

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 208**

51 Int. Cl.:

A61K 31/66 (2006.01)
A61K 31/685 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61Q 19/06 (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01)
A61K 8/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011 E 11716415 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2563370**

54 Título: **Uso de una composición que contiene fosfolípidos y ácido glicirricínico par eliminar acumulaciones adiposas subcutáneas por medio de lipólisis subcutánea**

30 Prioridad:

29.04.2010 DE 102010028365

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.04.2015

73 Titular/es:

**LICHTBLICK GMBH (100.0%)
Mühlenstrasse 19
48317 Drensteinfurt, DE**

72 Inventor/es:

**GUNDERMANN, KARL-JOSEF y
BRANDL, DIRK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 208 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

Uso de una composición que contiene fosfolípidos y ácido glicirricínico para eliminar acumulaciones adiposas subcutáneas por medio de lipólisis subcutánea

5 La invención se refiere al uso de una composición a base de fosfolípidos y ácido glicirricínico o una sal del ácido glicirricínico y sus formas utilizables en medicina, para el tratamiento de depósitos adiposos bajo la piel de las formas más variadas de aparición tales como, por ejemplo, trastornos de la distribución adiposa, y para el retroceso de panículos adiposos resistentes a las dietas.

Estado de la técnica

10 En la técnica anterior se han usado hasta ahora métodos quirúrgicos para tratar acumulaciones adiposas subcutáneas o proliferaciones de las células adiposas tales como lipomas o lipoedemas. Tales tratamientos dan lugar a complicaciones o riesgos conocidos, causados por la anestesia, reacciones locales y posibles infecciones. En estos casos, a menudo, resulta inevitable el ingreso en un centro clínico. Para evitar tales intervenciones, se buscan alternativas no-quirúrgicas para eliminar los acúmulos adiposos subcutáneos.

15 Se han desarrollado diferentes preparaciones que contienen fosfolípidos que se administran al paciente por vía inyectable. Se conocen preparaciones acuosas que contienen al menos un fosfolípido para diferentes aplicaciones. Estos sistemas se usan, por ejemplo, en cosmética o para la fabricación de productos farmacéuticos. A menudo, estos sistemas forman micelas o liposomas que poseen una fase acuosa en su interior.

20 El documento US 2005/143347 A1 y el correspondiente documento de prioridad DE 10361067 A1 dan a conocer una preparación acuosa que contiene al menos un fosfolípido y/o al menos un ácido biliar, y un componente que favorece la degradación de las grasas tal como riboflavina y agua, que son apropiados para la preparación de medicamentos para eliminar acúmulos adiposos subcutáneos y para el retroceso de los panículos adiposos. Se mencionan preparaciones disponibles en el comercio tales como Essentiale® N.i.V. (*Rote Liste* (Vademécum alemán), marzo 2003) y Lipostabil® N.i.V.

25 Essentiale® N.i.V. se describe en el documento EP 0615746 A1 como una preparación acuosa que contiene fosfolípidos de habas de soja, ácido biliar, riboflavina, alfa-tocoferol, etanol y agua. La composición de estos principios activos se procesa en un sistema de micelas, en el que las micelas tienen un diámetro de 30 nm a 100 nm. En el documento EP 0615746 A1 no se describe el uso de un ácido glicirricínico. Esta preparación se administra por vía intravenosa, para tratar, entre otros, una degeneración adiposa del hígado, consistente en un contenido excesivo en grasa en el parénquima hepático (depósito adiposo en forma de pequeñas gotas).

30 En el documento DE 10361067 A1 se da a conocer la preparación acuosa de la forma galénica de Essentiale® N.i.V. que contiene al menos un fosfolípido y/o al menos un ácido biliar y un componente que favorece la degradación de las grasas, y agua para obtener un medicamento para la eliminación de acúmulos adiposos subcutáneos. Tampoco en este caso se agrega ácido glicirricínico a la preparación.

35 Lipostabil® N.i.V. contiene fosfolípidos de habas de soja, DL-alfa-tocoferol, ácido 7-desoxicólico, alcoholes, otros adyuvantes y agua. Sin embargo, esta composición de principios activos no contiene ácido glicirricínico. Mediante la inyección subcutánea de Lipostabil® N.i.V. se eliminan depósitos adiposos tales como los que aparecen bajo los ojos, en el vientre o en las caderas de personas con sobrepeso.

40 Existen otras preparaciones que se basan en un fosfolípido y que se utilizan para la inyección subcutánea con el fin de provocar una lipólisis de los depósitos adiposos, y que se describen en los documentos WO 2008/113421, DE 102007015701, US 2005/143347 A1 y US 2005/0089555 A1.

45 Inconvenientes derivados del empleo de estas preparaciones según el estado de la técnica para una lipólisis subcutánea son, entre otros, inflamaciones, hematomas (derrames de la sangre), dolores en la zona de tratamiento y malestares tales como sensación de ardor y prurito en el lugar de la inyección después del tratamiento, aunque destaca en particular la lisis celular por daños de la estructura celular y de la integridad de membrana (necrosis celular).

50 Con la finalidad de encontrar composiciones efectivas para la eliminación no quirúrgica de acúmulos adiposos subcutáneos, que estén libres de los citados inconvenientes, se encontró sorprendentemente que la composición que se da a conocer en el documento RU 2133122 C1, dirigida al tratamiento por vía intravenosa y oral de enfermedades hepáticas agudas y crónicas, así como de trastornos del metabolismo de los lípidos en la arteriosclerosis y enfermedades concomitantes, es apropiada para una lipólisis subcutánea, también denominada adipocitolisis.

55 Con el uso según la invención para efectuar una lipólisis subcutánea con esta composición, que contiene al menos un fosfolípido, preferiblemente una fosfatidilcolina, y ácido glicirricínico o una sal del mismo, se reducen y/o se eliminan por completo los inconvenientes anteriormente mencionados de las preparaciones según el estado de la técnica.

5 La ventaja especial del uso según la invención de la composición reivindicada para la lipólisis subcutánea de acúmulos adiposos es la de reducir claramente o evitar por completo los daños de la estructura celular y de la integridad de membrana de las células del tejido adiposo (adipocitos). En el tratamiento según la invención de trastornos del tejido adiposo subcutáneo con la composición reivindicada se reduce notablemente o se evita totalmente la aparición de necrosis.

Por medio del uso según la invención, se produce la degradación de la grasa depositada en el cuerpo y del tejido adiposo tratado por lipólisis, sin que se produzca una destrucción de la membrana celular.

Los efectos adversos observados son claramente menores, hasta una total ausencia de trastornos tales como inflamación, enrojecimiento, ardor, prurito, dolores generales e hipersensibilidad.

10 La composición que se usa según la invención contiene como componentes principales un fosfolípido, ácido glicirricínico o una sal del mismo y, eventualmente, al menos un adyuvante.

15 El ácido glicirricínico, que se puede obtener a partir de un extracto de plantas del género glicirrizia, o palo dulce (por ejemplo, *Glycyrrhiza glabra*), o sus sales, en particular glicirricinato sódico o de amonio, se describe en la técnica anterior como potenciador de la absorción para el transporte de, por ejemplo, hormonas peptídicas a través de la membrana de la mucosa en el documento EP 0327756 A. En el documento US 5238917 A también se describe la potenciación de la absorción de polipéptidos por medio del ácido glicirricínico en preparaciones transvaginales.

Adicionalmente, el ácido glicirricínico es conocido en el estado de la técnica como aditivo bactericida y antiinflamatorio y como emulgente a partir de los documentos US 2004-076652 A, US 2009-169588 A, US 2007-053852 A, WO 08/046791 A, WO 08/046795 A, WO 05/037239 A, EP 1676561 A y JP 2006/137670.

20 La función particular del ácido glicirricínico en el transporte de moléculas a través de la membrana celular refuerza la especial ventaja del rápido efecto del uso según la invención de la composición reivindicada. Por medio del ácido glicirricínico, el fosfolípido puede acceder de manera especialmente apropiada y rápida al interior de las células del tejido adiposo subcutáneo, con lo cual los inconvenientes anteriormente descritos tales como necrosis, se reducen o ni tan siquiera se manifiestan. La combinación con ácido glicirricínico alivia o evita la aparición de inflamaciones, hematomas, dolores y malestares descritos después del tratamiento con un compuesto según el estado de la técnica, en especial los que contienen ácidos biliares o sus sales. Esta tolerancia mejorada está reforzada por el efecto antiinflamatorio y bactericida del ácido glicirricínico.

30 Por lo tanto, la presente invención se caracteriza por que la combinación reivindicada de al menos un fosfolípido, preferiblemente una fosfatidilcolina, y ácido glicirricínico o su sal, en comparación con las composiciones de las preparaciones según el estado de la técnica Essentiale® y Lipostabil®, tiene un efecto perjudicial sobre la célula sustancialmente menor hasta nulo, así como una mejor tolerancia.

Por consiguiente, la invención se refiere al uso de una composición que contiene:

- a) al menos un fosfolípido;
- b) ácido glicirricínico, o
- 35 una sal del ácido glicirricínico y
- c) eventualmente, adyuvantes

en donde

- el contenido total de fosfolípidos y de ácido glicirricínico o sus sales es de 2-80 % en peso, y
- la proporción en peso entre fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 30:1 a 0,5:1,
- 40 para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de enfermedades del tejido adiposo subcutáneo.

La invención se refiere, además, al uso para la degradación y retroceso de tumores del tejido adiposo.

La invención se refiere, además, al uso para el tratamiento de enfermedades del tejido adiposo subcutáneo tales como lipoedemas, lipomas, enfermedad de Dercum, cuello graso de Madelung o lipomatosis de la pared abdominal.

45 Adicionalmente, la invención se refiere al uso no terapéutico de una composición que contiene:

- a) al menos un fosfolípido;
- b) ácido glicirricínico, o
- una sal del ácido glicirricínico y

c) eventualmente, adyuvantes

en donde

- el contenido total de fosfolípidos y de ácido glicirricínico o sus sales es de 2-80 % en peso, y
- la proporción en peso entre fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 30:1 a 0,5:1,

5 para el tratamiento de acúmulos adiposos subcutáneos.

La invención se refiere, además, al uso no terapéutico para la eliminación de acúmulos adiposos subcutáneos, en especial con un trastorno local de la distribución de la grasa.

10 La invención se refiere, además, al uso no terapéutico para el tratamiento de la dermatopaniculosis deformante, pseudoginecomastia, "joroba de búfalo" en pacientes con VIH, celulitis, xantelasmas o depósitos inespecíficos de grasa subcutánea.

La invención se refiere, además, al uso de la composición anterior, que contiene fosfatidilcolina como fosfolípido.

La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición contiene fosfatidilcolina de origen animal o vegetal.

La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición contiene ácido glicirricínico o sales de potasio, sodio, amonio o magnesio del ácido glicirricínico.

15 La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición contiene un azúcar, en particular glucosa y maltosa y/o sus derivados, manita, sorbita o lactosa como coadyuvante.

La invención se refiere, además, al uso, en el que el fosfolípido contiene 15 a 98% en peso, preferiblemente 30 a 98% en peso, más preferiblemente 50 a 98% en peso, de manera especialmente preferida 75 a 98% en peso y, de forma muy especialmente preferida, 75 a 90% en peso de fosfatidilcolina.

20 La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición en forma seca se disuelve en un disolvente apropiado.

La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición se usa en forma seca, preferiblemente como liofilizado obtenido mediante desecación por congelación.

La invención se refiere, además, al uso, en el que la composición se utiliza en forma de solución.

25 La invención se refiere, además, al uso en el que la composición contiene disolventes apropiados para el uso fisiológico que comprenden agua, solución salina fisiológica, glucosa, alcoholes monohidroxilados tales como etanol, 2-propanol, n-propanol, alcoholes polihidroxilados tales como glicerol y/o propanodiol, poliglicoles tales como polietilenglicol y/o miglyol, glicerol formal, dimetilisorbitol, aceites y/o éteres naturales y sintéticos.

30 La invención se refiere, además, al uso, en el que la aplicación de la composición se lleva a cabo por inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa.

La invención se refiere, además, al uso, en el que para la aplicación de la composición se utiliza un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en iontoforesis, electroporación, microporación o sonoforesis.

La aplicación de la preparación según la invención se lleva a cabo en forma de cremas, pomadas, geles, hidrogeles, lociones, pastas, liofilizado y soluciones. Se prefiere la preparación acuosa en forma de diferentes soluciones.

35 A través del empleo según la invención de la composición, es posible eludir los riesgos y efectos adversos mencionados anteriormente de un tratamiento quirúrgico o de un tratamiento subcutáneo con una preparación según el estado de la técnica, en especial aquellas que contienen ácido desoxicólico y sus sales. Adicionalmente, en comparación con el tratamiento quirúrgico, el tratamiento ambulatorio resulta más cómodo y favorable desde el punto de vista económico para el paciente.

40 La alta eficacia terapéutica descrita anteriormente de la composición, que se distingue por la rápida degradación del tejido adiposo, está relacionada con el efecto sinérgico de la interacción de la combinación según la invención, formada por un fosfolípido y/o un ácido glicirricínico o una de sus sales. El uso según la invención de la composición que se reivindica en este documento se distingue por efectos adversos notablemente menores o, en parte, por la ausencia de algunos de los efectos adversos descritos anteriormente.

45 Los trastornos de la distribución adiposa subcutánea son variaciones del tejido adiposo en el cuerpo humano y de mamíferos, que se manifiestan en forma de depósitos de grasa localizados, de origen genético o dependiente de la nutrición, y que se pueden considerar zonas críticas desde el punto de vista estético, particularmente en el vientre, nalgas, caderas, rodillas, pantorrillas, muslos, brazos, barbilla y mejillas. Tales depósitos también pueden ser proliferaciones benignas de las células adiposas tales como lipomas (proliferación distópica).

En el sentido de la invención, por enfermedades del tejido adiposo se entienden, por ejemplo, las siguientes enfermedades: lipomas (tumores de tejido adiposo), que son tumores mesenquimales benignos de crecimiento lento, generalmente esféricos, eventualmente pediculados (lipoma pendular) o incluso de tipo veloso (lipoma arborescente, ejemplo de lipomas de tipo gelatinoso) de células adiposas hipertróficas, preferiblemente en el tejido celular subcutáneo, eventualmente con osificación central (lipoma osificante), mucilaginosos (lipoma mixomatoide) o calcáreos (lipoma petrificante), también con proliferación de tejido conjuntivo y formación de cápsula (lipoma fibroso), con angiogénesis (lipoma telangiectoide), que rara vez se convierte en maligno (lipoma sarcomatoide, liposarcoma). Estos lipomas deben considerarse patológicos, ya que crecen y su envoltura de tejido conjuntivo puede ser dolorosa en sí misma, al igual que la compresión que ejercen sobre los vasos sanguíneos, lo cual puede provocar dolores neuropáticos. Aquí también se incluye la lipomatosis múltiple que provoca una acumulación de lipomas en el paciente.

La enfermedad de Dercum, denominada lipomatosis dolorosa, es una forma especial de proliferación hipertrófica del tejido adiposo que se encuentra entre la fascia adiposa (fascia adiposa de Kampa) y la cara inferior de la dermis. Por efectos de la acción hormonal, estas células adiposas aumentan su capacidad de fijación de agua, lo que a su vez produce congestión de los vasos linfáticos por fenómenos de presión en la zona de los vasos linfáticos primarios en forma de helechos. Esto aumenta los efectos compresivos e irritantes sobre los nervios periféricos sensibles, de manera que estos pacientes presentan una extrema sensibilidad dolorosa al contacto. En el transcurso de varios años y hasta décadas se forman pequeños nódulos de grasa irregulares, localizados, diseminados debajo de la dermis, la cual adelgaza durante el proceso de envejecimiento, que en parte son dolorosos y tienen un aspecto muy antiestético.

El cuello adiposo de Madelung (síndrome de Lanois-Bensaude) es una inflamación del tejido adiposo, causada por la proliferación del mismo, en la que, además de la formación distrófica de un tumor de tejido adiposo, se produce también una densificación del tejido conjuntivo, semejante a una cicatriz en el espacio subcutáneo. En estos casos, los procedimientos quirúrgicos sólo logran un éxito parcial, ya que en este proceso intervienen estructuras anatómicas esenciales y la enfermedad se manifiesta sustancialmente en la zona de la cabeza, el cuello y los hombros.

El lipoedema es una inflamación dolorosa del tejido adiposo que se presenta especialmente en las pantorrillas de las mujeres y que tiene una evolución o carácter progresivo con la edad.

Por lo tanto, por retroceso de la lipólisis se entiende también la separación hidrolítica del tejido adiposo, y el retroceso de la zona adiposa que ha proliferado mediante movilización.

Un xantelasma es una acumulación amarillenta de grasa debajo de los ojos.

Los pacientes con VIH sufren a menudo trastornos de acumulación de tejido adiposo que se producen a raíz de la medicación según el estado de la técnica, por ejemplo, la llamada "joroba de búfalo" o cuello de toro en este grupo de pacientes. En general, en pacientes con un sistema inmunológico debilitado no es recomendable la eliminación quirúrgica, motivo por el que persisten las acumulaciones adiposas y constituyen un estigma exterior para los pacientes.

Las enfermedades del tejido adiposo mencionadas anteriormente, al contrario que la hipertrofia lipídica de origen nutricional (que también tiene como consecuencia el depósito de grasa en el sentido de un trastorno de la distribución de la grasa), muestran estados o situaciones claramente patológicas del tejido, que se distinguen por parámetros histológicos de cicatrización e inflamación, así como por encapsulaciones del tejido conectivo y alteraciones de la propia morfología del tejido adiposo.

Un objeto adicional de la invención es el uso de la composición para fabricar un medicamento para el tratamiento de la celulitis. La celulitis es una forma particular de proliferación hipertrófica de tejido adiposo que se encuentra entre la fascia adiposa dérmica (fascia adiposa de Kampa) y la cara inferior de la dermis. Por efectos hormonales, estas células adiposas aumentan su capacidad de fijación de agua, lo que a su vez produce obstrucción de las vías linfáticas debida a fenómenos de presión en la región de los vasos linfáticos primarios en forma de helechos. En el transcurso de varios años hasta décadas, se forman pequeños nódulos de grasa irregulares, localizados, diseminados bajo la dermis que adelgaza de forma progresiva durante el proceso de envejecimiento, y que en parte son dolorosos y en parte tienen un aspecto antiestético.

Un objeto adicional de la invención es el uso de la composición para fabricar un medicamento para el tratamiento de pseudoginecomastias y la lipomastia. En el hombre, las pseudoginecomastias son acumulaciones adiposas alrededor de la mama que dan lugar a un aumento de su volumen y que provocan un aspecto antiestético. La lipomastia es una forma de pseudoginecomastia sin aumento de tamaño de la glándula mamaria.

Los fosfolípidos que contiene la composición farmacéutica descrita en este documento se obtienen a partir de cualquier sustancia animal o vegetal, en particular huevos de gallina, semillas y frutos oleaginosos tales como cocos secos, semillas de palma, cacahuetes, semillas de colza, semillas de girasol, linaza, aceite de palma y/o de oliva. No obstante, el fosfolípido más adecuado es el que se obtiene de las habas de soja por el procedimiento descrito en las Patentes Europeas EP 0054770 B1 y EP 0054769 B1.

- Este fosfolípido se somete a una purificación intensiva y contiene 15 a 98% en peso, preferiblemente 30 a 98% en peso, más preferiblemente 50 a 98% en peso, de forma especialmente preferida 75 a 98% en peso y, muy preferiblemente 75 a 90% en peso de fosfatidilcolina. Estos fosfolípidos altamente purificados pueden contener otros componente de los fosfolípidos, en especial hasta 15% en peso, más preferiblemente hasta 12% en peso de fosfatidiletanolamina, hasta 8% en peso de ácido fosfatídico, hasta 10% en peso de fosfatidilinositol, hasta 6% en peso de lisofosfatidilcolina o lisofosfatidiletanolamina, indicios de fosfatidilserina, así como otros lípidos en pequeñas cantidades.
- La invención se refiere también al uso del ácido glicirricínico, en donde el ácido glicirricínico puede estar en forma de una sal fisiológicamente aceptable. Como sales del ácido glicirricínico se utilizan sales fisiológicamente aceptables, en especial sales mono-, di- o trisódicas o de potasio, sales de magnesio o amonio. Se prefieren las sales mono-, di- o trisódicas o de potasio y las sales de amonio y, de manera especial, se prefieren las sales mono-, di- o trisódicas o de potasio.
- La proporción en masa de fosfolípido a ácido glicirricínico es de 30:1 a 0,5:1, preferiblemente de 15:1 a 0,5:1, más preferiblemente de 4:1 a 1:1 y, de forma especialmente preferida, de 3:1 a 2:1.
- La concentración de fosfolípido en la composición es de 0,5% en peso a 30% en peso, preferiblemente de 5% en peso a 25% en peso.
- Como contenido total recomendado de fosfolípidos y ácido glicirricínico o una sal del mismo se establece el contenido de 2-80% en peso. Con este contenido, se prefiere una proporción en peso entre fosfolípidos y el ácido glicirricínico o una sal del mismo de 3:1 o 4:1. Con la proporción en peso entre fosfolípidos y el ácido glicirricínico o una sal del mismo de 2:1 a 3:1 es preferible el contenido de 2-45% en peso de fosfolípidos y de ácido glicirricínico o una sal del mismo.
- El valor de pH del medicamento se encuentra en el intervalo de pH 6,0 a pH 9,0, preferiblemente de pH 7,5 a pH 8,5, de forma especialmente preferida de pH 6,5 a pH 7,5 y, en especial, de pH 6,5 a pH 7,0.
- Eventualmente, se agregan adyuvantes apropiados. Se consideran adyuvantes farmacológicamente aceptables el azúcar, en especial maltosa, glucosa, lactosa, sorbita y manita, ácido silícico coloidal, gel de silicio, talco, lactosa, almidón, gelatina, agua, alcoholes con uno o múltiples grupos hidroxilo, en especial etanol, glicerol y propilenglicol, aceites naturales o sintéticos, en especial petróleo, aceite mineral, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo y éteres. Otros adyuvantes apropiados son celulosa, sacarosa, malta, arroz, flúor, calcio, estearato de magnesio, estearato sódico, monoestearato de glicerol, NaCl y leche descremada anhidra. Los adyuvantes preferidos, sobre todo para la lipólisis subcutánea, comprenden agua, alcohol, en particular etanol, solución salina fisiológica, maltosa y dextrosa acuosa.
- La preparación farmacéutica descrita en este documento se puede usar en forma seca o líquida.
- Las formas líquidas comprenden gotas, soluciones, suspensiones, emulsiones, suspensiones inyectables o emulsiones inyectables y sistemas de liposomas-micelas, así como sistemas de liposomas-micelas-agua.
- Se prefieren preparaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, suspensiones inyectables o emulsiones inyectables. De manera especial, se prefieren las suspensiones inyectables o las emulsiones inyectables.
- Para las inyecciones se pueden utilizar fácilmente, sobre todo preparaciones líquidas tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, suspensiones inyectables o emulsiones inyectables que contienen los principios activos y adyuvantes citados anteriormente, o sustancias secas que tras la adición de agua, otro disolvente o una solución tamponante apropiada tal como un tampón Tris, se licúan inmediatamente. Se prefiere un usar un liofilizado como base para obtener una preparación líquida.
- Cuando se emplean las preparaciones farmacéuticas descritas en este documento en forma de inyección, es recomendable usar un disolvente apropiado que no presente efectos adversos no deseados, por ejemplo, agua, solución salina fisiológica, glucosa, alcoholes monohidroxilados tales como etanol, 2-propanol, n-propanol, alcoholes polihidroxilados tales como glicerol y/o propanodiol, poliglicoles tales como polietilenglicol y/o miglyol, glicerol formal, dimetilisorbitol, aceites naturales y sintéticos y/o éteres, ya sean solos o mezclados, siendo recomendable para inyecciones el uso de sistemas de liposomas-micelas.
- Los volúmenes residuales de alcoholes después de concentrar deberán ser de 0% en volumen (% vol.) a 20% vol., preferiblemente de 0% vol. a 10 % vol.
- La forma de aplicación más apropiada de la preparación descrita en este documento es una mezcla de principios activos que contiene un fosfolípido y el ácido glicirricínico o una sal del mismo, en forma de un sistema de liposomas-micelas-agua. Un sistema de liposomas-micelas-agua de este tipo, que está destinado a ser inyectado, tiene preferiblemente un valor de pH de 6,0 a 7,5.

La forma seca de la preparación farmacéutica descrita en este documento comprende un liofilizado, comprimidos, en particular comprimidos recubiertos con película, y píldoras, polvo, cápsulas, granulados y grageas. Se prefiere un liofilizado.

5 Si la composición se prepara en forma de liofilizado, con la adición de agua o tampón tris se forma un sistema de agua-liposomas que se puede usar para la inyección.

El sistema de agua-liposomas también puede ser sometido a filtración estéril y contiene una elevada concentración de liposomas y micelas, con un tamaño de partículas relativamente pequeño de 30 nm a 180 nm, preferiblemente de 30 a 130 nm y, de forma especialmente preferida, de 30 a 90 nm. Estos liposomas se pueden filtrar de forma estéril usando un filtro con un diámetro de poro de 0,2 µm.

10 La preparación descrita en este documento, fabricada en forma de solución acuosa, adopta preferiblemente la forma de un sistema de liposomas-micelas que es altamente transparente, posee un periodo de conservación muy prolongado y se puede someter a filtración estéril. El sistema se puede secar, por ejemplo por liofilización, con lo cual se forma una mezcla liofilizada estable.

15 Si la preparación farmacéutica descrita en este documento se usa como solución inyectable, se recomienda de manera especial el uso de una combinación de principios activos que contiene fosfolípidos y la sal trisódica del ácido glicirricínico, en donde la proporción en peso entre la fosfatidilcolina y la sal trisódica del ácido glicirricínico es de 1:1 a 4:1 y, preferiblemente, de 2:1 a 3:1.

20 La fabricación de las preparaciones según la invención se lleva a cabo, por ejemplo, disolviendo o dispersando en un disolvente apropiado al menos un fosfolípido y al menos un ácido glicirricínico en la proporción mencionada anteriormente. Seguidamente, esta solución o dispersión se concentra y, a continuación, se agrega agua.

En las solicitudes de Patente Europea EP 0470437 A o EP 0615746 A se describen también procedimientos para la fabricación de las preparaciones.

25 A las preparaciones usadas según la invención se pueden agregar, eventualmente, también agentes antioxidantes tales como ácido ascórbico, hidrógenosulfito sódico o pirosulfito sódico, alfa-tocoferol, agentes conservantes tales como alcohol bencílico o p-hidroxibenzoatos, o ayudas para la suspensión tales como carboximetilcelulosa sódica.

30 Las preparaciones también pueden contener, eventualmente, estructuras coloidales tales como micelas o micelas mixtas. Estas estructuras tienen un diámetro de partícula de 10 a 500 Angström. Consisten en ácido glicirricínico y fosfolípido. La proporción en masa de ácido glicirricínico a fosfolípido es de 0,1:2 a 2:1% en peso, preferiblemente de 1:2. En las estructuras coloidales del medicamento, la concentración de fosfolípido es de 5% en peso a 15% en peso, preferiblemente de 10% en peso. La preparación de las estructuras coloidales se lleva a cabo, por ejemplo, disolviendo el ácido glicirricínico en agua, con lo cual se alcaliniza algo la solución. En esta solución se dispersa entonces el fosfolípido. Finalmente se filtra.

La aplicación de las preparaciones usadas según la invención y de los medicamentos comparables se realiza por inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa. Se prefiere la inyección subcutánea.

35 Adicionalmente, se reivindica la aplicación percutánea en diferentes vehículos y usando diferentes adyuvantes, por ejemplo, iontoforesis.

En determinadas aplicaciones, la incorporación uniforme de las preparaciones y las formas medicamentosas usadas según la invención también se puede llevar a cabo por medio de un procedimiento de tumescencia, que aprovecha la presión hidrostática para garantizar una distribución uniforme.

40 Además, es posible la aplicación percutánea que se puede llevar a cabo con diferentes vehículos tales como cremas, pomadas, geles, hidrogeles, lociones o pastas, y empleando diferentes procedimientos coadyuvantes, en particular iontoforesis, microporación, electroporación o sonoforesis.

45 Preparaciones y formas medicamentosas apropiadas son, por ejemplo, suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables, así como preparaciones de liberación retardada de la sustancia activa, en cuya fabricación se usan adyuvantes habituales. Las preparaciones también pueden estar en forma de concentrados, sustancias desecadas o liofilizados para aumentar, por ejemplo, su estabilidad.

50 Preferiblemente, las preparaciones farmacéuticas se fabrican y administran en unidades de dosificación en las que cada unidad contiene como componente activo una dosis determinada de la preparación. En el caso de soluciones inyectables en forma de ampollas, esta dosis puede ser por ml de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 2000 mg, preferiblemente de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 2000 mg, preferiblemente de aproximadamente 250 mg a 500 mg, referido al fosfolípido.

Para el tratamiento de un paciente adulto, en función del tamaño del tejido adiposo a tratar y utilizando soluciones inyectables, se requieren dosis diarias de 5 mg a 2500 mg, preferiblemente de 250 mg a 2500 mg por inyección, con un máximo de 200 inyecciones, con referencia al fosfolípido. Las soluciones inyectables también se pueden diluir

- antes de su aplicación, preferiblemente con solución salina fisiológica. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, también se pueden aplicar dosis diarias mayores o menores. La dosis también depende del tamaño del acúmulo adiposo: para lipomas pequeños, son suficientes cantidades de 125 mg a 500 mg, preferiblemente de 250 mg a 500 mg por lipoma, referidos al fosfolípido. La administración de las dosis diarias se puede realizar tanto de una sola vez, en forma de una única unidad de dosificación, o con múltiples unidades de dosificación más pequeñas, como por administración múltiple de dosis fraccionadas a intervalos determinados.

A continuación, la invención se explica de forma más detallada mediante ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una solución inyectable para uso subcutáneo

- 10 Una solución de:

0,2 g (8%) de sal trisódica del ácido glicirricínico,

1,8 g (72%) de maltosa y

4,5 ml de agua

se mezcló de forma intensiva con una dispersión de:

- 15 0,5 g (20%) de fosfolípido de soja y

0,5 ml (20%) de etanol al 96%

bajo atmósfera de gas inerte.

El contenido total de fosfolípido y sal de ácido glicirricínico fue de 28%. La proporción entre el fosfolípido y la sal del ácido glicirricínico fue de 2,5:1.

- 20 La emulsión se dispersó con ultrasonidos (desintegrador MSE Souiprep 150, Inglaterra) a 4°C durante 30 segundos con una interrupción de un minuto. Después de aproximadamente 10 minutos se formó una suspensión de liposomas.

La suspensión de liposomas se filtró con un filtro de 0,2 µm y a continuación se liofilizó.

- 25 La suspensión de liposomas (5,0 ml) se secó por congelación (liofilización) en un plazo de 5 horas. De este modo se formaron aproximadamente 2,5 g de un polvo suelto, ligeramente amarillento.

Para una solución inyectable subcutánea, se disolvieron 2,5 g de la preparación envasada en ampollas en 9,0 ml de disolvente (agua o tampón tris).

Ejemplo 2: Preparación de un sistema de liposomas-agua para uso subcutáneo

- 30 Se preparó una solución de 50 g de fosfolípido de soja purificado (82,5% en peso de fosfolípido + 3,5% en peso de fosfatidilcolina, hasta 10% en peso de fosfatidiletanolamina, 0,6% en peso de lisofosfatidilcolina y un máximo de 20% en peso de otros lípidos) y 0,25 g de sal sódica de fosfatidilglicerol en 250 ml de etanol. La solución preparada se redujo al vacío.

- 35 La mezcla de fosfolípidos obtenida (aproximadamente 20%) se dispersó en una corriente de gas inerte, después de mezclarla con 500 ml agua que ya contenía 20,0 g (7,99 %) de sal trisódica de ácido glicirricínico y 180,0 g (71,92 %) de isomaltosa,.

El contenido total del fosfolípido y de la sal del ácido glicirricínico fue de 28,07%. La proporción entre el fosfolípido y la sal de ácido glicirricínico fue de 2,5:1.

- 40 Esta dispersión se sometió cinco veces a una homogeneización de alta presión a 600 bar. El sistema de liposomas obtenido se filtró con un filtro de 0,2 µm y se envasó en ampollas de 10,0 ml bajo atmósfera de gas inerte. La preparación tuvo las siguientes propiedades:

Aspecto: líquido transparente, ligeramente opalescente;

Valor de pH: 6,5;

Coefficiente de transparencia (600 nm): 85%;

Tamaño promedio de las partículas (dispersión láser): 75 nm;

- 45 Esterilidad: según especificaciones;

Propiedades microscópicas (criofijación): 30-90 nm, liposomas unilaminares en su mayoría, liposomas bilaminares aislados;

La transparencia de la preparación envasada en ampollas se examinó después de 2, 6, 9 y 12 meses de almacenamiento. No se registraron diferencias con respecto a la transparencia original de la preparación 1.

5 Ejemplo 3: Análisis de un efecto perjudicial de la fosfatidilcolina sobre la membrana de células 3T3-L1

Para estudiar *in vitro* los efectos de la fosfatidilcolina sobre la integridad y estabilidad de la membrana, se incubaron células 3T3-L1 diferenciadas con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina durante 4 y 24 horas y, a continuación, se analizaron a microscopía óptica.

10 Para los ensayos, se utilizó como sistema modelo la línea de células 3T3-L1 de preadipocitos de ratón. La adipogénesis se estimuló en las células 3T3-L1 mediante una combinación conocida de hormonas (corticosterona, isobutilmetilxantina, indometacina, insulina) y la diferenciación continuó durante 8 días hasta la obtención de adipocitos maduros.

Los adipocitos maduros de las células 3T3-L1 se trataron con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina.

15 En primer lugar, se preparó una solución madre de fosfatidilcolina: 500 mg/ml de fosfatidilcolina disueltos en etanol al 70%.

Las concentraciones de fosfatidilcolina usadas fueron: 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml.

20 En la Figura 1a se muestran fotografías de microscopía óptica de las células 3T3-L1 después de 24 horas de tratamiento con 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml y 20 mg/ml de fosfatidilcolina, y en la Figura 1b se observan las fotografías detalladas del microscopio confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés) con una ampliación de 63 veces de las células 3T3-L1 tratadas con fosfatidilcolina. La Figura 1c muestra células 3T3-L1 teñidas con yoduro de propidio (PI), después del tratamiento con fosfatidilcolina.

Figura 1a: Fotografía de contraste de fases de células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas en cultivo celular 2D. El tratamiento se realizó de la forma siguiente:

- (a) Control = células sin tratamiento en medio de diferenciación
- 25 (b) 1 mg/ml de fosfatidilcolina después de 24 horas
- (c) 5 mg/ml de fosfatidilcolina después de 24 horas
- (d) 10 mg/ml de fosfatidilcolina después de 24 horas
- (e) 15 mg/ml de fosfatidilcolina después de 24 horas
- (f) 20 mg/ml de fosfatidilcolina después de 24 horas

30 (Escala = 100 μ m)

Figura 1b: Fotografía de contraste de fases con un CLSM con ampliación de 63 veces de células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas en cultivo celular 2D. El tratamiento se realizó de la forma siguiente:

- (a) Control = células sin tratamiento en medio de diferenciación después de 4 h
- (b) 1 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas
- 35 (c) 5 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas
- (d) 10 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas

Escala = 20 μ m

40 Figura 1c: Fotografía de contraste de fases (PK) con un CLSM con ampliación de 63 veces de células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas en cultivo celular 2D después de la tinción con PI. El tratamiento se realizó de la forma siguiente:

- (a) Control = células no tratadas, en etanol
- (b) Control positivo = células no tratadas, en medio de diferenciación + Tritón al 1%
- (c) 5 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas
- (d) 10 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas

(e) 15 mg/ml de fosfatidilcolina después de 4 horas

Después del periodo de incubación (4 horas), los adipocitos se tiñeron con 5 µg/ml de PI y se analizaron con un microscopio CLSM. En las filas superiores de PI (a-e) se muestran las fotografías de fluorescencia de las células teñidas con PI. En la fila PK inferior (a-e) se superponen las correspondientes fotografías de contraste de fases a las fotografías de fluorescencia (escala = 20 µm).

Las células tratadas con fosfatidilcolina (Fig. 1a y 1b) no muestran diferencias morfológicas con respecto a los controles no tratados. Por consiguiente, la fosfatidilcolina no produce efectos perjudiciales sobre la célula. Concentraciones comparables (20 mg/ml) de desoxicolato de Na provocaron una clara destrucción de la membrana celular, lo cual no se observó con las concentraciones de fosfatidilcolina utilizadas.

La ausencia de efecto perjudicial sobre la célula de fosfatidilcolina se confirmó por la tinción de PI de las células tratadas.

Para ello, se trataron células 3T3-L1 diferenciadas con 5 mg/ml, 10 mg/ml y 15 mg/ml de fosfatidilcolina durante 4 horas. Acto seguido, se agregaron al medio 5 µg/ml de PI durante 5 min y las células se analizaron al microscopio CLSM (Fig. 1c).

A los controles (Fig. 1c (a)) se agregó etanol, de manera que se obtuvo la misma concentración que en las soluciones para el tratamiento de las células. La Fig. 1c (a) muestra que ninguna célula se tiñó con PI. De aquí se deduce que el etanol, a las concentraciones usadas, carece de efecto perjudicial sobre la célula.

En la Fig. 1c (b), los controles positivos con Tritón al 1% muestran numerosas células teñidas de rojo con PI. Esto evidencia un daño de la membrana celular. En este caso, existe daño para la estabilidad e integridad de la membrana de las células.

En comparación con esto, entre las células tratadas (Fig. 1c (c) hasta (e)) no se detectan células teñidas de rojo. Por lo tanto, estas células no exhiben ningún daño de la estabilidad e integridad de la membrana. En consecuencia, fosfatidilcolina carece de cualquier efecto perjudicial sobre células 3T3-L1 diferenciadas.

Este resultado se correlaciona bien con el análisis por microscopía óptica (véanse las Figs. 1a y 1b), en las que tampoco se observó un efecto perjudicial de fosfatidilcolina sobre la célula.

Ejemplo 4: Obtención de “Células Madre Derivadas del Tejido Adiposo” (ADSC) a partir del tejido adiposo subcutáneo humano

Para aproximarse al uso clínico, en ensayos posteriores se usó otro sistema modelo con células madres mesenquimales humanas.

El tejido adiposo subcutáneo humano puede servir de fuente potencial de células madre adultas. Estas denominadas “Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo” (*Adipose-Derived Stem Cells*) (ADSC) son pluripotentes y por medio de los estímulos correspondientes pueden diferenciarse en diferentes tipos de células, por ejemplo, osteoblastos, condrocitos, adipocitos. En la Figura 2 se muestra esquemáticamente el aislamiento de células ADSC a partir de tejido adiposo subcutáneo humano obtenido durante las intervenciones de cirugía plástica de reducción.

En primer lugar, se lavó la grasa con solución tamponante para separar las células hematopoyéticas y, a continuación, se trituró. Los trozos de tejido adiposo que se forman se digirieron con colagenasa. Por centrifugación del tejido digerido, se separó la fracción del estroma vascular y se descartaron los adipocitos maduros flotantes. La fracción del estroma vascular granulada se compone de una población celular heterogénea de células sanguíneas, fibroblastos, pericitos, células endoteliales y preadipocitos.

Esta población celular se transfirió a un frasco de cultivo con medio, al que se adhiere una parte de las células. Por la adición de una combinación adecuada, compuesta por insulina, dexametasona, indometacina e isobutilmetilxantina, o compuesta por insulina, cortisol, troglitazona, triyodotironina e isobutilmetilxantina, se estimuló la adipogénesis de las células y se logró una mejor diferenciación adipogénica.

Ejemplo 5: Estudio de un efecto perjudicial para la membrana de fosfatidilcolina y desoxicolato de Na sobre las células ADSC

Desoxicolato de Na (Na-DC)

Por medio de una combinación de hormonas (insulina, cortisol, troglitazona, triyodotironina e isobutilmetilxantina) se estimuló la adipogénesis de las células ADSC del Ejemplo 4 y, seguidamente, continuó su diferenciación hasta adipocitos maduros durante 21 días adicionales.

A continuación, tuvo lugar el tratamiento con desoxicolato de Na. Se utilizaron para el mismo las siguientes concentraciones:

0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml.

Como controles se usaron células ADSC no tratadas.

5 El periodo de incubación fue de 4 horas.

Este intervalo de concentraciones ha demostrado ya ser eficaz en las células 3T3-L1. Después del periodo de incubación de 4 horas, las células diferenciadas y tratadas se examinaron inicialmente al microscopio óptico (Fig. 3a).

10 Adicionalmente, las células ADSC tratadas con desoxicolato de Na se examinaron bajo CLSM. Los adipocitos maduros diferenciados se trataron con:

0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0,1 mg/ml de desoxicolato de Na durante 4 horas.

Como controles se usaron células ADSC no tratadas.

A continuación, se llevó a cabo el análisis microscópico en el CLSM con una ampliación de 63 veces (Fig. 3b).

15 Un análisis subsiguiente de un efecto perjudicial para la célula del desoxicolato de Na sobre las células ADSC se efectuó por medio de la tinción con PI de las células tratadas y posterior análisis por CLSM. Los adipocitos maduros diferenciados se trataron durante 4 horas con: 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml de desoxicolato de Na.

Como controles se usaron célula ADSC no tratadas.

A continuación, las células se incubaron en un medio con 5 µg/ml de yoduro de propidio durante 5 min. Seguidamente, se realizó el análisis microscópico en el CLSM con una ampliación de 63 veces (Fig. 3c).

20 Fig. 3a: Fotografías bajo microscopia óptica de células ADSC diferenciadas, después del tratamiento con diferentes concentraciones de desoxicolato de Na (Na-DC) en cultivo celular 2D. El tratamiento fue el siguiente:

(a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas;

(b) 0,01 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(c) 0,05 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

25 (d) 0,075 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(e) 0,1 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(f) 0,5 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

Las flechas negras indican las células con la membrana dañada o los fragmentos celulares. Las flechas blancas señalan las gotas lipídicas libres. (Escala = 100 µm).

30 Fig. 3b: Fotografías bajo CLSM de células ADSC diferenciadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de desoxicolato de Na (Na-DC) en cultivo celular 2D. El tratamiento fue el siguiente:

(a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas;

(b) 0,01 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(c) 0,05 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

35 (d) 0,1 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

Las flechas negras indican las células con la membrana dañada o los fragmentos celulares. Las flechas blancas señalan las gotas lipídicas libres. (Escala = 20 µm).

40 Fig. 3c: Fotografías de microscopia confocal por barrido láser de células ADSC diferenciadas, después del tratamiento con diferentes concentraciones de desoxicolato de Na (Na-DC) en cultivo celular 2D. El tratamiento fue el siguiente:

(a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas;

(b) Control positivo = células no tratadas en medio de diferenciación + Tritón al 1%;

(c) 0,05 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(d) 0,1 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

(e) 0,5 mg/ml de Na-DC después de 4 horas;

5 Después del periodo de incubación (4 horas), los adipocitos se tiñeron con 5 µg/ml de PI y se analizaron bajo el CLSM. En la fila superior de PI (a-e) se muestran las fotografías de fluorescencia de las células teñidas con PI. En la fila inferior PK (a-e) se muestran las correspondientes fotografías de contraste de fases superpuestas sobre las fotografías de fluorescencia. (Escala = 20 µm).

10 La concentración muy baja de desoxicolato de Na de 0,01 mg/ml no tuvo ningún efecto sobre las células (Fig. 3a (b)). No se detectó ninguna diferencia con respecto al grupo de control (Fig. 3a (a)). Los adipocitos aparecieron vitales y con una membrana celular intacta. Un aumento de la concentración a partir de 0,05 mg/ml produjo ya ligeras alteraciones de la membrana celular (Fig. 3a (c)). Esto se incrementó con las siguientes concentraciones mayores (Fig. 3a (d, e)). La dosis máxima de 0,5 mg/ml provocó un efecto claramente tóxico sobre las células (Fig. 3a (f)). Se produjo la muerte de los adipocitos, las membranas celulares se destruyeron por completo, de modo que básicamente sólo se registró la presencia de gotas lipídicas libres y fragmentos celulares. La acción del desoxicolato de Na sobre las células ADSC no se diferenció de la observada sobre las células 3T3-L1. Se pudieron establecer relaciones idénticas de dosis-efecto. En ambos sistemas modelo aparecieron efectos perjudiciales para la membrana a partir de 0,05 mg/ml de desoxicolato de Na, de manera que la concentración de 0,5 mg/ml se consideró altamente tóxica.

20 A través de una observación más precisa de las células tratadas bajo el microscopio confocal fue posible confirmar las conclusiones anteriores. En tanto que una concentración reducida de 0,01 mg/ml de desoxicolato de Na (Fig. 3b (b)) no provocó ninguna acción perjudicial sobre la membrana celular, la concentración de 0,1 mg/ml (Fig. 3b (d)) indujo graves daños sobre la membrana. Esto indica un efecto claramente perjudicial del desoxicolato de Na sobre la membrana.

25 Este efecto se confirmó nuevamente por medio de la tinción con yoduro de propidio de las células ADSC, después del tratamiento con desoxicolato de Na.

Los controles positivos con Tritón al 1% mostraron células claramente teñidas de rojo con PI, lo cual pone de manifiesto células con su membrana dañada (Fig. 3c (b)).

30 Después de un tratamiento con 0,05 mg/ml de desoxicolato de Na, no se detectaron células teñidas de rojo y, por consiguiente, células con daños de la integridad y estabilidad de membrana (Fig. 3c (c)). Después de un tratamiento con 0,1 mg/ml de desoxicolato de Na, se detectaron algunas células aisladas teñidas de rojo y, por lo tanto, pocas células con daños de la estabilidad e integridad de membrana (Fig. 3c (d)). Después de un tratamiento con 0,5 mg/ml de desoxicolato de Na, se observaron numerosas células claramente teñidas de rojo y, en consecuencia, muchas células con daños de la estabilidad e integridad de membrana (Fig. 3c (e)).

35 De este modo, se pone de manifiesto claramente un efecto perjudicial de la concentración de desoxicolato de Na de 0,5 mg/ml sobre la membrana de las células ADSC.

Fosfatidilcolina (PC)

De manera análoga a los ensayos con desoxicolato de Na, se investigó también un efecto perjudicial de fosfatidilcolina sobre la membrana celular.

40 Con este fin, y de forma similar a los ensayos con desoxicolato de Na, también se usaron células ADSC del Ejemplo 4 diferenciadas en adipocitos maduros por medio de una combinación de hormonas (insulina, cortisol, troglitazona, triyodotironina e isobutilmetilxantina).

A continuación, se llevó a cabo el tratamiento con fosfatidilcolina. Para el mismo, se utilizaron las concentraciones siguientes:

1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml y 20 mg/ml.

45 Como controles se usaron células ADSC no tratadas.

El periodo de incubación fue de 4 horas.

Este intervalo de concentraciones ya demostró ser eficaz en las células 3T3-L1. Después del periodo de incubación de 4 horas, las células diferenciadas y tratadas se estudiaron al microscopio óptico (Fig. 4a).

Adicionalmente, se analizaron bajo el CLSM células ADSC tratadas con fosfatidilcolina. Los adipocitos maduros diferenciados se trataron con:

1 mg/ml, 5 mg/ml y 15 mg/ml de fosfatidilcolina durante 4 horas.

Como controles se usaron células ADSC no tratadas.

- 5 A continuación se efectuó el análisis microscópico en el CLSM con una ampliación de 63 veces (Fig. 4b).

Se realizó otro análisis del posible efecto perjudicial de la fosfatidilcolina sobre células ADSC por medio de la tinción con PI de las células tratadas y subsiguiente análisis en el CLSM. Los adipocitos maduros diferenciados se trataron con:

5 mg/ml, 10 mg/ml y 15 mg/ml de fosfatidilcolina durante 4 horas.

- 10 Como controles se usaron células ADSC no tratadas.

Las células se incubaron a continuación en un medio con 5 μ m/ml yoduro de propidio durante 5 minutos. Seguidamente, se efectuó el análisis microscópico en el CLSM con una ampliación de 63 veces (Fig. 4c/26).

Fig. 4a: Fotografía de microscopía óptica de células ADSC diferenciadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina (PC) en cultivo celular 2D. El tratamiento se realizó de la forma siguiente:

- 15 (a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas
 (b) 1 mg/ml de PC después de 4 horas
 (c) 5 mg/ml de PC después de 4 horas
 (d) 10 mg/ml de PC después de 4 horas
 (e) 15 mg/ml de PC después de 4 horas
 20 (f) 20 mg/ml de PC después de 4 horas

(Escala = 100 μ m).

Fig. 4b: Fotografías al CLSM de células ADSC diferenciadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina (PC) en cultivo celular 2D. El tratamiento se realizó de la forma siguiente:

- (a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas
 25 (b) 1 mg/ml de PC después de 4 horas
 (c) 5 mg/ml de PC después de 4 horas
 (d) 15 mg/ml de PC después de 4 horas

(Escala = 20 μ m).

- 30 Fig. 4c: Fotografías al CLSM de células ADSC diferenciadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina (PC) en cultivo celular 2D. El tratamiento se efectuó de la forma siguiente:

- (a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación durante 4 horas
 (b) Control positivo = células no tratadas, en medio de diferenciación + Tritón al 1%
 (c) 5 mg/ml de PC después de 4 horas
 (d) 10 mg/ml de PC después de 4 horas
 35 (e) 15 mg/ml de PC después de 4 horas

Después del periodo de incubación (4 horas) los adipocitos se tiñeron con 5 μ m/ml de PI y se analizaron bajo CLSM. En la serie superior de PI (a-e), se muestran las fotografías fluorescentes de las células teñidas con PI. En la serie inferior de PK (a-e) se superponen las correspondientes fotografías de contraste de fase sobre las fotografías por fluorescencia. (Escala = 20 μ m).

- 40 De acuerdo con las observaciones realizadas sobre células 3T3-L1 (Ejemplo 3), en el modelo de células ADSC no se demostraron ningún efecto perjudicial para las células (Fig. 4a). Independientemente de la concentración de PC usada, las células conservaron su vitalidad y no se observa ninguna modificación morfológica.

En comparación con Na-DC, con una concentración de 0,05 mg/ml Na-DC se demostraron ya daños, y con una concentración de 0,5 mg/ml se produjo la muerte de las células ADSC (Fig. 3c).

5 La observación de las células ADSC bajo CLSM después del tratamiento con fosfatidilcolina confirma que no se produjeron daños en las células (4b). Tanto los controles no tratados como las células ADSC tratadas con 15 mg/ml de PC mostraron una morfología intacta. Por lo tanto, la fosfatidilcolina carece de efectos perjudiciales sobre las células.

La tinción con PI de las células ADSC tratadas con fosfatidilcolina confirmó que, *in vitro*, fosfatidilcolina no tiene ningún efecto perjudicial sobre las células.

10 Los controles positivos con Tritón al 1% mostraron células claramente teñidas de rojo con PI, lo cual indica células con daños de la membrana (Fig. 4c (b)).

Después de un tratamiento con 5, 10 y 15 mg/ml de desoxicolato de Na, tras la tinción con PI, no se observaron células teñidas de rojo ni, por consiguiente, células con daños en la integridad y estabilidad de membrana (Fig. 4c (c) a (e)).

15 Esto demuestra claramente que el tratamiento con fosfatidilcolina no produjo efectos perjudiciales sobre la membrana de las células ADSC.

Por el contrario, el desoxicolato de Na dañó de forma evidente la integridad y estabilidad de la membrana las células ADSC (Fig. 3c (d-e)).

20 Los ensayos con desoxicolato de Na y fosfatidilcolina demuestran que solamente el desoxicolato de Na desarrolla un efecto perjudicial sobre las células, pero no así la fosfatidilcolina. Fosfatidilcolina no provoca daños en la membrana de las células o las células. Estas observaciones se confirmaron utilizando múltiples métodos tales como estudios de microscopía óptica, tinción con yoduro de propidio y subsiguiente microscopía de fluorescencia.

25 El efecto de las sustancias no se modificó en el tiempo que duró el ensayo; la incubación durante 2 horas mostró los mismos efectos que una de 24 horas. Los ensayos con desoxicolato de Na demostraron que esta sal biliar tiene efectos desestabilizadores y necróticos sobre la membrana. Después de evaluar las dosis necesarias *in vitro*, es probable que también las cantidades de desoxicolato de Na utilizadas *in vivo* tengan un efecto perjudicial sobre las células.

Para fosfatidilcolina no se pudieron comprobar *in vitro* efectos perjudiciales sobre las células, y es probable que ocurra lo mismo *in vivo*. Este fosfolípido no resultó dañino para las células.

Ejemplo 6: Análisis de la combinación de fosfatidilcolina, glicirricinato y maltosa

30 Se analizó el efecto de una nueva combinación de sustancias. Esta combinación estuvo compuesta por:

50 mg/ml de fosfatidilcolina (PC)

20 mg/ml de glicirricinato trisódico, y

180 mg/ml de maltosa.

35 En primer lugar, se determinaron las relaciones dosis-efecto en cuanto a daños sobre la membrana o efectos citotóxicos, y se estudió la actividad lipolítica.

Para los ensayos se usó, como sistema modelo, la línea de células 3T3-L1 de preadipocitos de ratón. La adipogénesis de las células 3T3-L1 se estimuló mediante una combinación de hormonas (corticosterona, isobutilmetilxantina, indometacina, insulina), y la diferenciación en adipocitos maduros se prolongó durante 8 días.

40 Los adipocitos maduros de las células 3T3-L1 se trataron con diferentes concentraciones de fosfatidilcolina entre 0,1 mg/ml y 50 mg/ml. La fosfatidilcolina se combinó con 2-20 mg/ml de glicirricinato y 18 -180 mg/ml de maltosa.

La incubación de las células 3T3-L1 maduras se realizó durante 4 horas con la combinación de sustancias.

A continuación, las células tratadas fueron analizadas con microscopía óptica con una ampliación de 63 veces para comprobar la existencia de un efecto citotóxico y desestabilizador de la membrana.

Los resultados se representan gráficamente en las figuras 5 y 6:

45

Fig. 5: Fotografías de contraste de fases por CLSM de células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas en cultivo celular 2D. El tratamiento fue el siguiente:

- (a) Control = células no tratadas, en medio de diferenciación;
 - (b) 5 mg/ml de PC + 2 mg/ml de glicirricinato + 18 mg/ml de maltosa
 - 5 (c) 10 mg/ml de PC + 4 mg/ml de glicirricinato + 36 mg/ml de maltosa
 - (d) 20 mg/ml de PC + 8 mg/ml de glicirricinato + 72 mg/ml de maltosa
 - (e) 30 mg/ml de PC + 12 mg/ml de glicirricinato + 108 mg/ml de maltosa
 - (f) 50 mg/ml de PC + 20 mg/ml de glicirricinato + 180 mg/ml de maltosa
- (Escala = 20 μ m).

10 Fig. 6: Fotografías por CLSM de células 3T3-L1 diferenciadas, tratadas en cultivo celular 2D. El tratamiento fue el siguiente:

- (a) Control negativo = células no tratadas, en medio de diferenciación
- (b) Control positivo = células no tratadas, en medio de diferenciación + Tritón X al 1%
- (c) 20 mg/ml de PC + 8 mg/ml de glicirricinato + 72 mg/ml de maltosa
- 15 (d) 30 mg/ml de PC + 12 mg/ml de glicirricinato + 108 mg/ml de maltosa
- (e) 50 mg/ml de PC + 20 mg/ml de glicirricinato + 180 mg/ml de maltosa

Después del periodo de incubación (4 horas), los adipocitos se tiñeron con 5 μ g/ml de PI y se analizaron bajo CLSM. En la columna izquierda de PI (a-e) se muestran las fotografías de fluorescencia de las células teñidas con PI. En la columna derecha de PK (a-e) aparecen las correspondientes fotografías de contraste de fases superpuestas sobre las fotografías de fluorescencia (Escala = 20 μ m).

Los adipocitos tratados con la combinación de sustancias no se diferencian de las células de control (control, Fig. 5a). Al microscopio óptico exhibieron la misma morfología que las células de control, tuvieron un estado vital y membranas celulares intactas. Independientemente de la concentración, la combinación de sustancias no ejerció ningún efecto perjudicial visible sobre las células (Fig. 5).

25 Para confirmar la integridad intacta de la membrana, se llevó a cabo una tinción con PI de las células 3T3-L1 tratadas y del control. Se utilizaron combinaciones de sustancias con las concentraciones siguientes:

- 20 mg/ml, 30 mg/ml y 50 mg/ml de fosfatidilcolina;
- 8 mg/ml, 12 mg/ml y 20 mg/ml de glicirricinato; y
- 72 mg/ml, 108 mg/ml y 180 mg/ml de maltosa.

30 El periodo de incubación fue de 4 horas. A continuación, tanto las células tratadas como los dos controles se incubaron durante 5 minutos con 5 μ g/ml de PI. La evaluación se llevó a cabo mediante CLSM (Fig. 6).

El tratamiento de las células con Tritón X dañó la integridad de la membrana. De este modo, el yoduro de propidio puede penetrar en las células y teñir las células cuya membrana se ha desestabilizado. Los controles positivos (Fig. 6b) exhibieron, tal como se esperaba, una coloración de las células permeabilizadas a través de Tritón X. Las células no tratadas del control negativo (Fig. 6a) no se tiñeron con PI. Esto indica que la membrana de estas células se mantuvo intacta.

Las células tratadas con 20 mg/ml de PC (Fig. 6c) y 30 mg/ml de PC (Fig. 6d) no mostraron ninguna coloración debida a PI. Por lo tanto, estas células no experimentaron ninguna alteración de la membrana, y la combinación de sustancias usada careció de efecto perjudicial sobre las células (Fig. 6 c, d).

40 Las células tratadas con 50 mg/ml de PC (Fig. 6e) mostraron una débil coloración roja (Fig. 6e). Estas células se trataron con la combinación de sustancias a una dosis elevada. Por este motivo, se produjo la eliminación completa del medio de las células y el consiguiente déficit de nutrientes, lo cual, tras una incubación prolongada, da como resultado la aparición de daños celulares. La coloración débil de las células tratadas con 50 mg/ml de PC se puede atribuir, por lo tanto, al déficit de nutrientes y no a un daño de las células causado por fosfatidilcolina.

45 En los experimentos llevados a cabo *in vitro*, la combinación de sustancias de fosfatidilcolina, glicirricinato y maltosa no exhibió ningún efecto perjudicial sobre la membrana. En este sentido, se debe destacar que para determinar un

daño potencial sobre la membrana causado por las combinaciones de sustancias según la invención se utilizaron concentraciones muy altas, que son claramente mayores que las usadas terapéuticamente *in vivo*.

- 5 La relación entre una acción *in vivo* e *in vitro* se designa como correlación *in vivo/in vitro*. Sin embargo, el cálculo de la correlación *in vivo/in vitro* no es trivial y se comporta de manera diferente bajo distintas condiciones. En muchos casos, se puede partir aproximadamente de una correlación *in vivo/in vitro* en torno a un factor 100. Esto significa que las concentraciones usadas *in vitro* son aproximadamente dos potencias de diez menores que las dosis utilizadas *in vivo* para alcanzar efectos comparables. Sobre esta base, por ejemplo para la lipólisis inyectable con Lipostabil® N, cabría esperar las concentraciones *in vitro* que aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1

	Concentración utilizada en el compuesto <i>in vivo</i>	Concentración <i>in vitro</i> esperada (Factor 100) [mg/ml]	Concentración que provoca daños celulares <i>in vitro</i>
Desoxicolato de Na	12,65 mg/ml	0,1265	desde 0,05 mg/ml
Fosfatidilcolina	25 mg/ml	0,25	ninguna
Na-DC, PC, de Lipostabil	12,65 mg/ml de Na-DC 25 mg/ml de PC	0,1265 0,25	desde 0,05 mg/ml Na-DC desde 0,1 mg/ml PC

- 10 En el caso del desoxicolato de Na, tanto como sustancia unitaria como en forma de sustancia en Lipostabil®, la concentración *in vitro* esperada tras el cálculo a partir del orden de magnitud concuerda con las concentraciones determinadas en los ensayos (Tabla 1). De aquí se puede deducir que en la lipólisis inyectable, esta sustancia a la concentración utilizada tiene muy probablemente un efecto perjudicial sobre las células.

- 15 Por consiguiente, es altamente improbable que las concentraciones usadas para la terapia *in vivo* de las combinaciones de sustancias según la invención provoquen sobre la membrana un daño similar (y la subsiguiente necrosis) al que se genera según el estado de la técnica. Por lo tanto, se pueden aceptar factores de conversión similares para la combinación de fosfatidilcolina y ácido glicirricínico.

Ejemplo 7. Investigaciones *in vivo* de la reacción inflamatoria de las células tratadas en el ratón

- 20 Dado que la inflamación es un factor desencadenante para la migración de las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC), se inyectó en el tejido adiposo subcutáneo derecho de ratones Balb/c una mezcla (Fig. 8 d-f) que contiene fosfatidilcolina (PC), ácido glicirricínico (GR) y maltosa (MAL) (25 mg/ml de PC, 10 mg/ml de GR, 90 mg/ml de MAL), solución tampón PBS (Fig. 8 g-i), o células de *E. coli* (Fig. 8 a-c). La incubación duró 5 días.

- 25 A continuación, se procedió a aplicar tinciones para CD4, CD8, CD19 y CD20 para analizar la reacción inflamatoria de las células.

Adicionalmente, se marcaron células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) con un vector de expresión lentiviral eGFP/luciferasa, y se inyectaron en el tejido adiposo contralateral de ratones Balb/c 48 horas después de la inyección inicial.

- 30 La migración de las células ADSC se analizó por bioluminiscencia. Los resultados del Ejemplo 7 se representan gráficamente en la Figura 8.

Fig. 8: Fotografías de bioluminiscencia de células ADSC marcadas con luciferasa tras su inyección subcutánea en el tejido adiposo derecho de ratones Balb/c con:

(a-c) células de *E. coli*,

(d-f) fosfatidilcolina + maltosa + ácido glicirricínico (PMC),

- 35 (g-i) solución tampón PBS

Después de 48 horas, se inyectaron por vía intraperitoneal células ADSC marcadas con luciferasa y se examinó la migración de las células ADSC por bioluminiscencia. En los ratones (d-i), las células ADSC migraron hacia el hígado y el bazo. En los ratones (a-c), las células ADSC migraron hacia la región inflamada por la inyección de *E. coli*, en donde se acumularon.

- 40 En ratones con PBS (Fig. 8 g-i) y en ratones con la mezcla que contiene PC (Fig. 8 d-f) no se observó ninguna diferencia en la migración de las células ADSC. Por el contrario, en los ratones a los que se inyectó *E. coli*, se

observó una migración y acumulación de células ADSC en la región inflamada desencadenada por la inyección de *E. coli*.

5 En consecuencia, por medio de las células madre derivadas de tejido adiposo (células ADSC) marcadas con luciferasa se demostró que una inyección *in vivo* de una mezcla que contiene fosfatidilcolina (PMC), glicirricinato trisódico y maltosa no produce una reacción inflamatoria. Este hecho se demostró por que las células ADSC marcadas con luciferasa no migraron ni se acumularon en el tejido adiposo subcutáneo en el que se inyectó la mezcla.

Estos resultados confirman que la fosfatidilcolina se puede utilizar como sustancia activa lipolítica sin desencadenar una reacción inflamatoria importante cuando se combina con ácido glicirricínico.

10 Ejemplo 8. Investigaciones *in vitro* sobre la acción lipolítica de la combinación de sustancias

En células 3T3-L1 se estimuló la adipogénesis mediante una combinación de hormonas, y su diferenciación en adipocitos maduros continuó durante 8 días.

A continuación, se llevó a cabo una incubación de 4 horas de las células con

10 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml de fosfatidilcolina,

15 4 mg/ml, 10 mg/ml y 20 mg/ml de glicirricinato, y

36 mg/ml, 90 mg/ml y 180 mg/ml de maltosa.

La actividad lipolítica se determinó por medio de un ensayo de lipólisis, que se describe a continuación:

Método del ensayo de lipólisis:

20 Como lipólisis se define la separación de triglicéridos en glicerol y los tres ácidos grasos. Este proceso está catalizado principalmente por la lipasa, que es sensible a la acción hormonal, así como por la lipasa adiposa de triglicéridos. Por medio de un ensayo de lipólisis se puede demostrar la actividad lipolítica de células. Este ensayo se basa en la medición del glicerol que se forma durante la lipólisis y que es segregado por la células al medio. Por reacciones enzimáticas, el glicerol se metaboliza en glicerol-1-fosfato y, a continuación, en fosfato de dihidroxiacetona. De este modo, se forma peróxido de hidrógeno que se cuantifica fotométricamente por una
25 reacción cromática de peroxidasa. Para poder establecer parámetros acerca de la acción lipolítica de sustancias, se las compara, por una parte, con la actividad de lipólisis basal de las células, así como con una lipólisis estimulada a través del receptor beta-adrenérgico. Es posible desencadenar una estimulación de este tipo por medio de isoproterenol.

Los resultados del Ejemplo 8 se representan gráficamente en la Fig. 7.

30 Fig. 7: Representación gráfica de la evaluación del ensayo de lipólisis (μg de glicerol/ μg de ADN) con células 3T3-L1 diferenciadas tratadas. En las células 3T3-L1 se estimuló la adipogénesis mediante una combinación hormonal de inducción y, seguidamente, se diferenciaron durante 8 días. El tratamiento de los adipocitos maduros se efectuó durante 4 horas en BSA/PBS al 3% con:

Isoproterenol 10 μM (control positivo para la lipólisis estimulada)

35 10 mg/ml de fosfatidilcolina + 4 mg/ml de glicirricinato + 36 mg/ml de maltosa

25 mg/ml de fosfatidilcolina + 10 mg/ml de glicirricinato + 90 mg/ml de maltosa

50 mg/ml de fosfatidilcolina + 20 mg/ml de glicirricinato + 180 mg/ml de maltosa.

Como control de la actividad basal de lipólisis se usaron células no tratadas en BSA/PBS al 3%. Las barras indican las desviaciones estándar a partir de $n=3$. El ensayo se repitió dos veces. (PC = fosfatidilcolina).

40 La primera barra en la Figura 7 indica que la actividad basal de lipólisis de las células no tratadas en BSA/PBS al 3% es de 8 μg de glicerol/ μg de ADN. A partir de este nivel basal se determinó la actividad lipolítica de las restantes muestras. En los controles positivos (Fig. 7) se indujo la estimulación de la lipólisis con 10 μM del agonista del receptor β -adrenérgico isoproterenol. El control positivo muestra una actividad lipolítica que aumentó en ocho veces con respecto al nivel basal. Todas las células tratadas con la combinación de sustancias (10 mg/ml, 25 mg/ml y 50
45 mg/ml de PC) mostraron, en comparación con el nivel basal, una actividad lipolítica aumentada (Fig. 7). El tratamiento de las células con la combinación de sustancias que contuvo 10 o 25 mg/ml de PC produjo un aumento de la actividad de lipólisis de 5 veces en comparación con el nivel basal. El tratamiento de las células con la combinación de sustancias que contuvo 50 mg/ml de PC dio lugar a un aumento de 3 veces de la actividad lipolítica en comparación con el nivel basal (Fig. 7). El descenso de la actividad lipolítica con la concentración más alta se
50 debe atribuir probablemente, tal como se ha explicado anteriormente, a que por la retirada del medio, las células

experimentan un déficit de los nutrientes necesarios para sobrevivir y mantener sus funciones normales tales como, por ejemplo, la actividad lipolítica.

In vitro, la combinación de sustancias según la invención muestra un marcado efecto lipolítico.

Ejemplo comparativo 1: (Lipostabil® que contiene fosfatidilcolina y desoxicolato de Na)

5 Se utilizaron concentraciones de desoxicolato de Na de 0,005 a 0,5 mg/ml (acción como sustancia única a partir de 0,05 mg/ml), y concentraciones de fosfatidilcolina de 0,01 a 1 mg/ml (ninguna acción como sustancia única).

La realización fue análoga a la del Ejemplo 8.

Los resultados del Ejemplo comparativo 1 se representan gráficamente en la Fig. 9.

10 Fig. 9: Fotografías de contraste de fases de células 3T3-L1 diferenciadas tratadas. En células 3T3-L1 se estimuló la adipogénesis por una combinación hormonal de inducción y la diferenciación continuó durante 8 días. Los adipocitos maduros se trataron durante 24 horas con fosfatidilcolina y desoxicolato de Na de Lipostabil® con las concentraciones siguientes:

(a) células no tratadas, en medio de diferenciación

(b) 0,01 mg/ml de fosfatidilcolina + 0,005 mg/ml de desoxicolato de Na

15 (c) 0,1 mg/ml de fosfatidilcolina + 0,05 mg/ml de desoxicolato de Na

(d) 0,25 mg/ml de fosfatidilcolina + 0,125 mg/ml de desoxicolato de Na

(e) 0,5 mg/ml de fosfatidilcolina + 0,25 mg/ml de desoxicolato de Na

(f) 1 mg/ml de fosfatidilcolina + 0,5 mg/ml de desoxicolato de Na.

20 El análisis se lleva a cabo bajo microscopía óptica. Las células con daños de la membrana o los fragmentos celulares se indican con flechas negras, en tanto que las gotas lipídicas libres están marcadas con flechas blancas.

Mientras que la concentración más baja de fosfatidilcolina y desoxicolato de Na no mostró ningún efecto todavía (Fig. 9b), con la dosis inmediatamente superior se detectó ya un ligero daño celular (Fig. 5c) que se incrementó con concentraciones crecientes. En la Figura 5e las membranas celulares están fuertemente afectadas, lo que demuestra que Lipostabil® a una concentración de 0,5 mg/ml de fosfatidilcolina junto con 0,25 mg/ml de desoxicolato de Na dañó intensamente las células, provocando la lisis celular por necrosis. El tipo de acción de Lipostabil® se asemejó más a la acción detergente del desoxicolato de Na (típico daño de la membrana celular), cuya acción aparentemente es más destacada. No se pudo determinar para fosfatidilcolina como sustancia única un efecto perjudicial similar sobre la membrana, lo que permite suponer que en Lipostabil® la acción perjudicial sobre las células procede fundamentalmente del desoxicolato de Na. La comparación del intervalo de concentraciones eficaces de Lipostabil® con el de las sustancias solas apoya la conclusión relativa a la acción predominante del desoxicolato de Na. En tanto que la fosfatidilcolina careció de acción como sustancia única, Lipostabil® alcanzó con una concentración de fosfatidilcolina de 0,1 mg/ml efectos ligeros (a esta concentración, ningún efecto de PC como sustancia única). Por el contrario, con la administración aislada de desoxicolato de Na a partir de una concentración de 0,05 mg/ml se produjeron los primeros daños iniciales de la membrana, que también aparecieron con Lipostabil® a esta concentración.

Ejemplo 9: Aplicación de Phosphogliv® y Lipostabil® en participantes femeninas y determinación de la eficacia por lipólisis subcutánea

40 El preparado Phosphogliv® i.v. utilizado hasta ahora en enfermedades hepáticas, contiene en lugar de DC (en Lipostabil® N i.v.), ácido glicirricínico. Los primeros resultados experimentales y estudios en dos participantes señalaron una eficacia del preparado similar a la de Lipostabil® N i.v., con una tolerancia claramente mejor.

Los ensayos descritos en este documento indican una acción comparable de Phosphogliv® y Lipostabil®, con una mejor tolerancia de Phosphogliv®.

En un estudio prospectivo controlado, se trataron seis participantes femeninas con la administración subcutánea en el brazo izquierdo de Phosphogliv® y de Lipostabil® en el brazo derecho.

45 Las ampollas usadas contuvieron 0,5 g de PPC, 0,2 g de glicirricinato y 1,8 g de maltosa en forma de liofilizado, a disolver en 10 ml de agua por inyección. En función de la extensión del área de administración de las inyecciones se llevaron a cabo hasta 60 administraciones subcutáneas en cada brazo, siempre de 0,5 ml a 1,5 cm de distancia.

Tiempos de investigación de los efectos de los preparados:

El tratamiento tuvo una duración total de 16 semanas. Los análisis se realizaron un día antes de iniciar el tratamiento ($t = -1$), el día del primer tratamiento ($t = 0$), ocho semanas después de haber iniciado el tratamiento ($t = 8$) y 16 semanas después del inicio del tratamiento ($t = 16$).

5 Determinación del efecto

Para determinar un efecto, se midió el perímetro del brazo de las participantes. El perímetro del brazo [cm] se midió por medio de un calibre y una cinta de medición (Myo-tape) antes de iniciar el tratamiento y después de 8 y 16 semanas.

10 Adicionalmente, se determinaron los lípidos de la sangre colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL en mg/dl y el índice aterogénico de colesterol LDL a colesterol HDL.

Representación de los resultados

A partir de los valores de medición, las variaciones de los valores de medición como la diferencia con respecto al valor inicial y la variación porcentual con respecto al valor inicial se determinaron los valores medios y la desviación estándar.

Tabla 2: Datos básicos

Preparado	Tiempo [t]	P	L	P	Myo izq. [cm]	Myo der. [cm]	Colesterol total [mg/dl]	Colesterol LDL [mg/dl]	Colesterol HDL [mg/dl]	Mejoría clínica*	Observación
N°											
6	I.B.	3,1	3,1	35,0	35,0	269,0	169,0	53,8			
	I.B.	3,1	3,1	35,0	35,0						
	I.B.	2,6	2,7	32,5	33,0	159,0	112,0	58,9	Del/DelP	Probable toma de Ezetrol	
2	I.B.	2,5	2,5	32,0	32,0	172,0	127,0	58,3	Del/DelP		
	Ch.K.	2,9	2,9	30,5	30,5	237,0	136,0	75,4			
	Ch.K.	2,9	2,9	30,5	30,5						
7	Ch.K.	2,2	2,2	28,2	29,0	222,0	129,0	78,0	DrI/DrIP		
	Ch.K.	2,0	2,0	28,0	28,5	218,0	128,0	79,0	DrI/DrIP		
	S.A.	3,2	3,3	31,0	32,0	212,0	104,0	88,4			
1	S.A.	3,2	3,3	31,0	32,0						
	S.A.	2,8	2,9	27,0	28,5	214,0	103,0	89,1	DrI/DrIP		
	S.A.	2,7	2,8	26,0	27,0				DrI/DrIP		
3	G.E.	3,8	3,8	33,0	33,0	143,0	53,0	67,0			
	G.E.	3,8	3,8	33,0	33,0						
	G.E.	3,2	3,2	31,8	31,8	141,0	51,0	68,0	Del/DelP		
3	G.E.	2,8	2,8	30,5	30,5	142,0	49,0	54,0	Del/DelP		
	M.St.	2,9	3,0	35,0	36,0	198,0	120,2	62,8			
	M.St.	2,9	3,0	35,0	36,0						

	M.St.	8	2,6	2,7	33,0	32,5	182,0	110,0	60,3	Del/DelP	
	M.St.	16	2,5	2,6	32,0	32,0	182,0	110,9	60,8	Del/DelP	
4	E.K.	-1	2,2	2,3	28,5	29,0	187,0	99,0	68,7		
	E.K.	0	2,2	2,3	28,5	29,0					
	E.K.	8	1,4	1,5	26,0	27,0	177,0	92,0	69,3	DrI/DrIP	
	E.K.	16									

Calibre izq = izquierdo; Calibre der. = derecho; Myo izq. = Myo-tape izquierdo; Myo der. = Myo-tape derecho; P = Phosphogliv®; L = Lipostabil®; Del = mejora definitiva de eficacia y compatibilidad, médico; DelP = mejora definitiva de eficacia y compatibilidad, paciente; DrI = notable mejora de eficacia y compatibilidad, médico; DrIP = notable mejora de eficacia y compatibilidad, paciente.

El perímetro del brazo de las participantes fue diferente en función del método de medición elegido, calibre o Myo-tape. Independientemente del método elegido, se pudo comprobar, sin embargo, una reducción del perímetro del brazo. No se observó ninguna diferencia entre la acción de Phosphogliv® en comparación con Lipostabil®. Los dos preparados dieron lugar a una reducción del perímetro del brazo en la misma medida (véanse las Tablas 3-1 y 3-2).

5 Tabla 3-1. Perímetro del brazo medido con calibre [cm]

		Tiempo en semanas después del inicio del tratamiento con							
Participante		Phosphogliv® (izquierdo)				Lipostabil® (derecho)			
		-1	0	8	16	-1	0	8	16
6	I.B.	3,1	3,1	2,6	2,5	3,1	3,1	2,7	2,5
2	Ch.K.	2,9	2,9	2,2	2,0	2,9	2,9	2,2	2,0
7	S.A.	3,2	3,2	2,8	2,7	3,3	3,3	2,9	2,8
1	G.E.	3,8	3,8	3,2	2,8	3,8	3,8	3,2	2,8
3	M. St.	2,9	2,9	2,6	2,5	3,0	3,0	2,7	2,6
4	E.K.	2,2	2,2	1,4		2,3	2,3	1,5	
Valor medio		3,02	3,02	2,47	2,50	3,07	3,07	2,53	2,54
Desviación estándar		0,52	0,52	0,62	0,31	0,49	0,49	0,60	0,33
N		6	6	6	5	6	6	6	5

Tabla 3-2. Variación del perímetro del brazo con calibre, en cm, como diferencia absoluta y relativa con respecto a la semana 0

		Tiempo en semanas después del inicio del tratamiento con							
Participante		Phosphogliv® (izquierdo)				Lipostabil® (derecho)			
		8		16		8		16	
		cm	%	cm	%	cm	%	cm	%
6	I.B.	-0,5	-16,1	-0,6	-19,4	-0,4	-12,9	-0,6	-19,4
2	Ch.K.	-0,7	-24,1	-0,9	-31,0	-0,7	-24,1	-0,9	-31,0
7	S.A.	-0,4	-12,5	-0,5	-15,6	-0,4	-12,1	-0,5	-15,2
1	G.E.	-0,6	-15,8	-1,0	-26,3	-0,6	-15,8	-1,0	-26,3
3	M. St.	-0,3	-10,3	-0,4	-13,8	-0,3	-10,0	-0,4	-13,3
4	E.K.	-0,8	-36,4			-0,8	-34,8		
Valor medio		-0,55	-19,21	-0,68	-21,22	-0,53	-18,29	-0,68	-21,04
Desviación estándar		0,19	9,63	0,26	7,28	0,20	9,47	0,26	7,49
N		6	6	5	5	6	6	5	5

10 En la Tabla 3-2 se observa que en las mediciones con calibre se produjo, después de 8 semanas, tanto con Phosphogliv® como con Lipostabil® una reducción del perímetro del brazo de 19,21% y 18,29%, respectivamente. Después de 16 semanas, se determinó una reducción del perímetro del brazo de 21,22% y 21,04%, respectivamente, medido con el calibre. En consecuencia los dos preparados, Phosphogliv® y Lipostabil®, tienen la misma eficacia.

Tabla 4-1. Perímetro del brazo medido con Myo-tape [cm]

		Tiempo en semanas después del inicio del tratamiento con							
Participante		Phosphogliv® (izquierdo)				Lipostabil® (derecho)			
		-1	0	8	16	-1	0	8	16
6	I.B.	35,0	35,0	32,5	32,0	35,0	35,0	33,0	32,0
2	Ch.K.	30,5	30,5	28,2	28,0	30,5	30,5	29,0	28,5
7	S.A.	31,0	31,0	27,0	26,0	32,0	32,0	28,5	27,0
1	G.E.	33,0	33,0	31,8	30,5	33,0	33,0	31,8	30,5
3	M. St.	35,0	35,0	33,0	32,0	36,0	36,0	32,5	32,0
4	E.K.	28,5	28,5	26,0		29,0	29,0	27,0	
Valor medio		32,17	32,17	29,75	29,70	32,58	32,58	30,30	30,00
Desviación estándar		2,62	2,62	3,04	2,64	2,65	2,65	2,46	2,21
N		6	6	6	5	6	6	6	5

Tabla 4-1. Variación del perímetro del brazo medido con Myo-tape, en cm, como diferencia absoluta y relativa con respecto a la semana 0

		Tiempo en semanas después del inicio del tratamiento con							
Participante		Phosphogliv® (izquierdo)				Lipostabil® (derecho)			
		8		16		8		16	
		cm	%	cm	%	cm	%	cm	%
6	I.B.	-2,5	-7,1	-3,0	-8,6	-2,0	-5,7	-3,0	-8,6
2	Ch.K.	-2,3	-7,5	-2,5	-8,2	-1,5	-4,9	-2,0	-6,6
7	S.A.	-4,0	-12,9	-5,0	-16,1	-3,5	-10,9	-5,0	-15,6
1	G.E.	-1,2	-3,6	-2,5	-7,6	-1,2	-3,6	-2,5	-7,6
3	M. St.	-2,0	-5,7	-3,0	-8,6	-3,5	-9,7	-4,0	-11,1
4	E.K.	-2,5	-8,8			-2,0	-6,9		
Valor medio		-2,42	-7,62	-3,20	-9,81	-2,28	-6,97	-3,30	-9,89
Desviación estándar		0,92	3,13	1,04	3,56	0,99	2,84	1,20	3,63
N		6	6	5	5	6	6	5	5

5

De la Tabla 4-2 se concluye que, con el método Myo-tape, se produjo después de 8 semanas una reducción del perímetro del brazo con Phosphogliv® y Lipostabil® de 7,62% y 6,97%, respectivamente. Después de 16 semanas, se determinó una reducción del perímetro del brazo de 9,81% y 9,89%, respectivamente, medido con Myo-tape. En consecuencia los dos preparados, Phosphogliv® y Lipostabil®, tienen la misma eficacia.

10 Aun cuando los dos métodos, calibre y Myo-tape, mostraron diferentes reducciones con los preparados, el grado de eficacia de los dos preparados, Lipostabil® y Phosphogliv®, fue equivalente.

Ejemplo 10: Determinación de efectos adversos del tratamiento con Lipostabil® y Phosphogliv®

En este caso, las participantes fueron tratadas como en el Ejemplo 9 y se analizó la eficacia. Para documentar los efectos adversos, se tomaron fotografías de los brazos de las participantes antes y después del tratamiento con Phosphogliv® y Lipostabil® (Figs. 10 y 11).

- 5 Después de 3 minutos, en el brazo derecho de la participante nº 01, tratado con Lipostabil®, se observaron signos evidentes de enrojecimiento e inflamación. En comparación, en el brazo izquierdo, tratado con Phosphogliv®, sólo se observaron ligeros signos de enrojecimiento e inflamación. Este fenotipo confirma los resultados de los ensayos *in vitro* con fosfatidilcolina, que no provoca efectos perjudiciales sobre la membrana celular (Ejemplo 5, Fig. 4 a-c). Las fotografías de la participante nº 02, en la Fig. 11, muestran la misma diferencia entre el brazo izquierdo (Phosphogliv®) y derecho (Lipostabil®).

Fig. 10: Documentación fotográfica siguiente al tratamiento de los brazos izquierdo (Phosphogliv®) y derecho (Lipostabil®) de la participante nº 01. Las fotografías se tomaron 3 min después de la administración de los preparados Lipostabil® y Phosphogliv®.

- 15 Fig. 11: Documentación fotográfica siguiente al tratamiento de los brazos izquierdo (Phosphogliv®) y derecho (Lipostabil®) de la participante nº 02. Las fotografías se tomaron 3 min después de la administración de los preparados Lipostabil® y Phosphogliv®.

Además, en la Tabla 5 siguiente se resumieron los efectos adversos.

Tabla 5. Efectos adversos como resultado del tratamiento con Phosphogliv® y Lipostabil®

Particip.	t = 0		t = 8		t = 16	
	P	L	P	L	P	L
Nº 1			Sólo dolor breve, casi sin inflamación	Inflamación importante y dolor hasta el 3 ^{er} día	Casi sin dolor	Inflamación y enrojecimiento hasta el 4º día
Nº 2			Inflamación y enrojecimiento mucho menores	Mucho más inflamación y enrojecimiento	Casi sin dolor	Dolores durante una semana
Nº 3	Nada	Ardor y prurito durante 5 min; dolores leves durante 2 semanas	“Un juego de niños” = ningún dolor en absoluto	Dolor leve durante 2 semanas	Ninguna reacción inesperada, muchos menos síntomas	Ninguna reacción inesperada, muchos más síntomas
Nº 4			Sólo dolores en el punto de inyección durante aprox. 3 min.; inflamación y enrojecimiento durante 3 días; posteriormente sin dolor ni inflamación	Mucho más dolor, inflamación durante 3 días aprox. Como con Phosphogliv®. Inflamación y enrojecimiento durante 12 días. Sensibilidad durante prácticamente las 8 semanas		

Particip.	t = 0		t = 8		t = 16	
	P	L	P	L	P	L
Nº 6			Casi dolores	sin	Sin síntomas	Inflamación y enrojecimiento durante días
Nº 7			Casi dolores	sin	Dolores e inflamación fácilmente soportables en ambos brazos	

Después del primer y segundo tratamientos, el médico y las participantes hablaron de manera unánime de una mejoría evidente o notable (reducción) del panículo adiposo del brazo con ambos preparados, así como de una tolerancia claramente mejor con Phosphogliv®. Después del tratamiento, la resistencia de la piel fue buena en todos los casos.

- 5 Los datos de la Tabla 5 muestran que los síntomas que experimentaron las participantes después de un tratamiento con Lipostabil® fueron inflamaciones, enrojecimientos y dolores en el punto de inyección. Durante el tratamiento con Phosphogliv® prácticamente no se manifestaron efectos adversos de este tipo. Por lo tanto, para las participantes encuestadas, Phosphogliv® fue esencialmente mejor tolerado que el preparado Lipostabil®. Tal como se ha mencionado anteriormente, la mejor tolerabilidad se debe atribuir a la escasa o nula aparición de daños celulares. Como se muestra en el Ejemplo 5, fosfatidilcolina no perjudica la membrana celular, en tanto que el desoxicolato de Na de Lipostabil® daña las células.
- 10

Ejemplo 11: Determinación de los valores de colesterol antes y después de la lipólisis subcutánea

- Con este fin, se determinaron los lípidos de la sangre de las participantes a lo largo del periodo de tratamiento. Se midieron el colesterol total, el colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) y el colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad). La Tabla 6 resume los valores en los tiempos t = -1, t = 8 semanas y t = 16 semanas.
- 15

En promedio, los lípidos de la sangre se modificaron de manera paralela durante el periodo de tratamiento. Únicamente en las dos participantes (I. B. y Ch. K), cuyos valores de colesterol total y colesterol LDL se encontraban claramente elevados, los valores mostraron una disminución, mientras que el colesterol HDL aumentó (Tabla 6). En la Tabla 7 aparece un resumen del estudio.

- 20 Las restantes variables bioquímicas de control, AST, ALT, γ-GT, bilirrubina, glucosa y creatinina, se mantuvieron dentro de los límites normales, con la excepción de un valor ligeramente incrementado de γ-GT en la participante S.A. antes de comenzar el tratamiento.

Tabla 6. Valores de colesterol [mg/dl]

Participante	Tiempo en semanas después del inicio del tratamiento						Colesterol LDL			Colesterol HDL		
	-1	8	16	-1	8	16	-1	8	16	-1	8	16
6 I.B.	269,0	159,0	172,0	169,0	112,0	127,0	53,8	58,9	58,3			
2 Ch.K.	237,0	222,0	218,0	136,0	129,0	128,0	75,4	78,0	79,0			
7 S.A.	212,0	214,0		104,0	103,0		88,4	89,1				
1 G.E.	143,0	141,0	142,0	53,0	51,0	49,0	67,0	68,0	54,0			
3 M.St.	198,0	182,0	182,0	120,2	110,0	110,9	62,8	60,3	60,8			
4 E.K.	187,0	177,0		99,0	92,0		68,7	69,3				
Valor medio	207,67	182,50	178,50	113,53	99,50	103,73	69,35	70,60	63,03			
Desviación estándar	43,23	31,17	31,34	38,97	26,67	37,32	11,75	11,39	11,01			
N	6	6	4	6	6	4	6	6	4			4

Cociente LDL/HDL -1 semana 1,64

(Valor diana <3) 8 semanas 1,41

16 semanas 1,65

Colesterol LDL = Colesterol Lipoproteína de Baja Densidad Colesterol HDL = Colesterol Lipoproteína de Alta Densidad (por sus siglas en inglés)

Tabla 7. Resumen de los resultados del estudio en las participantes

Participante	Tiempo	Calibre [cm]		Myo-tape		Mejoría clínica	Observaciones
		Izquierdo	Derecho	Izquierdo	Derecho		
6	I.B.	3,1	3,1	35	35		*Probable toma de Ezetrol
		3,1	3,1	35	35		
		2,6	2,7	32,5	33	DeI/DeIP	
2	Ch.K.	2,5	2,5	32	32	DeI/DeIP	Colesterol total de 159,0 mg/dl a 172,0 mg/dl Colesterol LDL de 112,0 mg/dl a 127,0 mg/dl Colesterol HDL de 58,9 mg/dl a 58,3 mg/dl
		2,9	2,9	30,5	30,5		Brazo izquierdo sin síntomas, brazo derecho hasta 3 días de dolor
		2,9	2,9	30,5	30,5		Resistencia cutánea mejorada de regular a buena
	8	2,2	2,2	28,2	29	DrI/DrIP	Colesterol total de 237,0 mg/dl a 222,0 mg/dl Colesterol LDL de 136,0 mg/dl a 129,0 mg/dl Colesterol HDL de 75,4 mg/dl a 78,0 mg/dl
		2,0	2,0	28	28,5	DrI/DrIP	Colesterol total de 222 mg/dl a 218 mg/dl
		2,0	2,0	28	28,5		

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que contiene
 - a) al menos un fosfolípido;
 - b) ácido glicirricínico, o
- 5 una sal de ácido glicirricínico y
 - c) eventualmente, adyuvantesen donde
 - el contenido total de fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 2 a 80% en peso, y
 - la proporción en peso entre los fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 30:1 a 0,5:1
- 10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de enfermedades del tejido adiposo subcutáneo.
2. Uso según la reivindicación 1 para la degradación y retroceso de tumores de tejido adiposo.
3. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que las enfermedades del tejido adiposo subcutáneo son lipoedema, lipomas, enfermedad de Dercum, cuello graso de Madelung o lipomatosis de la pared abdominal.
4. Uso no terapéutico de una composición que contiene
- 15 a) al menos un fosfolípido;
 - b) ácido glicirricínico, ouna sal de ácido glicirricínico y
 - c) eventualmente, adyuvantesen donde
 - el contenido total de fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 2 a 80% en peso, y
 - la proporción en peso entre los fosfolípidos y el ácido glicirricínico o sus sales es de 30:1 a 0,5:1
- 20 para el tratamiento de acúmulos adiposos subcutáneos.
5. Uso según la reivindicación 4 para la eliminación de acúmulos adiposos subcutáneos, en especial con trastornos locales de la distribución de la grasa.
- 25 6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado por que los trastornos locales de la distribución de la grasa son la dermatopaniculosis deformante, pseudoginecomastia, "joroba de búfalo" en pacientes con VIH, celulitis, xantelasmas o depósitos inespecíficos de grasa subcutánea.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición contiene fosfatidilcolina como fosfolípido.
- 30 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición contiene fosfatidilcolina de origen animal o vegetal.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición contiene ácido glicirricínico o sales de potasio, sodio, amonio o magnesio del ácido glicirricínico.
- 35 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición contiene un azúcar, en especial glucosa o maltosa, manita, sorbita o lactosa como adyuvante.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el fosfolípido contiene 15 a 98% en peso, preferiblemente 30 a 98% en peso, más preferiblemente 50 a 98% en peso, de forma especialmente preferida 75 a 98% en peso y, de forma muy especialmente preferida, 75 a 90% en peso de fosfatidilcolina.
- 40 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición en forma seca se disuelve en un disolvente apropiado.
13. Uso según una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición se utiliza en forma seca, preferiblemente como liofilizado obtenido por desecación por congelación.
14. Uso según una o varias de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición se utiliza en forma de una solución.
- 45 15. Uso según una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la composición contiene disolventes fisiológicamente adecuados que comprenden agua, solución salina fisiológica, solución de glucosa, un alcohol

monohidroxiado tal como etanol, 2-propanol, n-propanol, alcoholes polihidroxiados tales como glicerol y/o propanodiol, poliglicoles tales como polietilenglicol y/o miglyol, glicerol formal, dimetilisorbitol, aceites y/o éteres naturales o sintéticos.

5 16. Uso según una o varias de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por que la aplicación de la composición se realiza por inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa.

17. Uso según una o varias de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por que para la aplicación de la composición se utiliza un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en iontoforesis, electroporación, microporación o sonoforesis.

Fig. 1a

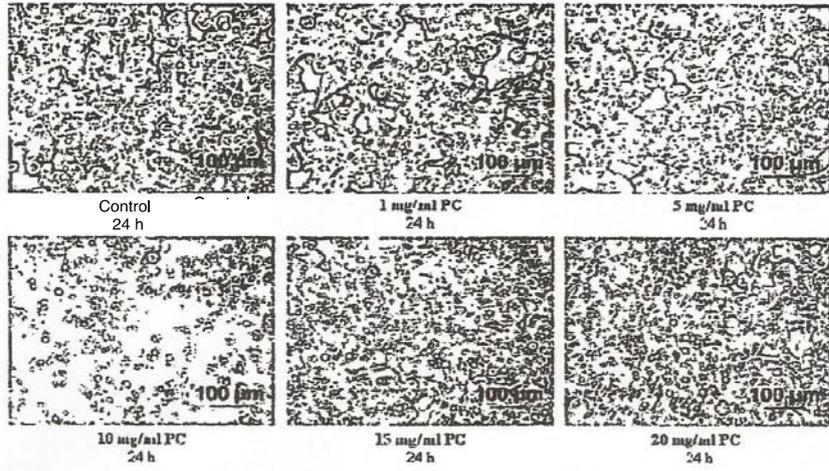


Fig. 1b

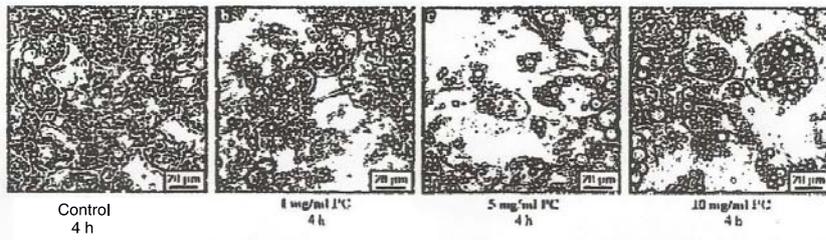


Fig. 1c

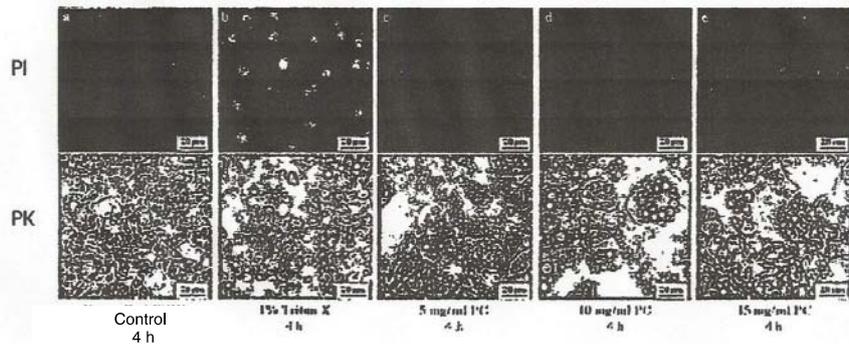


Fig. 2

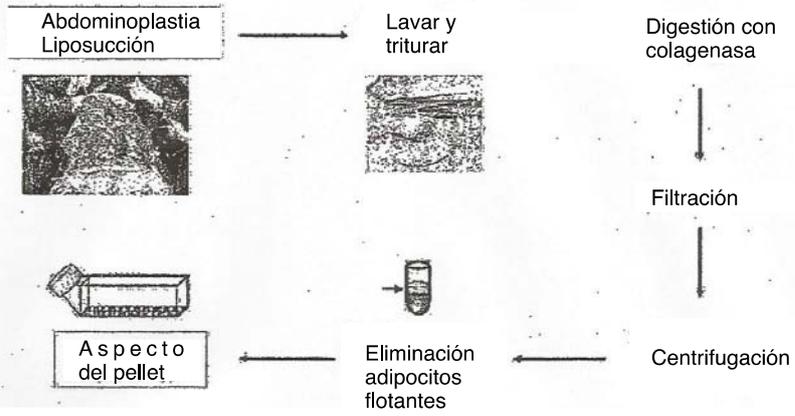


Fig. 3a

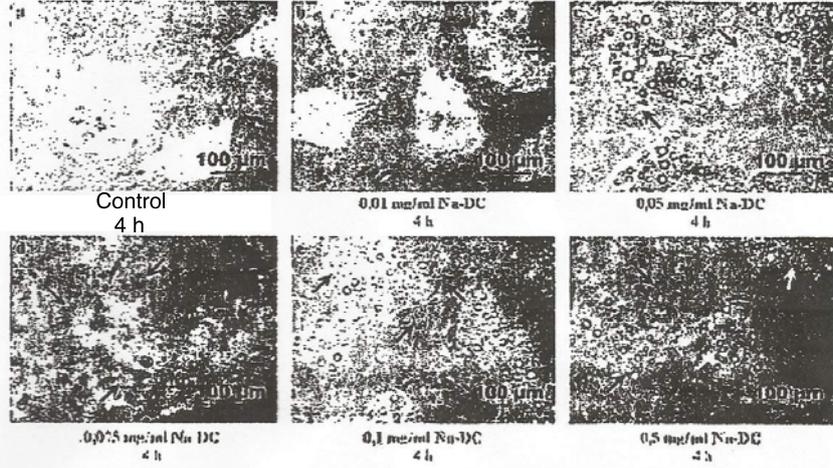


Fig. 3b

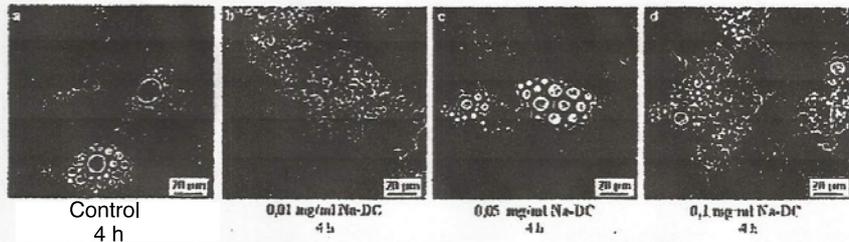


Fig. 3c

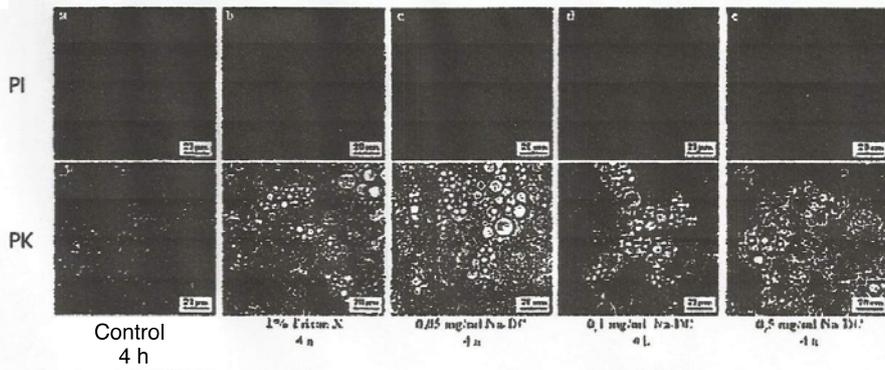


Fig. 4a

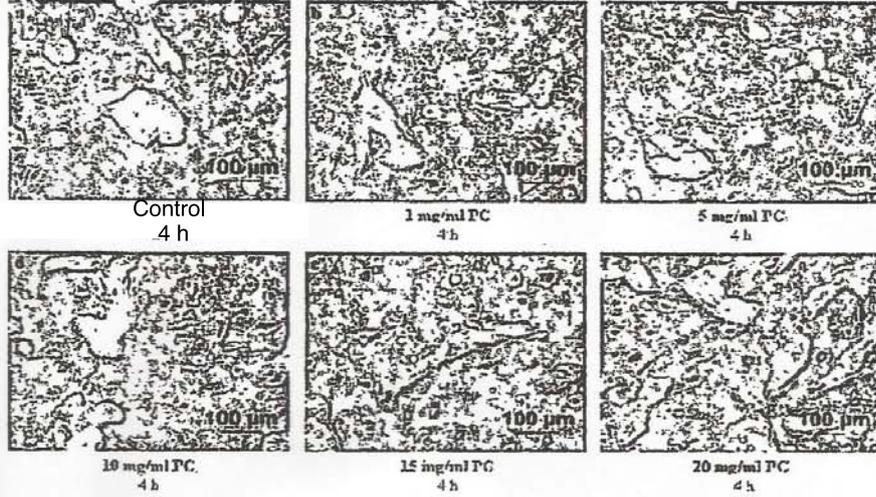


Fig. 4b

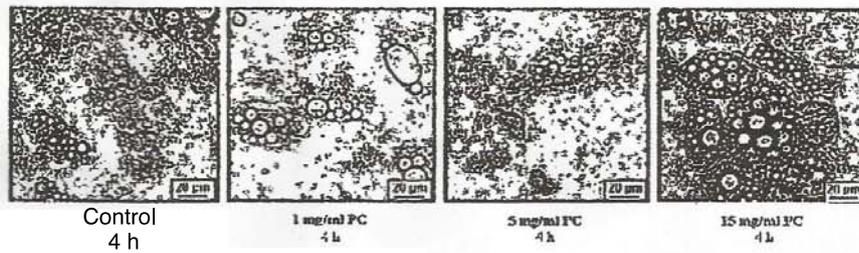


Fig. 4c

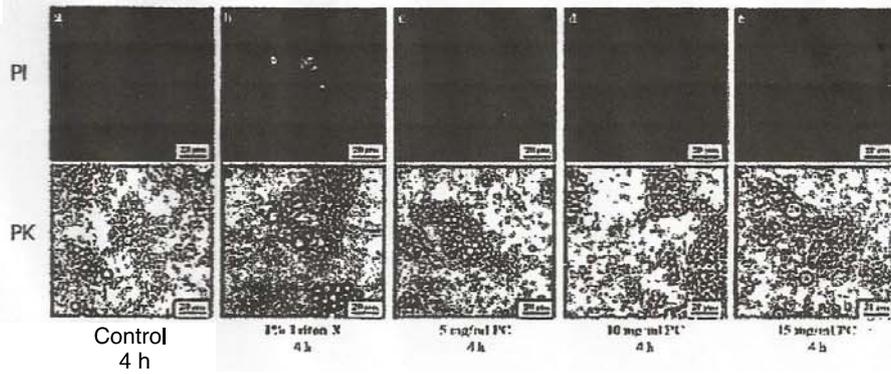


Fig. 5

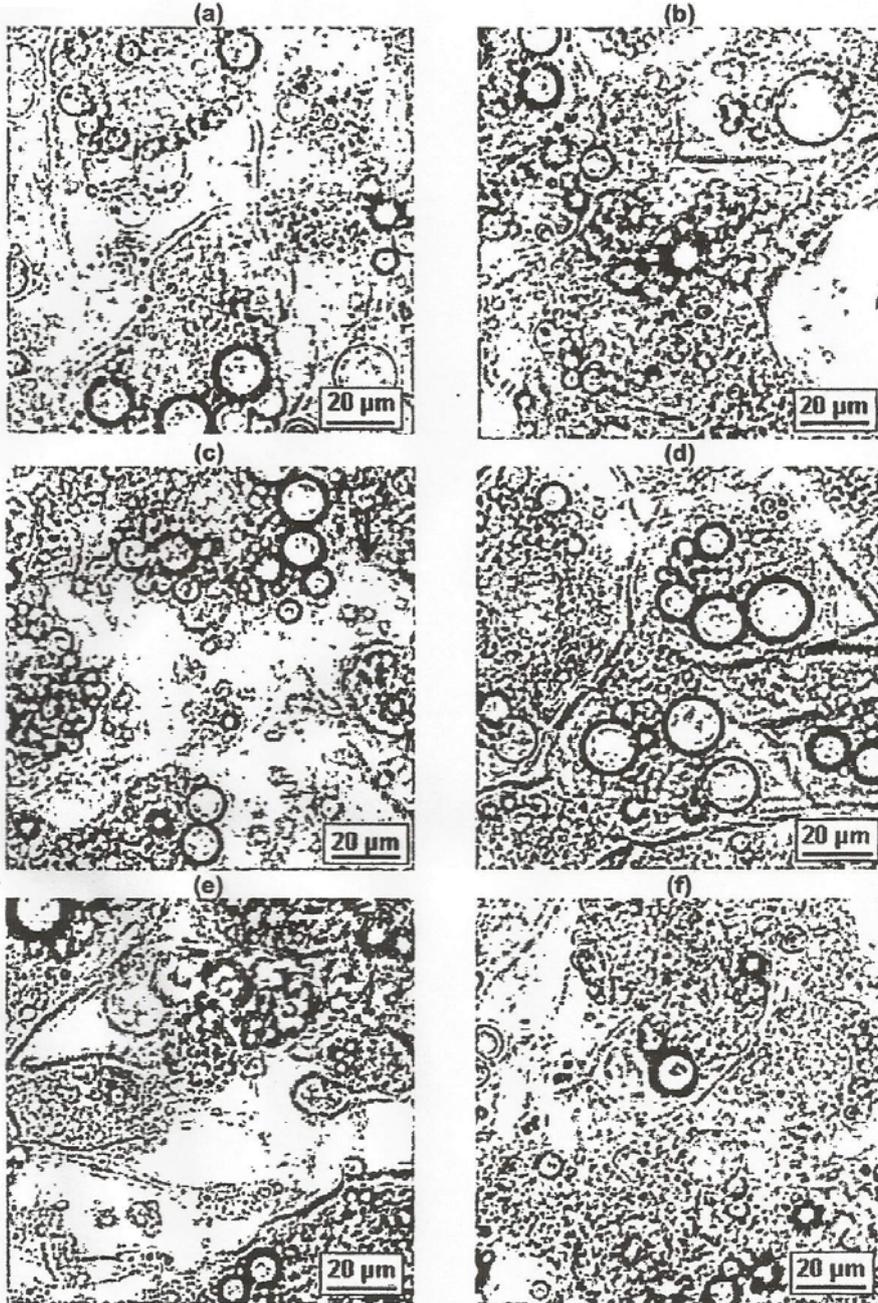


Fig. 6

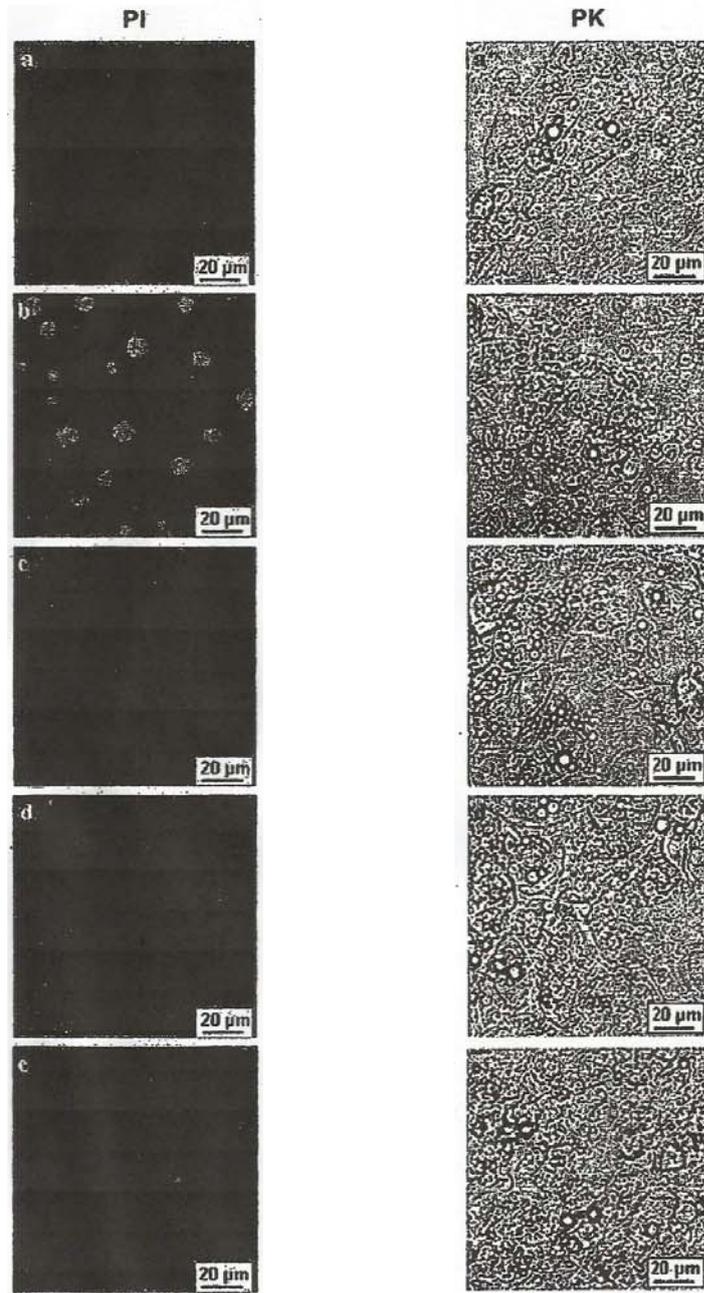


Fig. 7

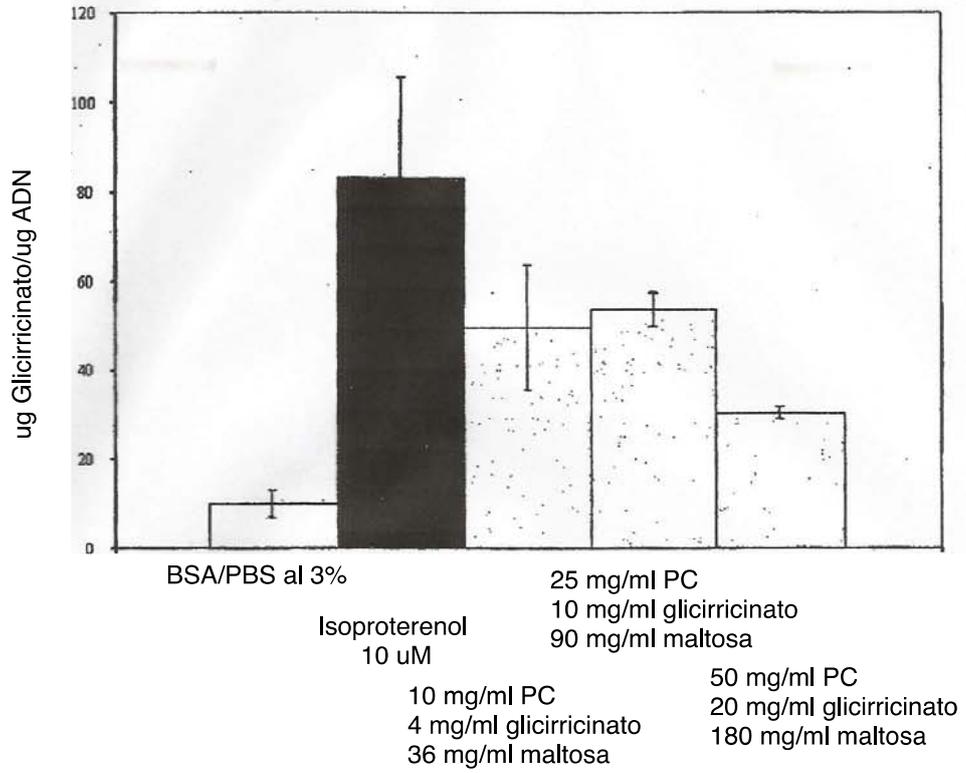
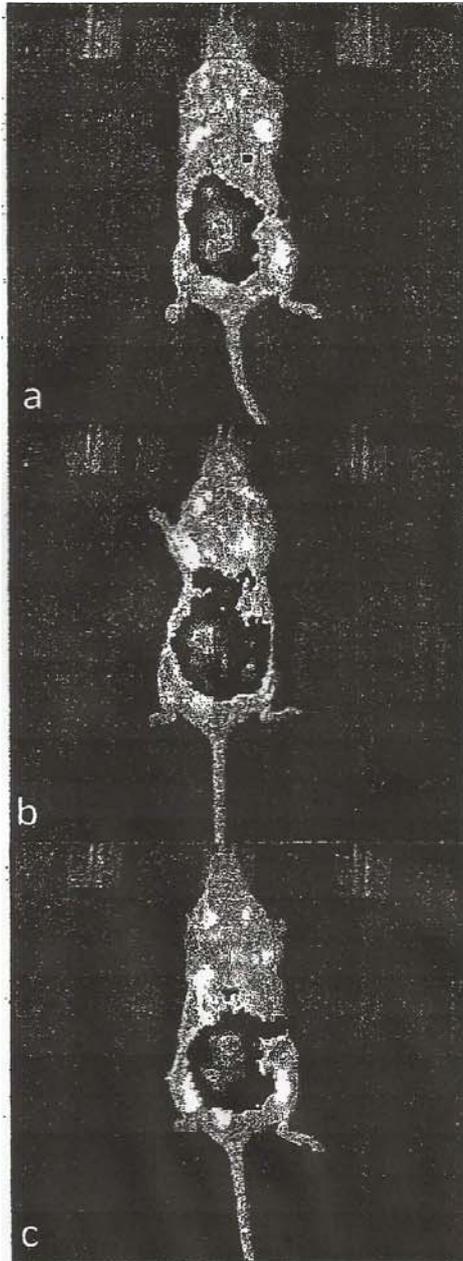


Fig. 8 (a - c)



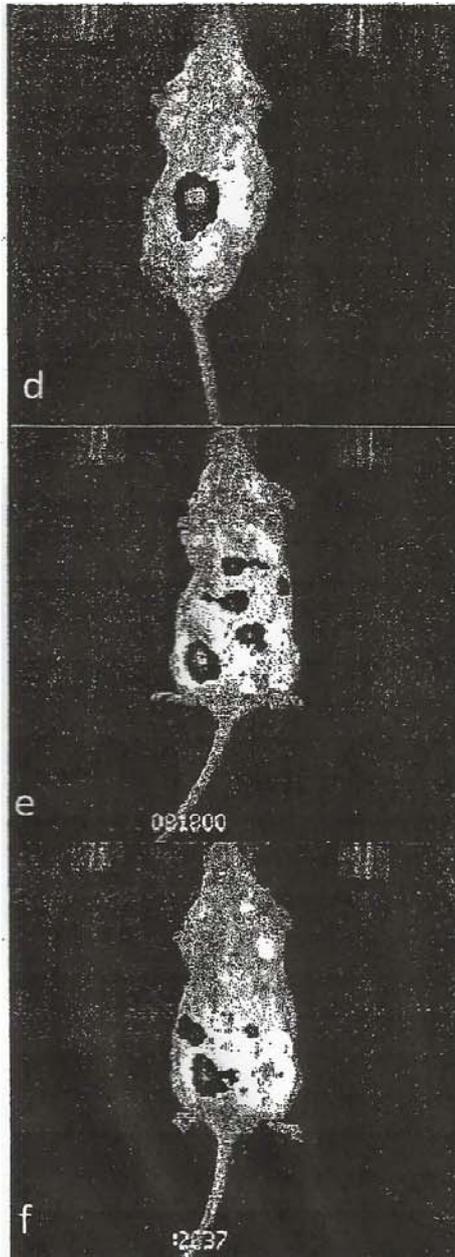
Recuentos

Escala cromática

Min = 330

Máx. = 13540

Fig. 8 (d - f)



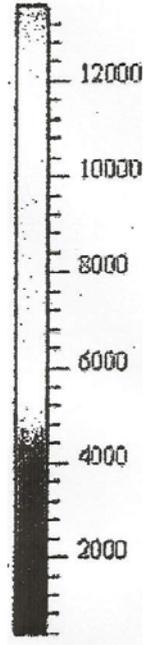
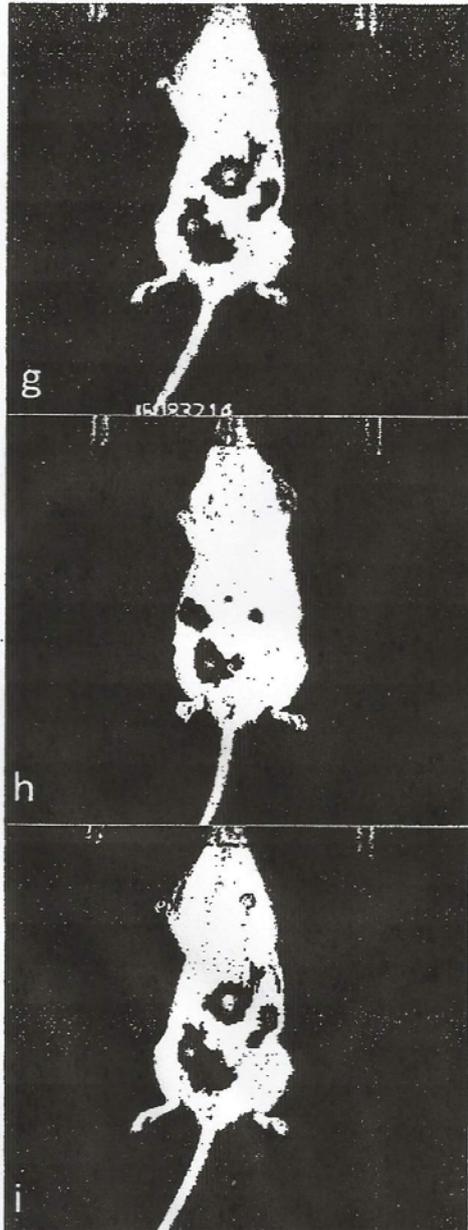
Recuentos

Escala cromática

Min = 330

Máx. = 13540

Fig. 8 (g - i)



Recuentos

Escala cromática

Min = 330

Máx. = 13540

Fig. 9

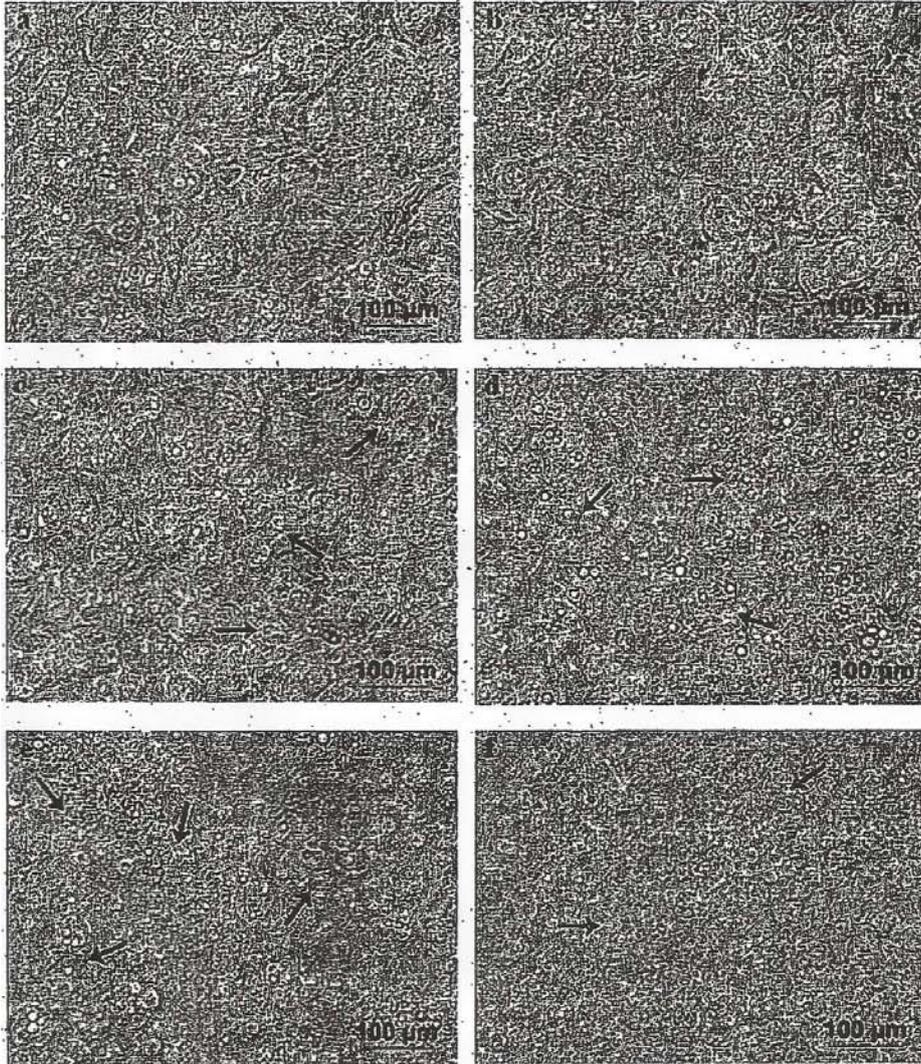
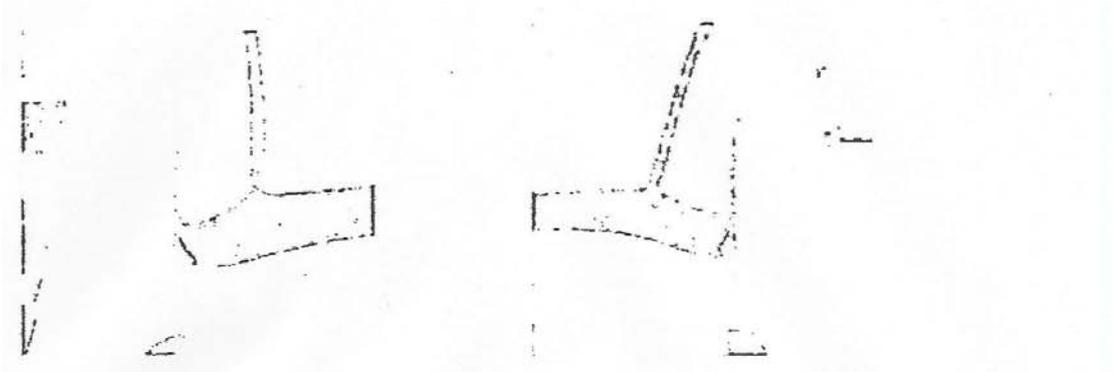


Fig. 10



Brazo izquierdo
(Phosphogliv)

Brazo derecho
(Lipostabil)

Fig. 11



Brazo izquierdo
(Phosphogliv)

Brazo derecho
(Lipostabil)