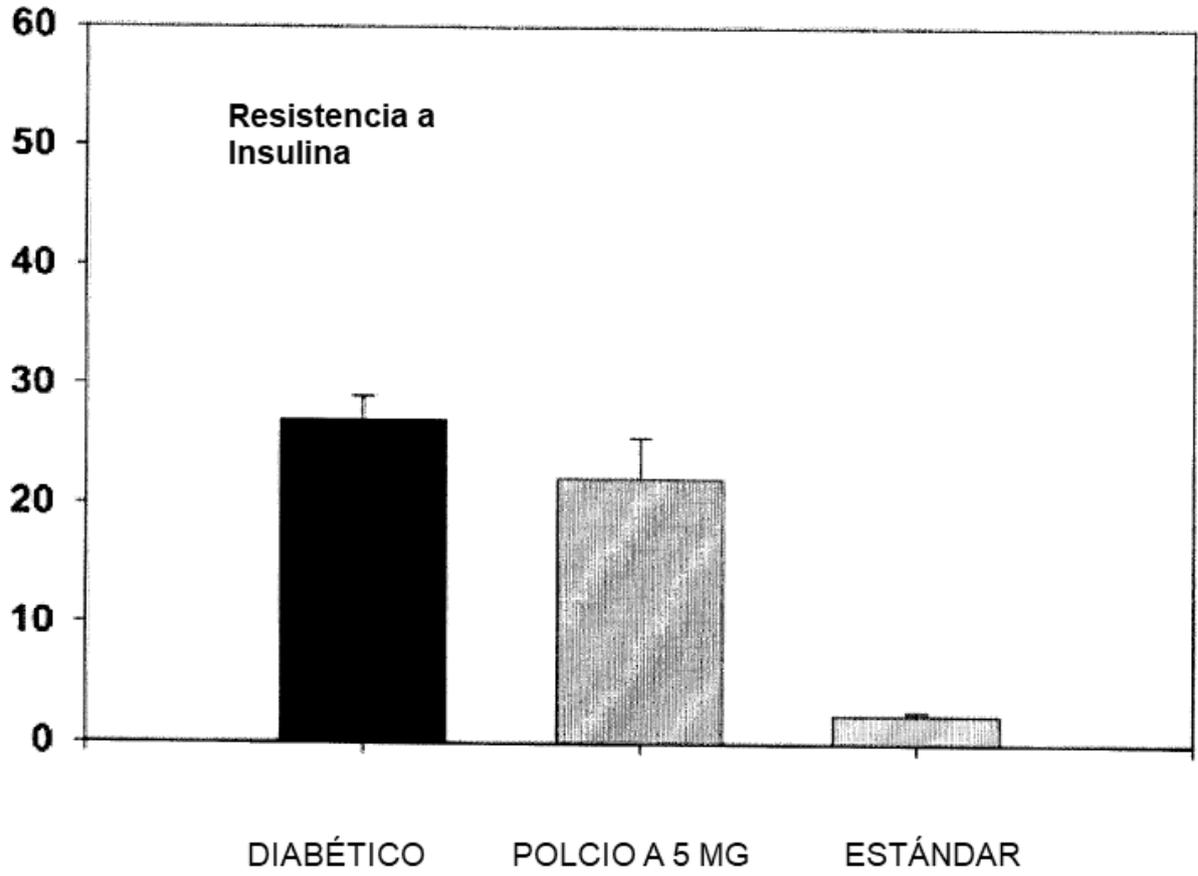


FIGURA 6

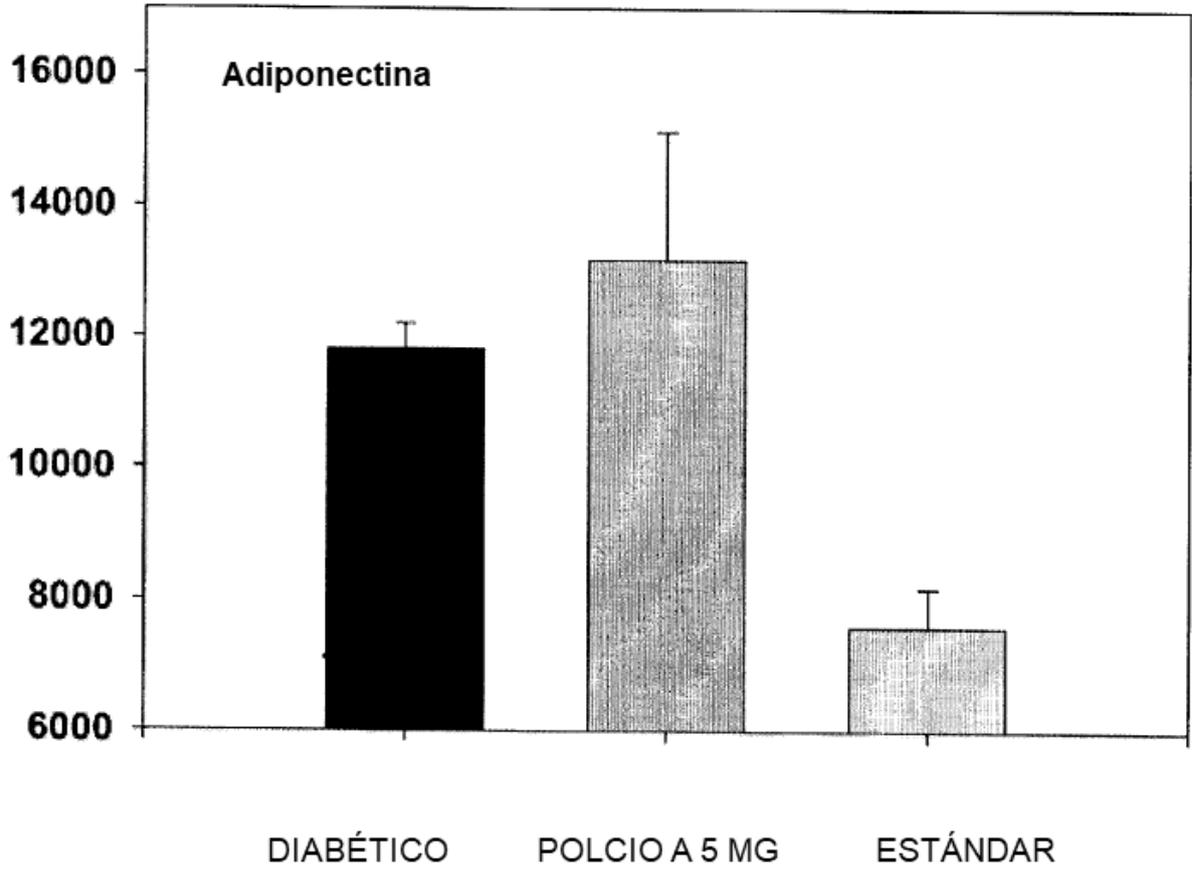


FIGURA 7

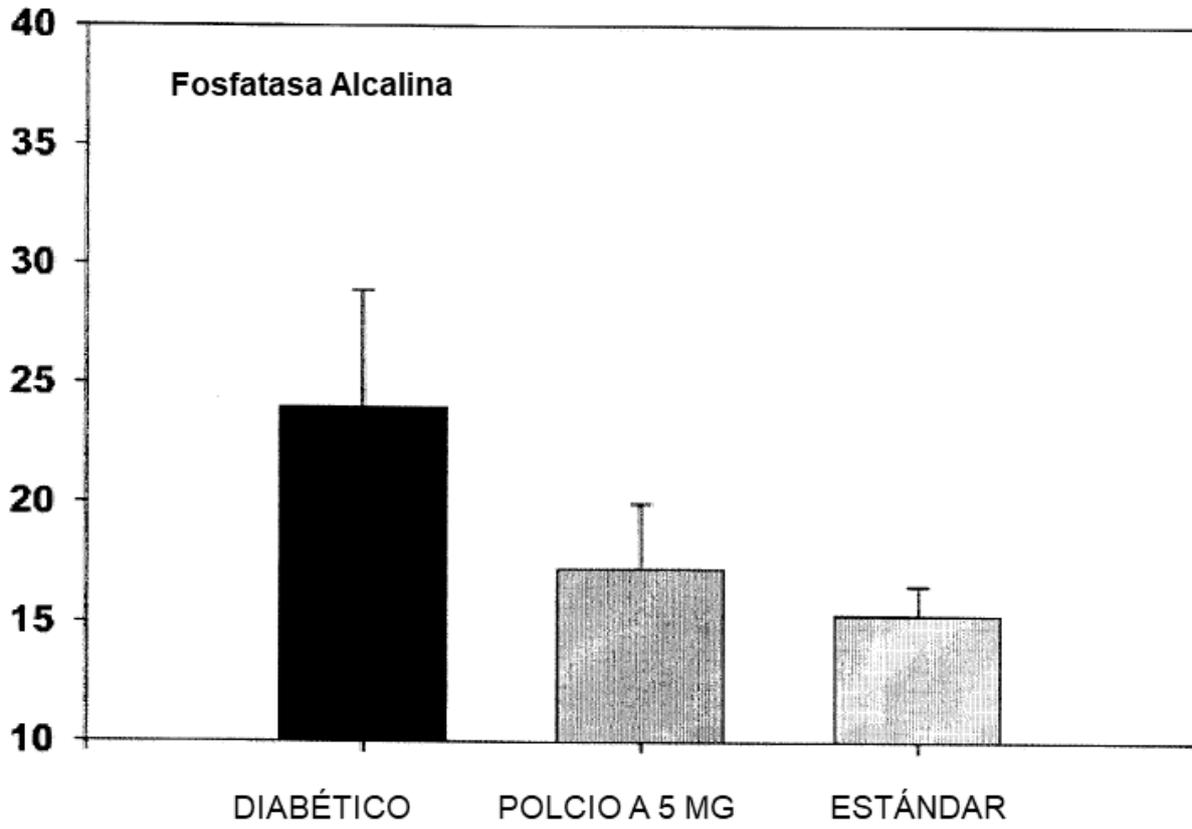


FIGURA 8

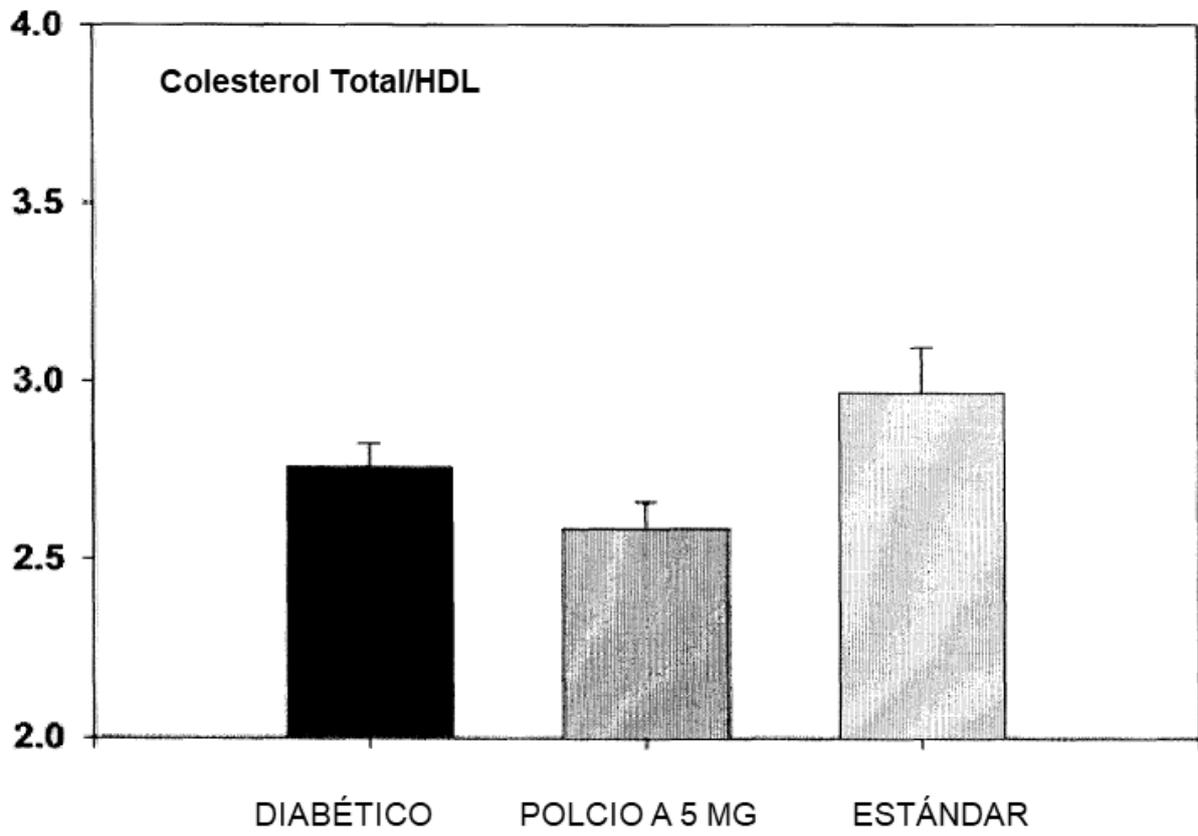


FIGURA 9

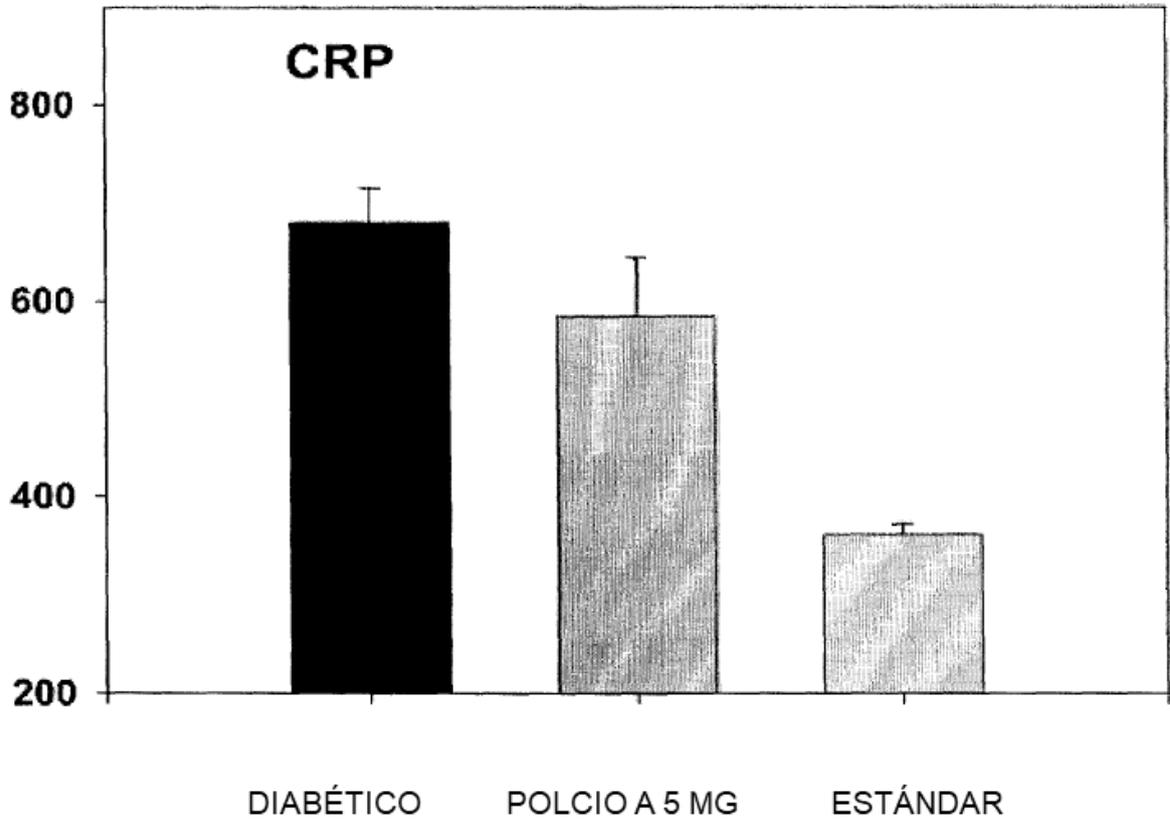


FIGURA 10

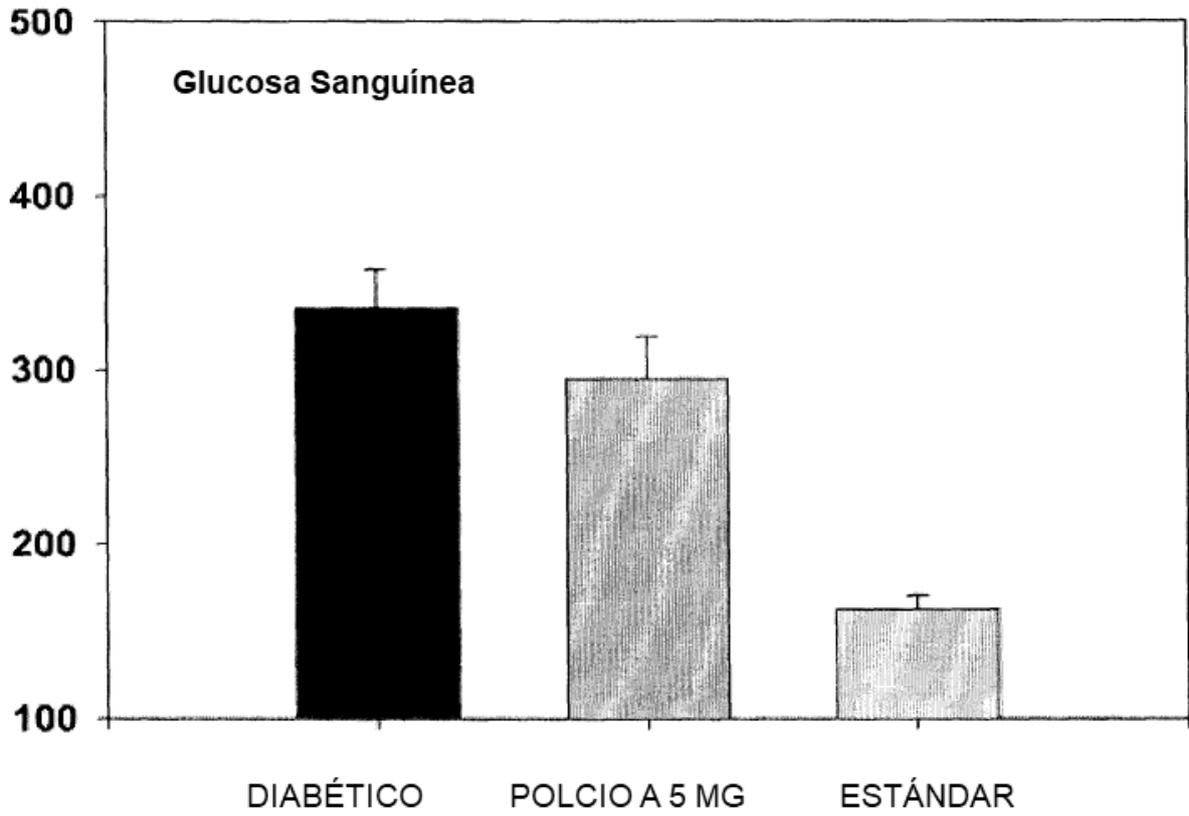


FIGURA 11

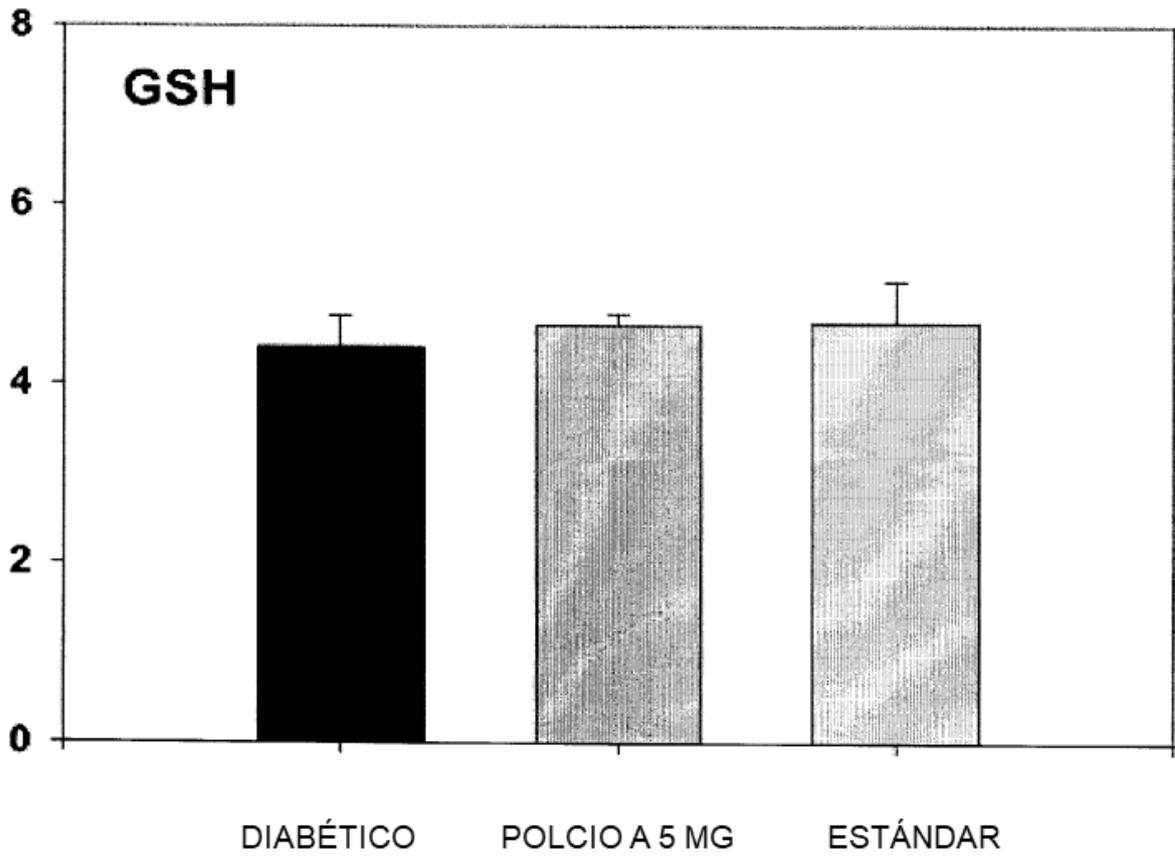


FIGURA 12

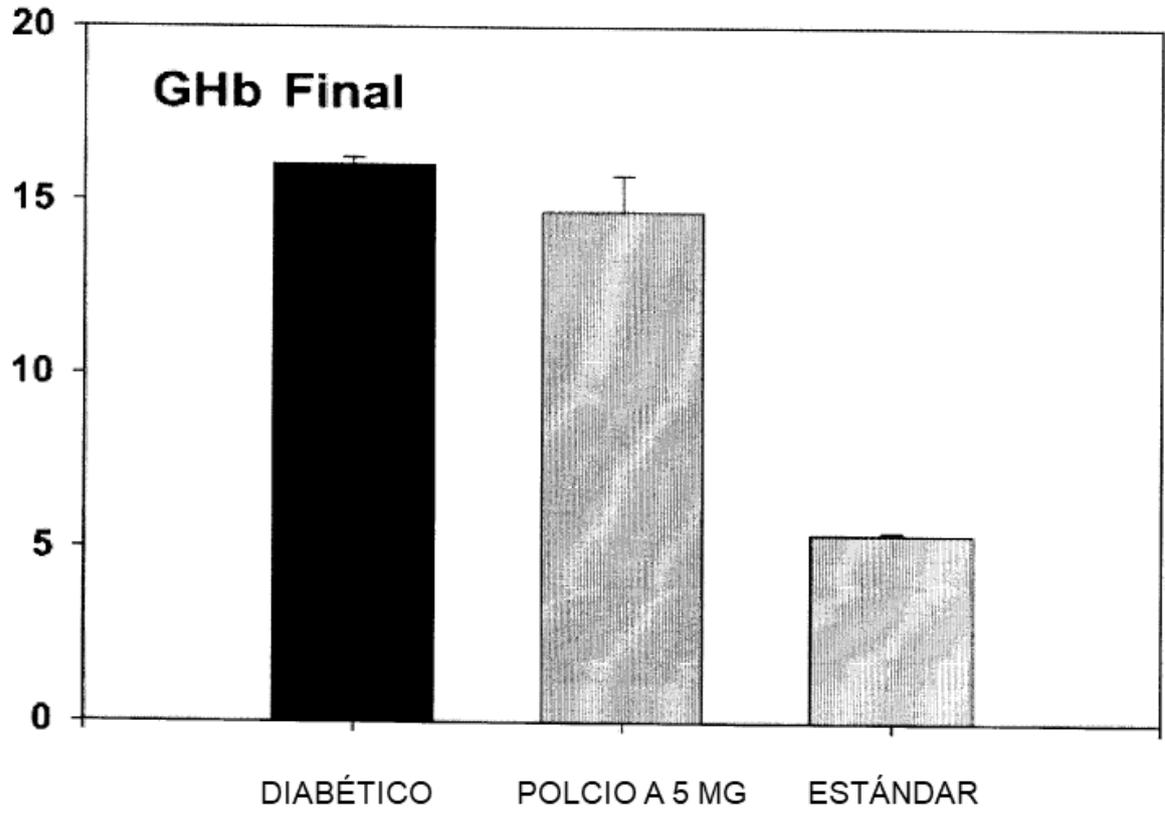


FIGURA 13

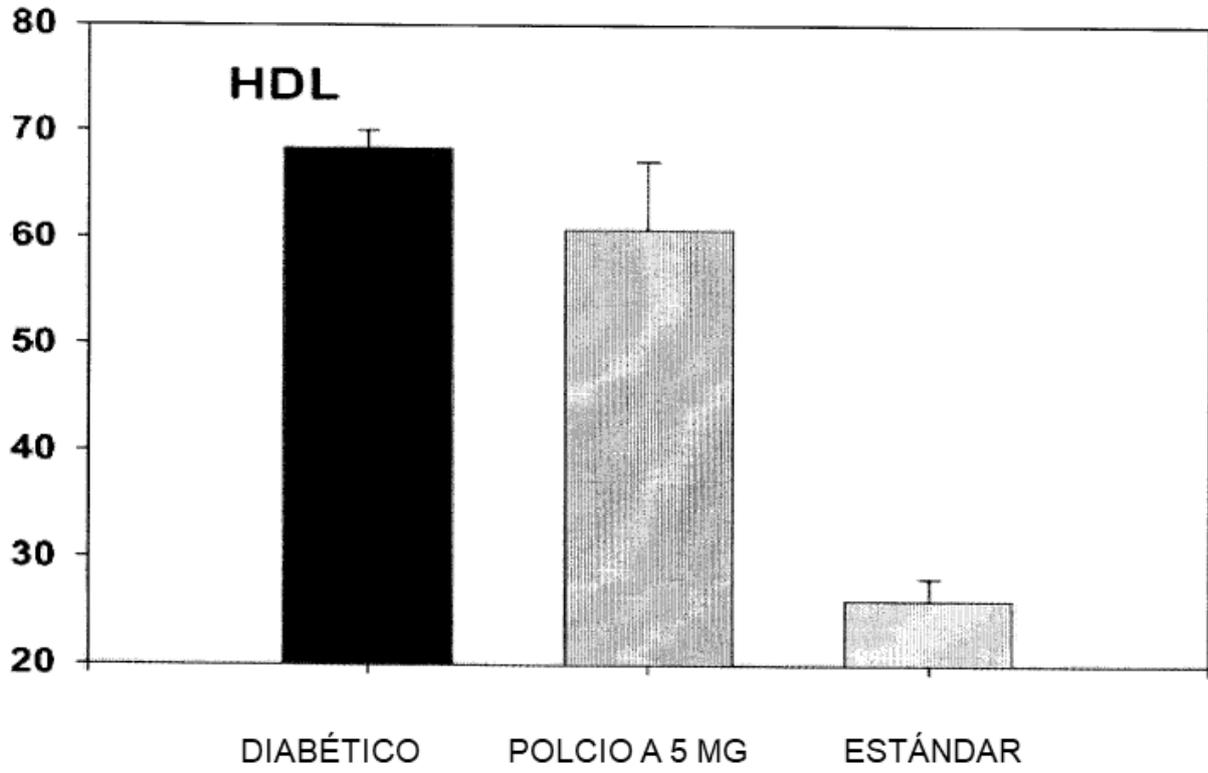


FIGURA 14

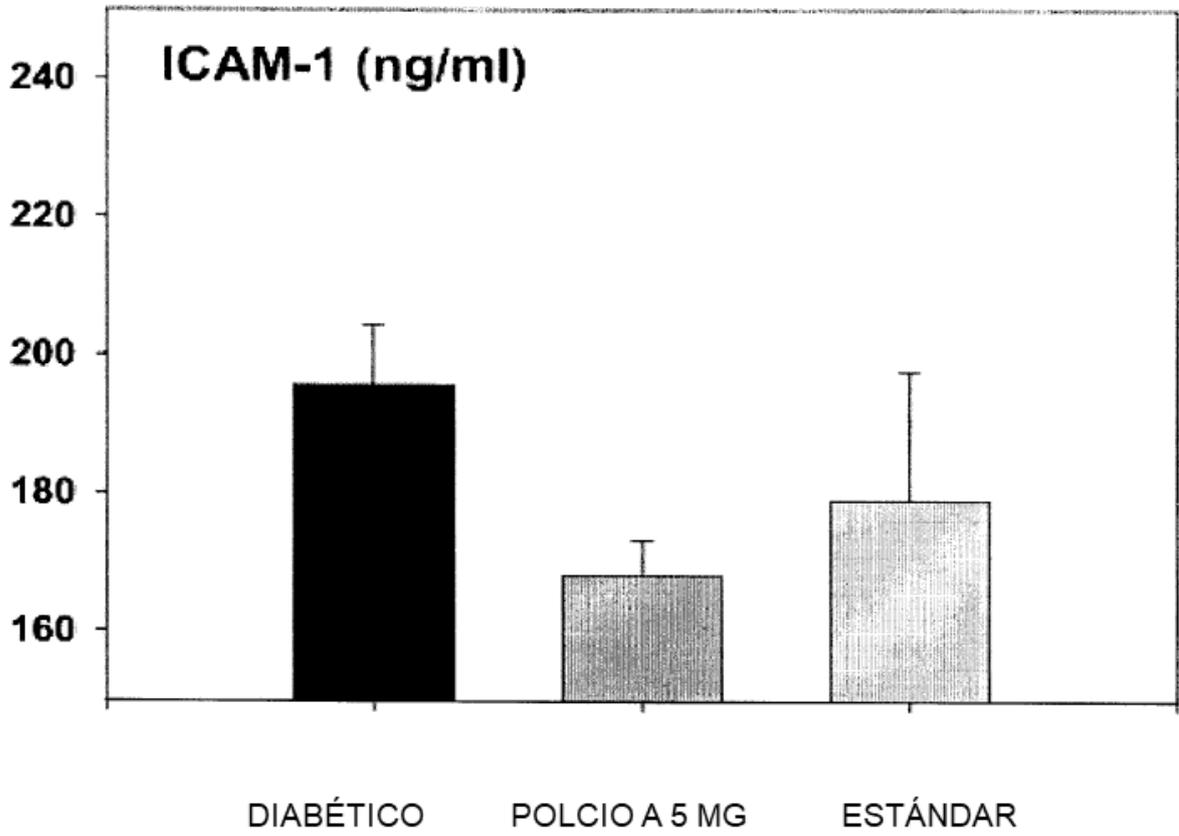


FIGURA 15

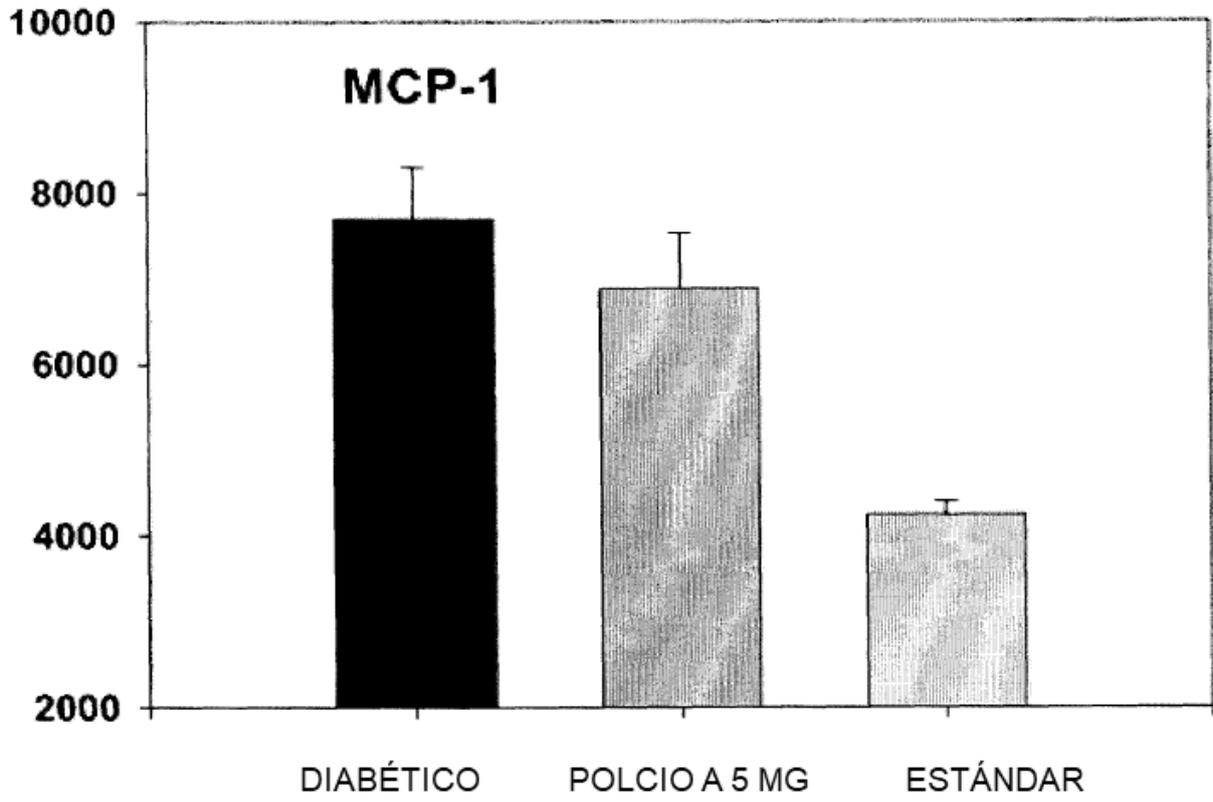


FIGURA 16

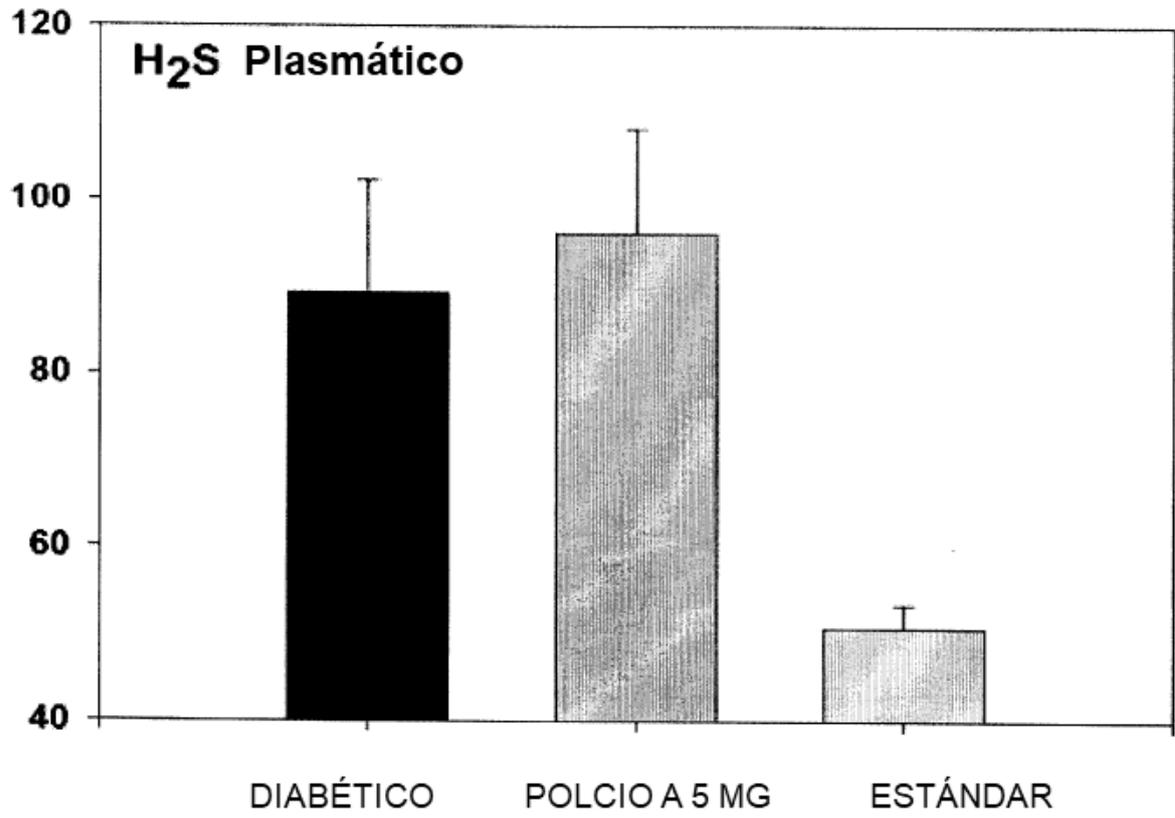


FIGURA 17

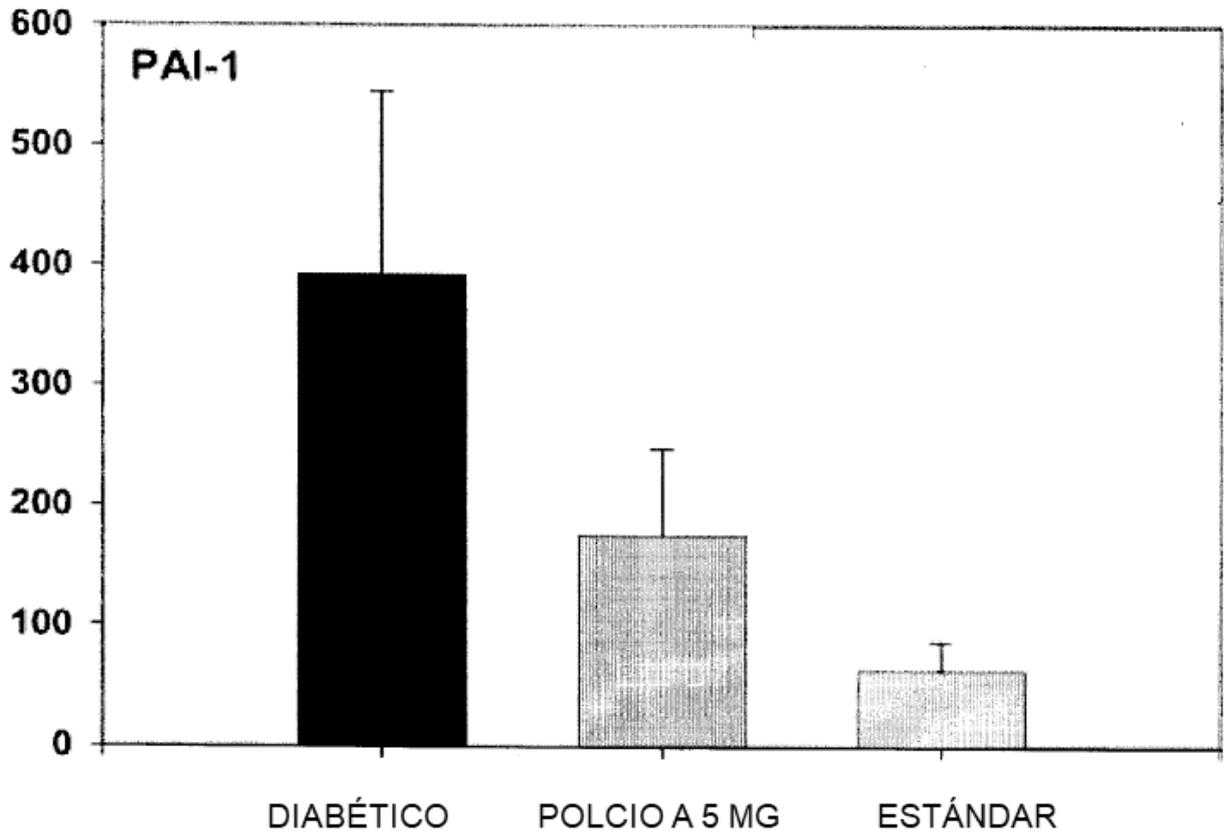


FIGURA 18

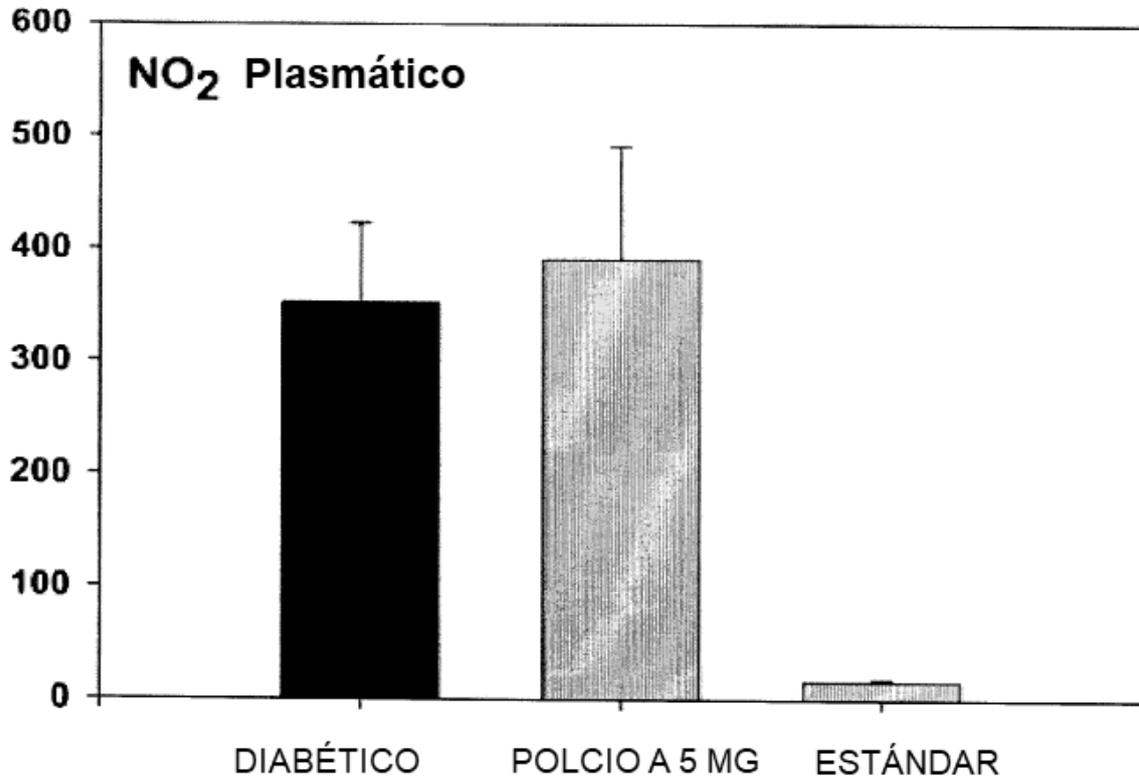


FIGURA 19

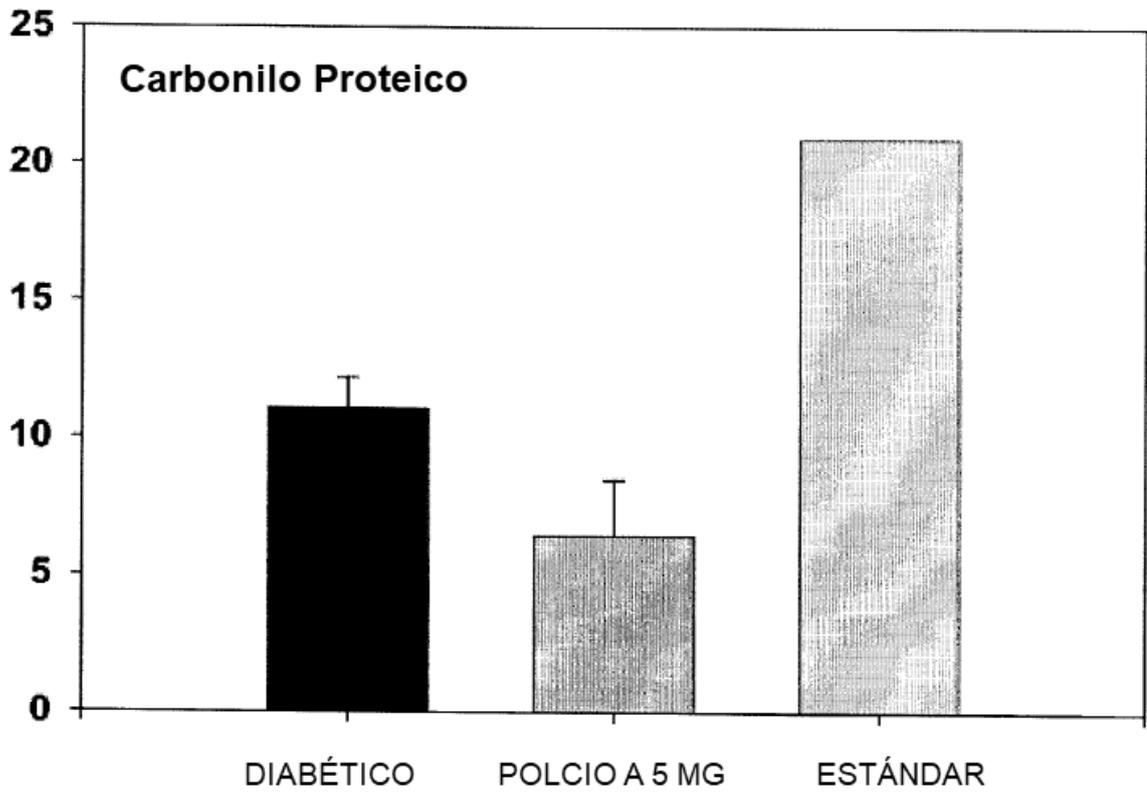


FIGURA 20

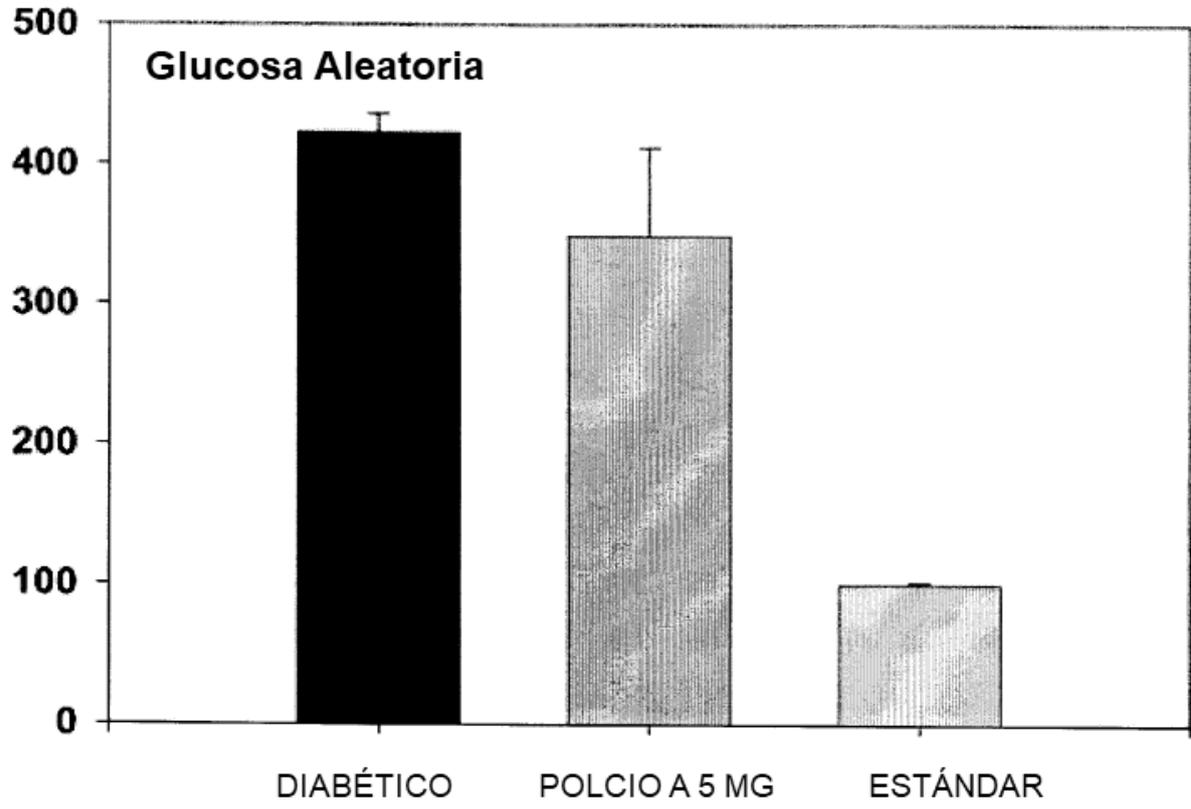


FIGURA 21

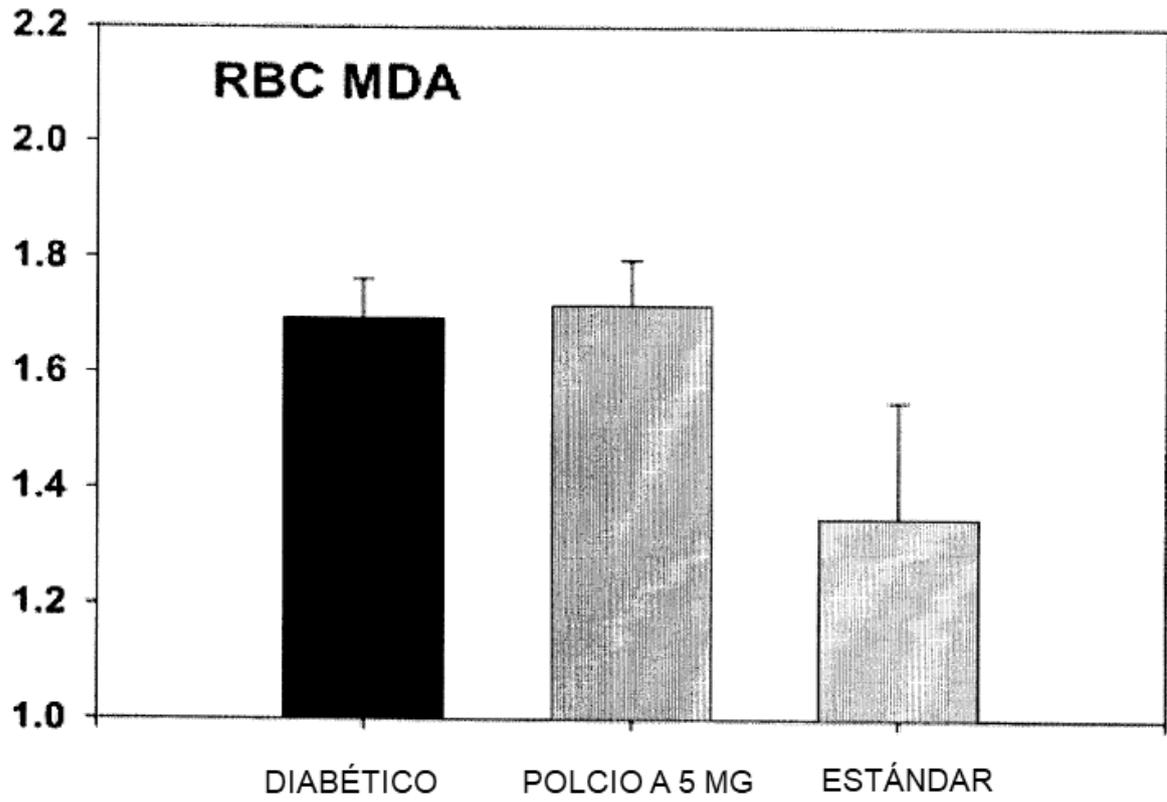


FIGURA 22

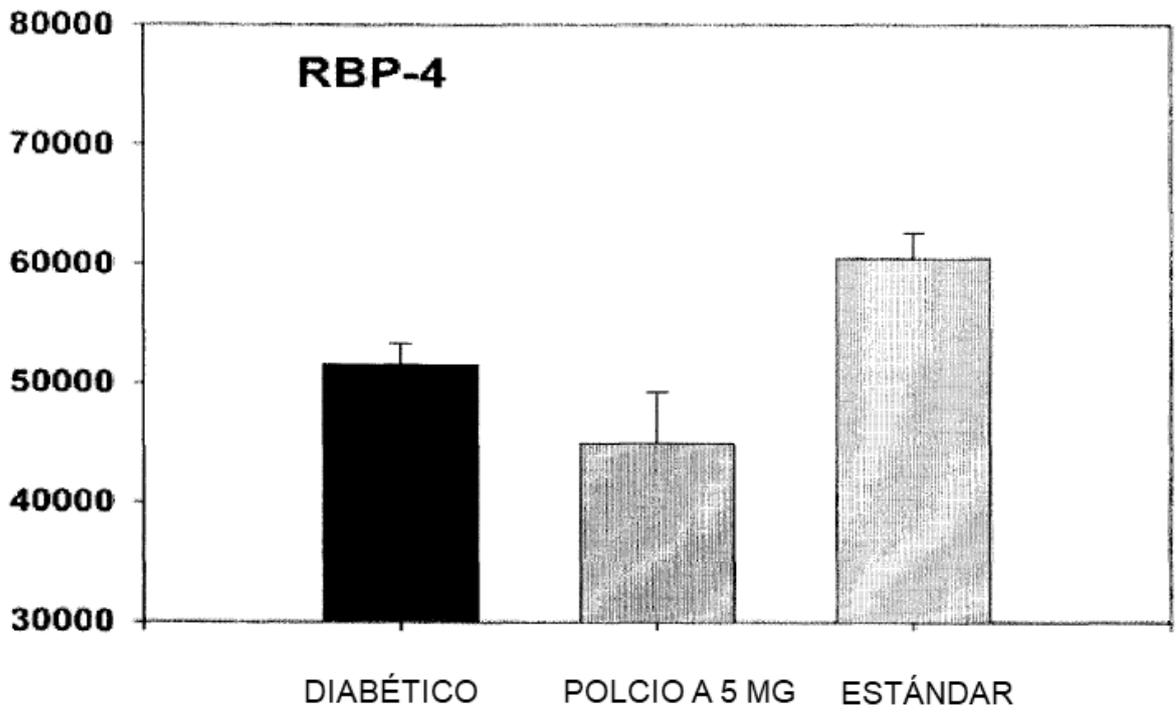


FIGURA 23

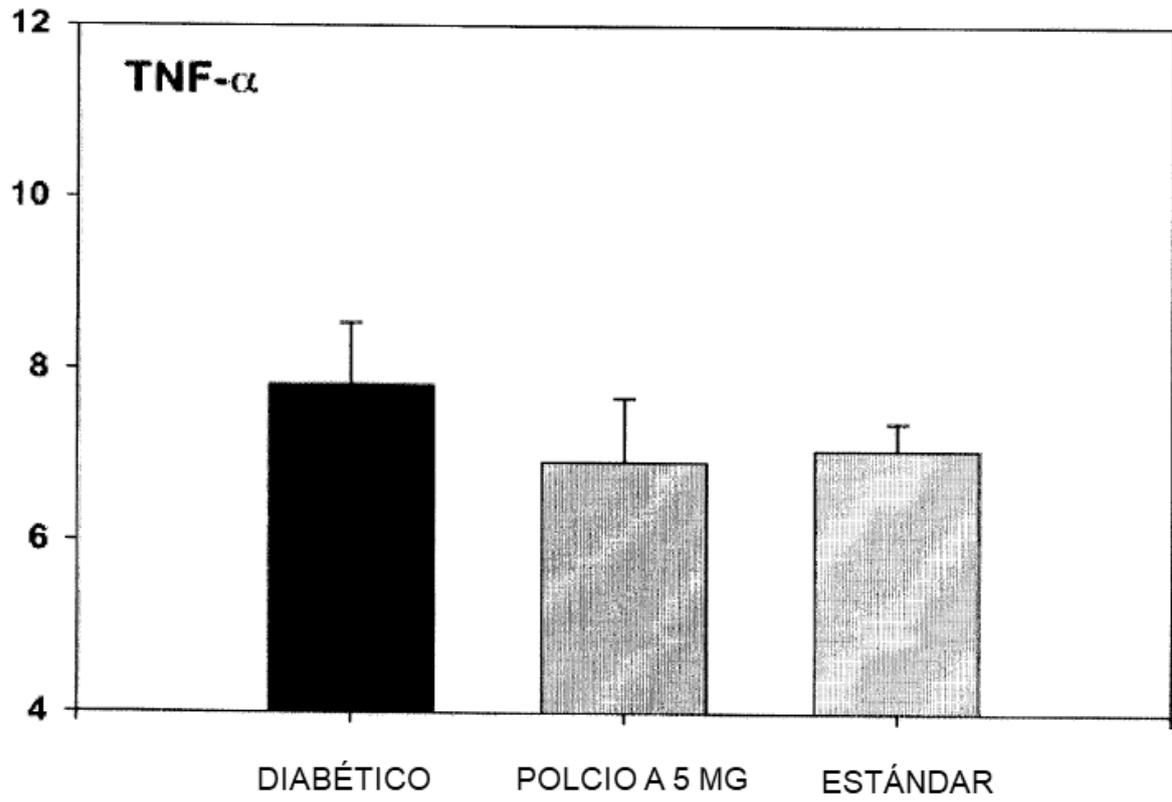


FIGURA 24

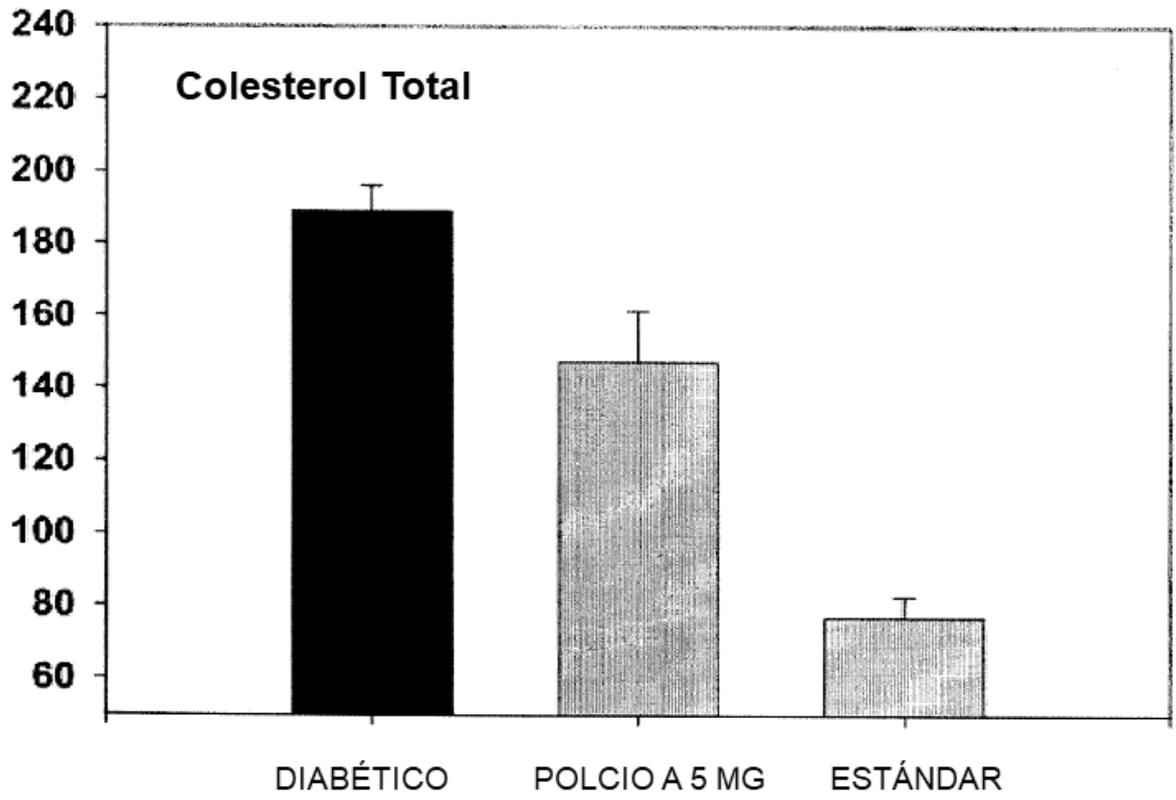


FIGURA 25

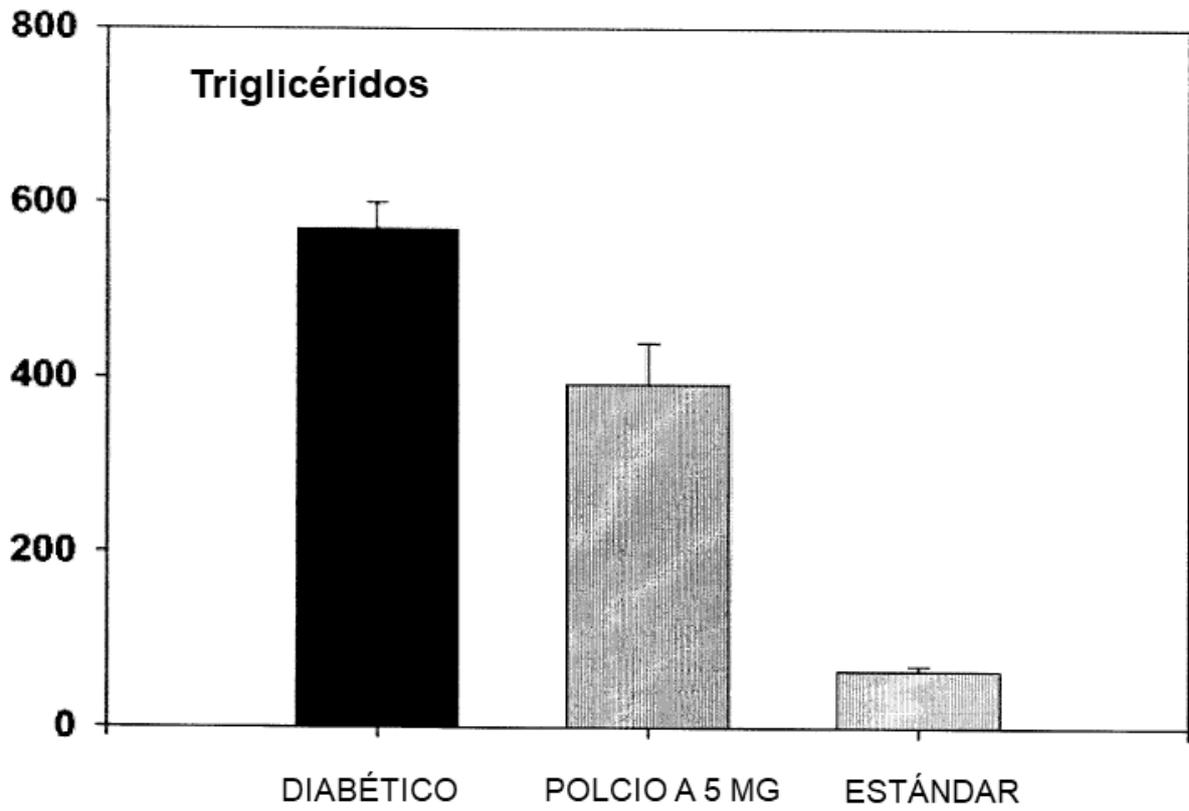


FIGURA 26

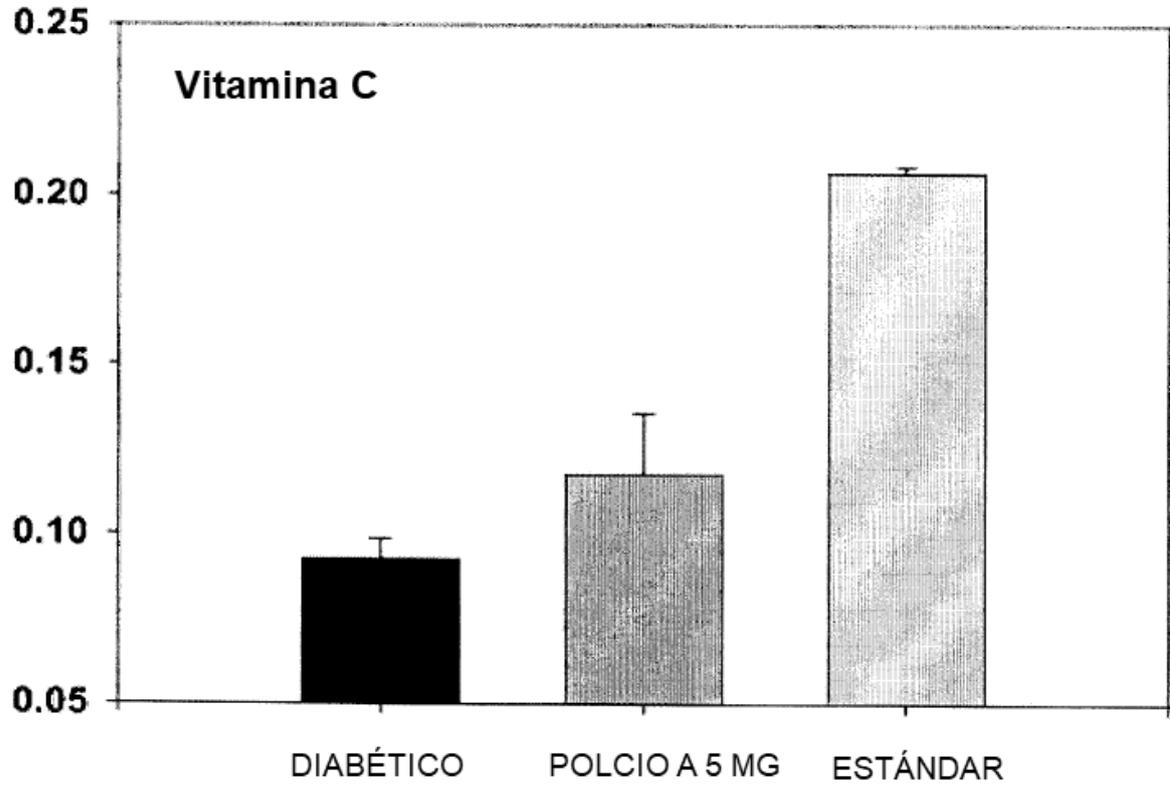


FIGURA 27

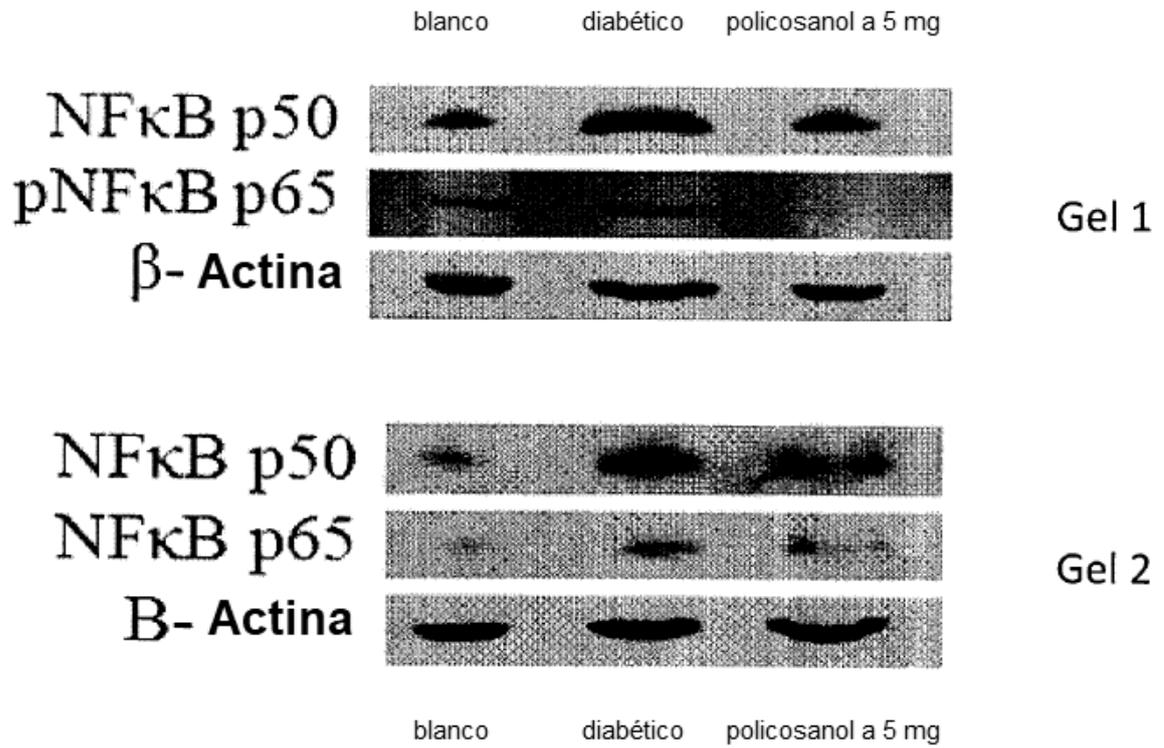


FIGURA 28

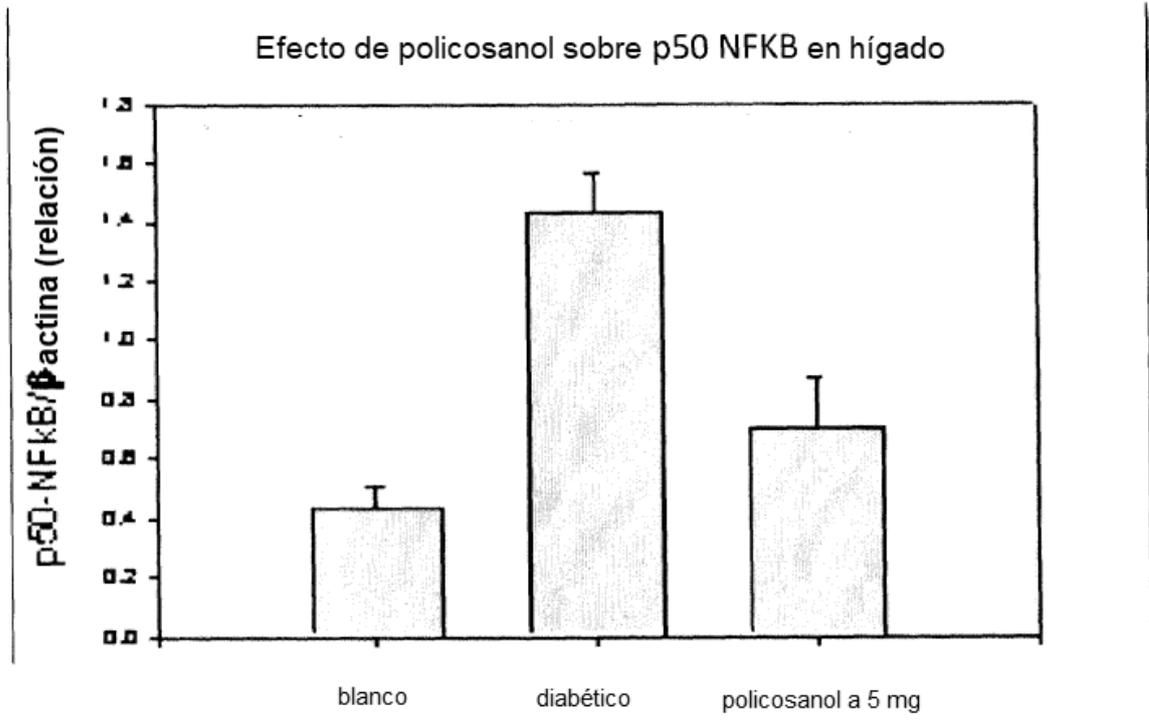


FIGURA 29

