(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 541 299**

(51) Int. CI.:

A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01)
A61K 8/90 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09760220 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2349188**

(54) Título: **Soluciones salinas acuosas para la destrucción de tejidos grasos**

(30) Prioridad:

27.10.2008 FR 0805960

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2015

(73) Titular/es:

LIPOLYANE (100.0%)
14 chemin de la Pomme
69160 Tassin La Demi Lune, FR

(72) Inventor/es:

CRASSAS, YVES y
BLACHE, DENIS

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Soluciones salinas acuosas para la destrucción de tejidos grasos.

La presente invención se refiere a unas soluciones salinas acuosas susceptibles de ser utilizadas para la destrucción de tejidos grasos, en particular unas soluciones hipotónicas. A pesar de los cuidados dietéticos particulares y/o una práctica deportiva regular, se puede observar en algunas personas una acumulación de grasa antiestética (habitualmente denominada celulitis). Esta tendencia es la consecuencia de las modificaciones del estilo de vida, lo que conduce también a un aumento general del sobrepeso, incluso de la obesidad, por acumulación localizada de grasas de reserva.

A este respecto, en el marco de la presente invención, el término "celulitis" designa, de acuerdo con el lenguaje habitual, una celulitis estética, es decir una hipertrofia del tejido adiposo generalmente muy localizado que forma unos hoyuelos denominados "piel de naranja".

La celulitis es, en efecto, una hiperlipodistrofia superficial, mientras que la esteatomería corresponde a una hiperlipodistrofia localizada y más profunda.

Cabe señalar que desde un punto de vista anatómico, existe bajo la piel (que se compone de la epidermis y de la dermis) tres capas de grasa:

- la capa más superficial, situada en la hipodermis, está organizada en cámaras grasas separadas entre sí por unos tabiques conjuntivos elásticos. Esta capa de "grasa hipodérmica", cuyo metabolismo está principalmente bajo control hormonal, es responsable de la aparición de la celulitis; y después
- bajo la hipodermis, dos capas de grasa de reserva, cuyo metabolismo está esencialmente bajo control de la genética y del estilo de vida (alimentación, actividad física), a saber:
    - la "grasa paralela" que presenta un grosor variable según la corpulencia del paciente. Esta grasa es particularmente sensible al régimen,
    - una grasa aún más profunda, denominada "grasa esteatomérica" o "grasa de estructura". Su distribución sobre el organismo es irregular y varía según los individuos. Esta grasa es muy resistente al régimen y es responsable de las irregularidades de la silueta, como las cartucheras.

Una de las técnicas actuales para tratar la acumulación importante de tejidos adiposos es la liposucción, acto quirúrgico muy practicado, pero que no está exento de riesgos, en particular vitales para los pacientes obesos. La liposucción necesita en efecto una larga anestesia y deja un gran número de cicatrices perjudiciales en el plano estético. Por lo tanto, es fácil entender la popularidad de las técnicas no quirúrgicas, en particular para reducir la presencia de excesos localizados de tejidos adiposos.

La adipocitólisis representa actualmente una de estas técnicas no quirúrgicas. Se utiliza como tratamiento no quirúrgico definitivo de las esteatomerías, pero también de la celulitis estética, actuando directamente sobre el tejido adiposo por ruptura de la membrana celular de los adipocitos.

Esta técnica se basa en el efecto de presión osmótica, cuya unidad física de medición es el osmol (OSM), expresado en mol por litro. Así, cuando un mol de una sustancia se disuelve en un litro de agua, ésta ejerce una presión osmótica de un osmol. La osmolaridad es la concentración en sustancia disuelta que ejerce un poder osmótico. Por ejemplo, la osmolaridad del plasma está considerada como estando comprendida entre 280 mOsm/l y 330 mOsm/l, la del citoplasma celular es de 394 mOsm/l. Así, los términos "hipotonía", "isotonía" e "hipertonía" se utilizan en la presente memoria para designar respectivamente un compartimiento cuya osmolaridad es inferior, igual y superior a la osmolaridad del plasma.

Más precisamente, el efecto lítico de esta técnica de adipocitólisis se obtiene por la combinación de efectos fisicoquímicos y biofísicos. Empieza en primer lugar por la inyección intra-grasa de una solución muy hipotónica (entre 60 mOsm/l y 90 mOsm/l). Esta inyección crea una diferencia de presión osmótica a uno y otro lado de la membrana (semi-permeable) de los adipocitos, lo que provoca su hiperhidratación, debido a un flujo de líquido desde el compartimiento de más baja osmolaridad (el líquido intersticial) hacia el compartimiento de más alta osmolaridad (el citoplasma de los adipocitos). Esto conduce al aumento del volumen de los adipocitos, así como a la debilitación de su membrana, incluso a lesiones celulares. La destrucción de los adipocitos se completa después por un tratamiento biofísico ligero, tal como la aplicación de un campo ultrasonoro transcutáneo. La lesión, y después la destrucción de los adipocitos provoca una liberación de grasas, así como de los triglicéridos, ácidos grasos libres y otros contenidos celulares en el plasma, que serán degradados por el hígado para ser eliminados. Los restos celulares son soportados por los monocitos y los macrófagos.

La patente FR 2 876 907 A1 intenta remediar los inconvenientes, que son en particular los de la repetición de

inyecciones de soluciones muy hipotónicas, del recurso a una liposucción complementaria, y esto gracias a la administración de una solución iso- o hipotónica e hipercaliémica, previamente al tratamiento estético por adipocitólisis antes mencionado. Esto presenta la ventaja de disminuir el volumen de los adipocitos, y así tener como diana un máximo de células al mismo tiempo durante la etapa de inyección intra-grasa de la solución muy hipotónica. Esta patente divulga además una sinergia de acción entre una solución isotónica hipercaliémica, o una solución hipotónica eventualmente hipercaliémica con ciertas sustancias, tales como el tiratricol (ácido triiodotiroacético) o un compuesto anfótero tal como la fosfatidilcolina.

Sin embargo, uno de los problemas principales de esta técnica de adipocitólisis sigue siendo la optimización de la composición de las soluciones muy hipotónicas. En efecto, la inyección de soluciones hipotónicas, incluso muy hipotónicas puede hacer aumentar el volumen de los adipocitos, pero sin conducir necesariamente a su rotura, haciendo así ineficaz el tratamiento por adipocitólisis.

Es por ello que la presente invención se propone resolver el problema de una lisis eficaz de las membranas de los adipocitos cuando tiene lugar un tratamiento de la esteatomería, de la celulitis, así como del lipoma que consiste en un tratamiento por adipocitólisis.

Los inventores han desarrollado unas soluciones salinas acuosas que tienen una osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 mOsm/l y 100 mOsm/l que comprenden además por lo menos un fragilizante membranario.

En el marco de la presente invención, se entiende por fragilizante membranario, un compuesto que es apropiado para ejercer una acción fragilizante sobre la membrana de células, en particular de los adipocitos. Dichos compuestos deben ser potentes solubilizantes de la bicapa de lípidos de los cuales están constituidas las membranas de las células. Para ello, estos compuestos se insertan en la bicapa de lípidos con el fin de desestabilizarla, mediante la creación de poros, y desorganizarla; lo cual tiene como consecuencia la lisis de las células. Las publicaciones siguientes:

- "Current techniques for single-cell lysis", J.R. Soc. Interface (2008) 5, S131-S138, de BROWN *et al*.
- "Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants" Biochim Biophys Acta (2000); 1508: 146-63, de ALMGREN,

detallan más ampliamente el modo de acción de estos fragilizantes membranarios descritos anteriormente.

El fragilizante membranario se puede seleccionar de entre los detergentes iónicos, los detergentes no iónicos, los detergentes zwitteriónicos, y unos derivados del glicerol.

A título de ejemplos, entre los detergentes no iónicos, se pueden citar en particular:

- los alquilglucósidos tales como el n-octil-beta-D-glucopiranósido,
- las glucamidas, tales como la N,N'-Bis(3-D-gluconamidopropil)colamida), conocida bajo la denominación comercial Big CHAP,
- los polioxietilenos tales como los poloxámeros, el 2,3-dihidroxipropiloctanoato (TWEEN® 20), el 2-[4-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)fenoxi]etanol (TRITON® X 100), el 2-dodecoxietanol (Brij® 35).

Entre los detergentes iónicos, se pueden citar en particular las sales de ácidos biliares y sus derivados, así como las sales de alquilamonio, los derivados de ácidos grasos de los aminoácidos, las carnitinas, los derivados glicéridos de aminoácidos, los acil-lactilatos, los ésteres de ácido tártrico mono-, di-acetilado de mono- y di-glicéridos, los monoglicéridos succinoilados, los ésteres de ácido cítrico de mono- y di-glicéridos, las sales de alginato, el alginato de propilenglicol, las lecitinas y lecitinas hidrogenadas, las lisolecitinas y las lisolecitinas hidrogenadas, los lisofosfolípidos y sus derivados, los fosfolípidos y sus derivados, las sales de alquilsulfatos, las sales de ácidos grasos, el docusato de sodio.

Entre los detergentes zwitteriónicos, se pueden citar en particular el 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato, el N-tetradecil-N,N-di-metil-3-amonio-1-propanosulfonato, la laurildimetilbetaína.

Los inventores han descubierto que la adición a unas soluciones salinas acuosas de osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l de estos diferentes fragilizantes membranarios tiene una acción fragilizante sobre la membrana de los adipocitos, y más particularmente cuando la osmolaridad es de 60 mOsm/l. Así, estas soluciones salinas acuosas permiten favorecer la lisis de los adipocitos durante su inyección intra-grasa durante un tratamiento de la celulitis, de la esteatomería, así como del lipoma que puede consistir en un tratamiento por adipocitólisis.

De manera preferida, se utilizan las sales de ácidos biliares y los poloxámeros como fragilizantes membranarios;

siendo los poloxámeros muy particularmente preferidos.

Los inventores han descubierto el efecto sinérgico entre las sales de ácidos biliares y/o los poloxámeros en soluciones de osmolaridad comprendidas entre 50 y 170 mOsm/l para favorecer la lisis de los adipocitos, y más particularmente cuando la osmolaridad es de 60 mOsm/l.

Las sales de ácido biliar constituyen una amplia familia de moléculas, que tienen la estructura de un esteroide (a saber un hidrocarburo tetracíclico) que comprende una cadena lateral que comprende de cinco a ocho átomos de carbono y que se termina con una función carboxilato.

En el marco de la presente invención, las sales de ácido biliar se pueden seleccionar de entre las sales siguientes: el desoxicolato de sodio (DC), el tauro-desoxicolato de sodio (TDC), el litocolato de sodio (LC) y el tauro-licolato de sodio (TLC) o también la sal de ácido cólico, la sal de ácido quenodesoxicólico, la sal de ácido 7-alfa-deshidroxilato quenodesoxicólico, la sal de ácido ursodesoxicólico, la sal de ácido dihidroxitáurico, la sal de ácido trihidroxitáurico, y las sales de sus conjugados de glicina.

De manera preferida, se seleccionan el TDC y el TLC como sal de ácido biliar.

Las sales de ácido biliar están presentes en las soluciones salinas acuosas según la invención a una concentración comprendida entre 50 µM y 3000 µM, preferentemente entre 50 µM y 1000 µM, aún más preferentemente entre 150 µM y 750 µM.

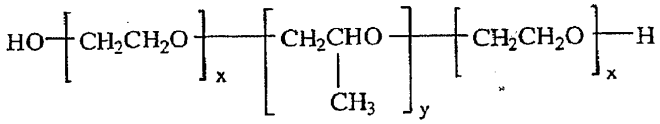
La estructura de los poloxámeros (también conocidos bajo el nombre comercial de bloques de copolímero Pluronic® y comercializado por la compañía BASF) añadidos a las soluciones salinas acuosas, según la invención, se describe en la publicación de A. KABANOV, titulada "Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy", publicada en Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 223-233. Se trata de bloques de óxido de etileno (EO) y de óxido de propileno (PO) dispuestos según la estructura tri-bloque siguiente: EO_x - PO_y - EO_x.

Esta disposición conduce a un copolímero anfífilo, en el que el número de unidades EO(x) hidrófilos y el número de unidades PO(y) hidrófobos pueden ser modificados para variar en tamaño, en hidrofilicidad y lipofilicidad. Estos poloxámeros, conocidos por su ausencia de toxicidad, se utilizan habitualmente por sus propiedades tensioactivas.

A continuación, se entenderá por:

- "parte hidrófila del poloxámero": el conjunto de los bloques EO de dicho poloxámero,
- "parte hidrófoba del poloxámero": el conjunto de los bloques PO de dicho poloxámero.

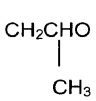
La fórmula estructural de los poloxámeros es la siguiente (I):



(I)

Fórmula en la que x e y representan unos números enteros.

En la fórmula (I) anterior:

- el bloque CH_2CH_2O es por lo tanto el bloque denominado antes EO,
- el grupo  es por lo tanto el bloque denominado antes PO.

Unos ejemplos de poloxámeros pueden ser los compuestos siguientes, disponibles en la compañía BASF:

- Pluronic® L61 EO_2- PO_{30} - EO_2 PM = 1950,
- Pluronic® P85 EO_{26}- PO_{40}- EO_{26} PM = 4600.

La nomenclatura de estos poloxámeros Pluronic® se detalla en el apéndice A de la publicación de KABANOV citada anteriormente. Las letras "F", "L", "P" indican respectivamente un estado sólido, líquido o pastoso del poloxámero. Las cifras indicadas definen los parámetros estructurales de estos polímeros. Así, la última cifra indica aproximadamente el contenido en peso de la parte hidrófila del poloxámero, expresada en "decenas". Por ejemplo, si la última cifra es 8, esto significa que la parte hidrófila representa el 80% del peso del poloxámero. Las otras cifras restantes (uno o dos) son indicativas de la masa molar de la parte hidrófobo del poloxámero. Para eso, se trata de

multiplicar el número que corresponde por 300 con el fin de obtener la masa molecular aproximativa, expresada en Da.

A título de ejemplo de nomenclatura, el poloxámero F127 está en estado sólido, la masa de la parte hidrófoba de este poloxámero es de 3600 Da (12 x 300), y la parte hidrófila representa el 70% del peso del poloxámero.

Según la publicación de I.R. SCHMOLKA, titulada "A review of block polymer surfactants", y publicada en *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54 (1977) 110-116, los poloxámeros pueden ser sintetizados por polimerización secuencial de monómeros PO y EO, en presencia de un catalizador alcalino, tal como el hidróxido de sodio o de potasio.

En el marco de la presente invención, se puede utilizar por lo menos un poloxámero de fórmula estructural (I) tal como se ha definido anteriormente, que comprende una parte hidrófila y una parte hidrófoba, siendo x e y seleccionados de manera que la parte hidrófila represente del 10 al 80% en peso del poloxámero, preferentemente del 30 al 50%, y que el HLB ("balance hidrofílico/lipofílico") sea inferior a 35, preferentemente inferior a 20. Los valores de HLB se determinan mediante el procedimiento descrito en la publicación *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41 (1964): 169, cuyos autores son BECHER, P. et BIRKMEIER R.L., que utiliza una cromatografía sobre columna cuyo disolvente es una mezcla de *n*-hexanol y de etanol.

Así, en el marco de la presente invención, los poloxámeros comercializados por la compañía BASF, que son Pluronic®: L31, L35, F38, L42, L43, L44, L61 a L64, L72, P75, F77, L81, P75, P84, P85, F87, F88, L92, F98, L101, P103 a P105, F108, L121, L122, P123, pueden estar presentes en las soluciones salinas acuosas según la invención, y cuyas características del peso en % de la parte hidrófila y el HLB se presentan en la tabla siguiente:

Tabla 1: Características del % de la parte hidrófila y del HLB de poloxámeros.

Pluronic®	HLB	% de parte hidrófila
L31	5	10
L35	19	50
F38	31	80
F68	29	80
L42	8	20
L43	12	30
L44	16	40
L61	3	10
L62	7	20
L63	11	30
L64	15	40
L72	17	20
P75	14	50
P84	14	40
P85	16	50
F87	24	70
F88	28	80
L92	6	20
F98	28	80
L101	1	10
P103	9	30
P104	13	40
P105	15	50
F108	27	80
L121	1	10
L122	4	20
P123	8	30

La invención se refiere a una solución salina acuosa tal como se ha descrito anteriormente, en la que el poloxámero se selecciona de entre los poloxámeros de la fórmula (I), que tienen:

- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero, y el HLB es de 16,
- una parte hidrófila que representa el 10% del poloxámero, y el HLB es de 3,
- una parte hidrófila que representa el 20% del poloxámero, y el HLB es de 7,
- una parte hidrófila que representa el 30% del poloxámero, y el HLB es de 11,
- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero, y el HLB es de 15,
- una parte hidrófila que representa el 50% del poloxámero, y el HLB es de 14,
- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero, y el HLB es de 14, y

- una parte hidrófila que representa el 50% del poloxámero, y el HLB es de 16,
- una parte hidrófila que representa el 30% del poloxámero, y el HLB es de 8.

De manera apropiada, se utilizan preferentemente los poloxámeros Pluronic®:

- L44, cuya parte hidrófila representa el 40% en peso del poloxámero, y el HLB es de 16,
- L61, cuya parte hidrófila representa el 10% en peso del poloxámero, y el HLB es de 3,
- L62, cuya parte hidrófila representa el 20% en peso del poloxámero, y el HLB es de 7,
- L63, cuya parte hidrófila representa el 30% en peso del poloxámero, y el HLB es de 11,
- L64, cuya parte hidrófila representa el 40% en peso del poloxámero, y el HLB es de 15,
- P75, cuya parte hidrófila representa el 50% en peso del poloxámero, y el HLB es de 14,
- P84 cuya parte hidrófila representa el 40% en peso del poloxámero, y el HLB es de 14,
- P85, cuya parte hidrófila representa el 50% en peso del poloxámero, y el HLB es de 16,
- P123, cuya parte hidrófila representa el 30% en peso del poloxámero, y el HLB es de 8.

Según la presente invención, los poloxámeros Pluronic® P85, L61 y 64 son unos poloxámeros preferidos. Ventajosamente, se utiliza un poloxámero de fórmula (I) que tiene una parte hidrófila que representa el 30% en peso del poloxámero, y el HLB es de 8, y preferentemente el Pluronic® P123.

Los poloxámeros pueden estar presentes en las soluciones salinas acuosas según la invención, a una concentración comprendida entre el 0,001% y el 5% en peso/volumen, preferentemente entre el 0,1% y el 1%.

Un objeto de la presente invención es una solución salina acuosa que tiene una osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 mOsm/l y 100 mOsm/l, que comprende por lo menos una sal de ácido biliar.

Otro objeto de la presente invención es una solución salina acuosa que tiene una osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 mOsm/l y 100 mOsm/l, que comprende por lo menos un poloxámero.

Otro objeto de la presente invención es una solución salina acuosa que tiene una osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 mOsm/l y 100 mOsm/l, que comprende por lo menos un poloxámero y por lo menos una sal de ácido biliar.

Se conocen a partir del documento WO 2005/063169 A2 y del documento WO 2005/041919 A2, unas soluciones acuosas que contienen por lo menos un fosfolípido y/o por lo menos un ácido biliar, que pueden ser utilizadas en la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de la acumulación de tejidos adiposos. Se precisa además que estas soluciones pueden ser diluidas en una solución salina. La osmolaridad de las soluciones acuosas no se precisa de ninguna manera en estos documentos, en particular, no se indica de ninguna manera la necesidad de que las soluciones sean hipotónicas. Sin embargo, se conoce en el campo médico que una solución salina (por ejemplo una solución de NaCl a una concentración de 9 g/l) puede consistir en un líquido fisiológico, a saber un líquido que presenta una osmolaridad parecida a los principales fluidos corporales, tales como la sangre, por lo tanto del orden de 300 mOsm/l.

En el marco de la presente invención, las soluciones salinas acuosas mencionadas anteriormente pueden ser unas soluciones que contienen esencialmente las sales de NaCl, $NaHCO_3$, de $MgCl_2$, que tienen unas concentraciones que pueden estar respectivamente comprendidas entre 10 y 25 mmoles/l, 5 y 15 mmoles/l, y 0,5 y 5 mmoles/l.

Además, las soluciones salinas acuosas según la invención están desprovistas de sales de potasio. En efecto, la presencia de potasio puede llegar a ser dolorosa y peligrosa, en particular en los pacientes que presentan una cardiopatía.

Además, de manera preferida, la solución salina acuosa según la invención contiene magnesio; permitiendo este elemento luchar contra un estrés oxidante e inflamatorio que puede producirse durante un tratamiento por adipocitólisis.

En el marco de la presente invención, otras sustancias pueden estar presentes en las soluciones salinas acuosas según la invención, o ser añadidas de manera extemporánea. Puede tratarse de adrenalina, de un anestésico tal como la lidocaína.

La adrenalina puede tener una concentración comprendida entre 0,5 y 2 mg/l. El anestésico tal como la lidocaína puede tener una concentración comprendida entre el 1 y el 5% en peso/volumen.

De manera preferida, las soluciones salinas acuosas según la invención comprenden adrenalina a una concentración de 1 mg/l y lidocaína a altura del 2% en peso/volumen.

La mezcla de estas sustancias con los ácidos biliares y los poloxámeros es muy apreciable. En efecto, se observa una sinergia entre estos compuestos y las sustancias antes mencionadas, lo que permite poder disminuir las concentraciones de los compuestos que son la sal de ácido biliar y el poloxámero. Así, se ha podido disminuir la concentración en sal de ácido biliar del orden del 50% para obtener el mismo efecto de lisis de los adipocitos.

La presente invención tiene también por objeto la utilización de una solución salina acuosa según la invención como medicamento.

La presente invención se refiere también a la utilización no terapéutica de una solución salina acuosa según la invención para realizar la lisis de los adipocitos.

La presente invención se refiere también a una composición cosmética que se caracteriza por que comprende una solución salina acuosa según la invención.

La invención se refiere también a la utilización de una composición cosmética según la invención para el tratamiento no terapéutico de la celulitis, de la esteatomería, así como del lipoma.

Por otro lado, la invención se refiere también a la utilización de una solución salina acuosa según la invención, para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de la celulitis, de la esteatomería así como del lipoma.

La presente invención se refiere también a un dispositivo médico para el tratamiento de la celulitis, de la esteatomería así como del lipoma.

La presente invención se refiere asimismo a un método de tratamiento estético que consiste en la administración de una solución salina acuosa según la presente invención, con el fin de poder actuar en particular sobre la celulitis, la esteatomería, así como sobre un lipoma. Dicha administración se puede realizar mediante un método de inyección intra-grasa. La administración de la solución salina acuosa según la invención se puede realizar en todas las capas de grasa descritas antes, a saber:

- la grasa hipodérmica,
- la grasa paralela, y
- la grasa esteatomérica.

De manera preferida, la administración de la solución salina acuosa según la invención se efectúa en la capa de grasa esteatomérica, que es la más profunda.

Esto es particularmente ventajoso, ya que esta capa de grasa profunda puede perfectamente ser alcanzada y por lo tanto tratada gracias a la administración de la solución salina acuosa según la invención, mientras que es muy poco sensible a los tratamientos dietéticos.

Así, el método de tratamiento estético según la presente invención es particularmente adecuado para las capas de grasas, tales como la capa de grasa esteatomérica, para las cuales los métodos de régimen habituales siguen siendo ineficaces, y por lo tanto para los cuales no se dispone actualmente de ningún método válido que permita destruir estos tejidos adiposos profundos.

El método de tratamiento estético según la invención permite aportar una corrección eficaz y relativamente duradera de la silueta.

La presente invención se refiere a un método de tratamiento estético que consiste en la inyección intra-grasa de una solución salina acuosa según la invención, a saber una solución salina acuosa de osmolaridad que puede estar comprendida entre 50 y 170 mOsm/l, preferentemente comprendida entre 50 y 100 mOsm/l, y de manera particularmente preferida ser de 60 mOsm/l, y que puede comprender además de por lo menos una sal de ácido biliar y/o por lo menos un poloxámero, tales como se han descrito anteriormente, por lo menos una de las sustancias tales como la adrenalina o un anestésico tal como la lidocaína.

En un modo de realización de la invención, la administración se puede realizar de la siguiente manera:

- después de la anestesia local por pequeñas inyecciones epidérmicas de la solución según la invención que contiene lidocaína (del orden de 100 µl),

- la solución según la invención se inyecta en subcutáneo en el tejido adiposo diana, y esto a diferentes profundidades de inyección, pero siempre por el mismo punto de inyección.

Así, se puede administrar por inyección hasta aproximadamente un volumen final de un litro, y distribuir de manera homogénea en las zonas a tratar, que pueden ser los muslos, las caderas, el abdomen o también los brazos.

Más precisamente, después de la localización previa por curvas concéntricas de las zonas a tratar y de los puntos de inyección, dichas inyecciones se efectúan en un periodo que se puede extender de 20 a 30 minutos, por método manual o eventualmente automático.

El método de tratamiento estético no terapéutico según la invención, para ser totalmente eficaz, se puede completar por un tratamiento con ultrasonidos (no focalizados a bajas frecuencias, preferentemente a 0,4 MHz) durante un periodo de 15 a 20 minutos, con la ayuda de un aparato especialmente adaptado. Esto permite así obtener mejores resultados para el tratamiento estético según la invención.

En otro modo de realización de la invención, las sustancias tales como la adrenalina o un anestésico tal como la lidocaína no están presentes en la solución salina acuosa según la invención, pero pueden ser mezcladas extemporáneamente a la inyección intra-grasa con una solución salina acuosa según la invención.

Los ejemplos siguientes permitirán ilustrar la presente invención sin limitar por ello su alcance.

Descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que presenta el diámetro de adipocitos incubados en presencia de soluciones salinas acuosas de osmolaridades: 300 mOsm/l, 150 mOsm/l, 90 mOsm/l en función del tiempo.

La figura 2 es un gráfico que representa la evolución del número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en las soluciones salinas acuosas de osmolaridades de 90, 150 y 300 mOsm/l.

La figura 3 es un gráfico que representa el diámetro de los adipocitos incubados en una solución de osmolaridad de 300 mOsm/l) y de 150 mOsm/l en presencia de TDC, a una concentración de 500 µM en función del tiempo de incubación.

La figura 4 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l, que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

La figura 5 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 90 mOsm/l,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 90 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

La figura 6 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa de osmolaridad de 90 mOsm/l que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

La figura 7 es un gráfico que representa la actividad de LDH en función del tiempo durante la incubación de adipocitos en respectivamente:

- una solución de osmolaridad de 300 mOsm/l,

- una solución de osmolaridad de 150 mOsm/l,

- una solución de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende TDC, a una concentración de 500 µM,

La figura 8 es un gráfico que representa el número de adipocitos presentes en el medio de cultivo en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende TDC a una concentración de 500 µM,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05%,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05% y TDC a una concentración de 500 µM.

La figura 9 es un gráfico que representa el número de adipocitos presentes en el medio de cultivo en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende TDC a una concentración de 500 µM,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05%,

- una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05% et du TDC a una concentración de 500 µM.

La figura 10 es un gráfico que representa la actividad de LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función de la concentración y de la naturaleza de poloxámero presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l, y esto después de una hora a 37°C.

La figura 11 es un gráfico que representa la actividad de LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función del tiempo y en función de la elección del poloxámero presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l a una concentración del 0,1%.

La figura 12 es un gráfico que representa la actividad de LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos al cabo de una hora en función de la concentración en sal biliar DC presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l.

La figura 13 es un gráfico que representa la actividad de LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función del tiempo de una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende el DC como sal de ácido biliar y a una concentración de 750 µM.

La figura 14 es un gráfico que representa la actividad de LDH después de una hora en función de la osmolaridad de una solución salina acuosa.

La figura 15 representa un diagrama de la actividad de la LDH después de una hora, para:

A: una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende el 0,1% de P123,

B: una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende 750 µM de DC,

C: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l,

D: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende 750 µM de DC,

E: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende el 0,1% de P123,

F: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende el 0,1% de P123 y 750 µM de DC.

Ejemplos:

A - Resultados experimentales obtenidos a partir de tejidos adiposos de ratones:

Se señala que los ejemplos de esta parte A se refieren a unos ensayos *in vitro* que utilizan unos tejidos adiposos de ratones; esto significa que las células son sumergidas en el medio de cultivo representativo de una solución salina acuosa según la invención. Con una osmolaridad más baja, la lisis de los adipocitos durante un ensayo *in vitro* habría sido demasiado rápida y por lo tanto no se habría podido evaluar por recuento, por ejemplo, de los adipocitos a lo largo del tiempo.

Es por esta razón que la osmolaridad de este medio de cultivo descrito a continuación se limitó a unos valores superiores o iguales a 90 mOsm/l y se utilizó como modelo representativo de la situación *in situ* que se obtiene durante la aplicación de la invención sobre unos tejidos adiposos *in situ*.

Preparación de los adipocitos:

Se han preparado unos adipocitos a partir de tejidos adiposos de ratones de la siguiente manera. Se extraen unos tejidos adiposos en condiciones asépticas sobre unos animales anestesiados, después se cortan finamente y se someten a un tratamiento disociante enzimático por colagenasa de tipo II a 37ºC. La mezcla de incubación se centrifuga después para eliminar los restos de tejidos. Los adipocitos se purificaron por filtración en condiciones estériles sobre un filtro de nylon de 160 µm. Después de una centrifugación suave, los adipocitos se lavaron a partir de una solución tampón de fosfato de pH 7,4 y, después del recuento, se recogen en un medio de cultivo celular adecuado de tipo Dubelco Modified Eagle's Medium o DMEM, y finalmente se disponen en frascos de cultivo e incubadora estériles a 37ºC adaptados a los experimentos.

Tratamiento de los adipocitos preparados con una solución según la invención:

Los adipocitos así preparados se ensayaron durante una hora en diferentes soluciones salinas acuosas que comprenden unos compuestos utilizados habitualmente para el cultivo celular, tales como unos aminoácidos, unos antibióticos y de osmolaridad respectivamente:

- normal, es decir 300 mOsm/l,
- hipotónica, es decir 150 mOsm/l,
- muy hipotónica, 90 mOsm/l.

y en los que se añadieron:

- o bien una sal de ácido biliar seleccionada de entre: el desoxicolato de sodio (DC), el litocolato de sodio (LC), el tauro-desoxicolato de sodio (TDC), el tauro-litocolato de sodio (TLC), a unas concentraciones que varían de 100 µM a 750 µM,

- o bien un poloxámero, a concentraciones comprendidas entre el 0,02% y el 1,5%,

- o bien una combinación de ácidos biliares y de poloxámeros a concentraciones en los intervalos antes citados.

Las condiciones de utilización de los parámetros antes evocados se han establecido a partir de esquemas experimentales.

El significado de los resultados obtenidos de estudió con la ayuda de métodos estadísticos para la comparación de las medias, y mediante análisis de varianza (ANOVA), seguidas de ensayos adecuados (ensayo de Dunett y de Bonferroni para las comparaciones múltiples).

Examen de los adipocitos tratados:

Determinación del número de células y de su diámetro:

Las células grasas se examinaron entonces bajo microscopio invertido en condiciones apropiadas (aumentos idénticos x200, recuento sobre 50 células) para medir su diámetro en función del tiempo de exposición. Se han tomado unas fotos a intervalos de tiempo precisos (a t = 0, 15, 30 y 45 min.), con el fin de determinar por mediciones automáticas el número de células y el diámetro de los adipocitos. La medición de la variación del diámetro de los adipocitos ha permitido apreciar el hinchamiento de los adipocitos, por lo tanto apreciar la eficacia del tratamiento según la invención frente al fenómeno de hiperhidratación.

La lisis celular se apreció, por un lado, mediante la variación del número de adipocitos y, por otro lado, por la determinación de una enzima intracelular liberada en el medio de cultivo, la láctico-deshidrogenasa (a continuación

abreviada LDH), expresada en porcentaje con respecto a unas condiciones para las cuales la lisis celular es total (obtenida en presencia de agua destilada) y por comparación con las condiciones de cultivo celulares.

A continuación se presentan algunos de los resultados obtenidos a partir de las diferentes combinaciones de los parámetros antes mencionados.

Efecto de la hipotonicidad sola:

La figura 1 es un gráfico que representa el diámetro (expresado en µm) de los adipocitos incubados en presencia de soluciones salinas acuosas de las osmolaridades antes mencionadas, a saber isotónica (300 mOsm/l) o hipotónica (150 mOsm/l, y muy hipotónica (90 mOsm/l), para diferentes tiempos de incubación (expresados en minutos).

Se observa un aumento progresivo del diámetro de los adipocitos durante su incubación en soluciones hipotónicas (150 y 90 mOsm/l) con respecto al de la incubación en una solución isotónica. El aumento del diámetro (comprendido entre 50 y 85) es relativamente rápido y alcanza una constante a alrededor de los 45 minutos. Se muestra también que estos aumentos del diámetro que traducen un hinchamiento celular durante la incubación en las soluciones salinas acuosas son más rápidos para una solución muy hipotónica 90 mOsm/l que para una solución hipotónica de 150 mOsm/l.

La figura 2 es un gráfico que representa la evolución del número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en las soluciones salinas acuosas antes mencionadas del gráfico de la figura 1, a saber de osmolaridad de 90, 150 y 300 mOsm/l.

Se observa en este gráfico de la figura 2 que cuanto más baja sea la osmolaridad de la solución de incubación de los adipocitos, más rápidamente disminuye el número de adipocitos.

Estas primeras mediciones del efecto de la hipotonicidad sobre los adipocitos y reunidas en los gráficos de las figuras 1 y 2 servirán de comparativo con las mediciones obtenidas a partir de la asociación de una solución isotónica o hipotónica con una sal de ácido biliar.

Efecto acumulado de la sal del ácido biliar y de la hipotonicidad sobre el diámetro de los adipocitos:

La figura 3 es un gráfico que representa el diámetro de los adipocitos incubados en una solución isotónica (300 mOsm/l) y en una solución hipotónica (150 mOsm/l) en presencia de TDC, a una concentración de 500 µM, para diferentes tiempos de incubación (expresados en minutos).

Se observa que la presencia de sal de ácido biliar en una solución isotónica o hipotónica no hace variar significativamente el diámetro de los adipocitos con respecto a las soluciones isotónicas o hipotónicas solas.

Efecto acumulado de una sal de ácido biliar y de la hipotonicidad sobre el diámetro de los adipocitos:

La figura 4 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l),
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l),
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l), que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

Se observa que el número de adipocitos disminuye más rápidamente y de manera más importante cuando la solución salina acuosa hipotónica comprende una sal de ácido biliar con respecto a una misma solución salina acuosa, pero desprovista de esta sal de ácido biliar. Esto demuestra el efecto de la presencia de una sal de ácido biliar en una solución salina acuosa según la invención sobre la lisis de los adipocitos.

La figura 5 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l),
- una solución salina acuosa muy hipotónica (90 mOsm/l),
- una solución salina acuosa muy hipotónica (90 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

Se observa que el número de adipocitos disminuye más rápidamente y de manera más importante cuando la solución salina acuosa muy hipotónica comprende una sal de ácido biliar con respecto a una misma solución salina acuosa desprovista de sal de ácido biliar. Esto demuestra el efecto de la presencia de una sal de ácido biliar en una

solución salina acuosa según la invención sobre la lisis de los adipocitos.

La figura 6 es un gráfico que representa el número de adipocitos en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l),
- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa muy hipotónica (90 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM.

Se observa también que, cuando la solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l) contiene una sal de ácido biliar, el número de adipocitos disminuye a diferencia de una misma solución isotónica, pero desprovista de esta sal de ácido biliar, para la cual el número de adipocitos sigue siendo casi constante a lo largo del tiempo durante la incubación.

Se observa también a partir de este gráfico, que cuanto más hipotónica sea la solución salina acuosa (y que comprende una sal de ácido biliar), más rápidamente disminuye el número de adipocitos y de manera más importante.

Efecto acumulado de una sal de ácido biliar y de la hipotonicidad sobre la actividad de LDH:

La figura 7 es un gráfico que representa la actividad de la LDH en función del tiempo durante la incubación de adipocitos en respectivamente:

- una solución isotónica (300 mOsm/l),
- una solución hipotónica (150 mOsm/l),
- una solución hipotónica (150 mOsm/l) que comprende TDC, a una concentración de 500 µM.

Se observa que la solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l induce un aumento moderado de la actividad de LDH en el medio, esta aumenta mucho más cuando se añade TDC a una concentración de 500 µM a una misma solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l.

Efecto acumulado de la combinación de una sal de ácido biliar con un poloxámero TDC y de la hipotonicidad sobre el número de adipocitos:

La figura 8 es un gráfico que representa el número de adipocitos presentes en el medio de cultivo en función del tiempo de los adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l),
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l) que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05%,
- una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l) que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05% y TDC a una concentración de 500 µM.

Se observa que el número de adipocitos disminuye cada vez más cuando la solución salina acuosa hipotónica contiene respectivamente:

- un poloxámero tal como el Pluronic® P85,
- una sal de ácido biliar tal como TDC,
- una mezcla de poloxámero Pluronic® P85 y de sal de ácido biliar TDC.

El gráfico de la figura 8 demuestra particularmente el efecto sinérgico de la combinación de la sal de ácido biliar con un poloxámero en cuanto a la disminución del número de adipocitos. En efecto, entre 0 y 30 minutos, el número de adipocitos disminuye en gran medida, comparado con otros ensayos antes mencionados y representados en este mismo gráfico.

Así, este ejemplo demuestra el efecto sinérgico de la mezcla de una sal de ácido biliar con un poloxámero en una solución salina acuosa hipotónica (150 mOsm/l) en cuanto a la actividad lítica de esta solución.

La figura 9 es un gráfico que representa el número de adipocitos presentes en el medio de cultivo en función del tiempo para unos adipocitos incubados en:

- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l),
- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l) que comprende TDC a una concentración de 500 µM,
- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l) que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05%,
- una solución salina acuosa isotónica (300 mOsm/l) que comprende Pluronic® P85 a una concentración del 0,05% y TDC a una concentración de 500 µM.

A partir de este gráfico de la figura 9, se constata también que el número de adipocitos disminuye cada vez más rápidamente cuando la solución salina acuosa hipotónica contiene respectivamente:

- una sal de ácido biliar tal como TDC,
- un poloxámero tal como el Pluronic® P85,
- una mezcla de poloxámero Pluronic® P85 y de sal de ácido biliar TDC.

Así, el gráfico de la figura 9 demuestra también el efecto sinérgico de la combinación de la sal de ácido biliar con un poloxámero en cuanto a la disminución del número de adipocitos, y por lo tanto el efecto lítico de estas soluciones acuosas.

Sin embargo, se constata que el efecto lítico es más bajo para estas soluciones salinas acuosas isotónicas con respecto al obtenido a partir de soluciones hipotónicas (y que es objeto del gráfico 8).

Por ejemplo, después de 45 minutos, el número de adipocitos es del orden de 100 x 10^3 para una solución salina acuosa de osmolaridad de 150 mOsm/l que comprende una mezcla de TDC y Pluronic® P85 y del orden de 140 x 10^3 para una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende esta misma mezcla.

Así, comparando los resultados representados en los dos gráficos de las figuras 8 y 9, se constata el efecto de la osmolaridad sobre la actividad lítica de las soluciones salinas acuosas según la invención. Cuanto más baja sea la osmolaridad de la solución acuosa, más importante es la actividad lítica.

B - Resultados experimentales obtenidos a partir de tejidos adiposos de humano:

II - Resultados experimentales obtenidos a partir de tejidos adiposos de humano:

Se señala que los ejemplos de esta 2ª parte experimental se refieren a unos ensayos *in vitro* que utilizan unos tejidos adiposos humanos. La hipo-osmolaridad es relativamente delicada de ensayar, ya que las células en cultivo poseen una sensibilidad particular debido a su baja densidad en comparación con la de los tejidos adiposos organizados. En las condiciones experimentales descritas a continuación, no ha sido posible ensayar una hipo-osmolaridad inferior a 115 mOsml/l debido a la rapidez de acción de este modo de lisis celular (el descuento de los adipocitos a lo largo del tiempo no habría sido posible). Además, la mayoría de los ensayos experimentales en cuanto a la sección del fragilizante membranario de la solución salina acuosa según la invención se realizaron con una osmolaridad de 300 mOsm/l (solución isotónica).

Objetivos de esta 2ª parte experimental:

Se trata de determinar los efectos líticos de soluciones salinas acuosas según la invención sobre unos adipocitos humanos en cultivo.

Para ello, se han incubado unos adipocitos durante unos periodos de tiempo comprendidos entre 0 y 2 horas, en soluciones salinas acuosas según la invención, y para las cuales las concentraciones de poloxámeros y de sal de ácido biliar eran crecientes y estaban comprendidas respectivamente entre el 0,005 y el 0,5% y 125 y 750 NM.

La eficacia de la lisis adipocitaria se apreció mediante la medición de la actividad de una enzima citosólica: la láctico-deshidrogenasa (LDH), liberada en el medio de cultivo y expresada en porcentaje de la lisis total.

Aspectos técnicos y metodológicos:

Las células procedían de una línea de adipocitos humanos (SW872) que procede de un liposarcoma depositado en el banco celular americano del National Institute of Health (NIH).

Los adipocitos se cultivaron en el siguiente medio: DMEM (Dubelco modified Eagle medium) con fuerte contenido en glucosa (4,5 g/l) que contenía piruvato, antibióticos (penicilina/estreptomicina), un suplemento de aminoácidos y el 25% de medio de Ham-F12.

Se añadió a este medio de cultivo el 10% de suero fetal de ternera para el mantenimiento y la multiplicación de los adipocitos.

Se señala que los experimentos se llevaron a cabo después en presencia del 1% de suero fetal de ternera, con el fin de minimizar la actividad LDH basal susceptible de estar presente en el suero.

Las sales de ácidos biliares procedían de la compañía SIGMA-ALDRICH.

Los poloxámeros procedían de la compañía BASF USA. En el ámbito de esta 2ª parte experimental, se utilizaron los poloxámeros siguientes: L31, L61, L64, P85, P123.

Las sales de ácidos biliares y/o los poloxámeros se pusieron en solución en el medio de cultivo antes citado en condiciones estériles. Se realizaron unas soluciones salinas acuosas diluidas adaptadas a partir de soluciones madres al 2% para los poloxámeros y 3 mM para la sal de ácido biliar.

Organización general del protocolo:

Los adipocitos se cultivaron en condiciones estériles (cajas de plástico, incubadora al 5% de CO_2, 37ºC) en unos medios específicos adaptados y utilizados para unas pasadas inferiores a 10 con el fin de realizar unos experimentos sobre unas células primarias, es decir próximas a los tejidos adiposos de origen. Los recuentos celulares se efectuaron en células de Mallassez y la viabilidad se apreció por exclusión del colorante azul tripán.

Después de la resuspensión bajo la acción de la tripsina, los adipocitos se incubaron en placas estériles de 96 pocillos. Para los experimentos que necesitan importantes cantidades de células, las incubaciones previas se llevaron a cabo en placas estériles de 24 pocillos, después se trasfirieron en placas de 96 pocillos (fondo redondo) para la centrifugación, con el fin de separar eficazmente las células enteras de las células lisadas que han liberado su contenido enzimático encontrado entonces en el sobrenadante. Una alícuota (100 µl) de este último se ha transferido después en otra placa de 96 pocillos adaptada a las dosificaciones (fondo plano). Después de la adición de la mezcla de reactivos correspondientes (kit BioChain #K6330400), se midió entonces la actividad LDH (después de una incubación de 40 minutos con agitación orbital intermitente) en un lector de placas informatizado (MR5000/Biolinx, Dynatech) a la longitud de onda de 490 nm corregida de la absorbancia a 630 nm. Los resultados están expresados en porcentaje de la lisis total efectuada en presencia de detergente (1% Triton X100).

Se señala que no se ha observado ningún problema evidente de contaminación, ni de viabilidad celular durante unos cultivos de los adipocitos; esta última sigue siendo constantemente superior al 97%. No hubo ningún problema de solubilización de los compuestos en el medio de cultivo durante los experimentos, incluso durante el almacenamiento a 4ºC.

a) Actividad de LDH en función del poloxámero presente en la solución salina acuosa así como de su concentración:

La figura 10 es un gráfico que representa la actividad de la LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función de la concentración (del 0 al 0,5%) y de la naturaleza de poloxámero presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l, al cabo de una hora a 37ºC. Los poloxámeros ensayados eran el L31, el L61, el L64, el P85 y el P123.

Se constata que el L31 tiene poco efecto, permaneciendo la actividad de la LDH siempre inferior al 10%, y esto sea cual sea la concentración de este poloxámero. Se encuentra que la actividad de la LDH aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración en L61 y L64. A una concentración del 0,5% de L61 o L64, la actividad de la LDH sube al 56,5%. Para los poloxámeros P85 y P123, los efectos líticos alcanzan unas constantes. Se señala sin embargo que el P123 tiene un efecto significativo, y esto incluso a bajas concentraciones, y este efecto se mantiene a altas concentraciones con una actividad de la LDH próxima al 40%.

Estos resultados experimentales demuestran el hecho de que los poloxámeros, por sus propiedades fisicoquímicas, poseen la propiedad de lisar los adipocitos humanos en cultivo. Los poloxámeros P85, L64, L61 y P123 son particularmente eficaces; el poloxámero L31 fue menos eficaz en estas condiciones experimentales.

Para una concentración del 0,1%, se revela el orden de eficacia decreciente siguiente de los poloxámeros: P123>L64 L61>P85>L31. P123>L64 L61>P85>L31.

Para una concentración del 0,5%, el orden de eficacia decreciente de los poloxámeros es sustancialmente diferente: L64=L61>P123>P85>L31.

Además, los efectos líticos de algunos poloxámeros tales como los L61 y L64 se muestran dependientes de su concentración, mientras que no se observa ningún efecto de constante para los poloxámeros P85 y P123.

Estas diferencias de acción no parecen estar relacionadas con su HLB ya que estas son diferentes y los poloxámeros con HLB parecidos presentan unos comportamientos muy diferentes (por ejemplo, L64 y P85).

b) Actividad de la LDH en función del poloxámero presente en la solución salina acuosa así como del tiempo:

La figura 11 es un gráfico que representa la actividad de la LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función del tiempo (0 a 120 minutos), en función de la selección del poloxámero (L61, L64 o P123) presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l a una concentración del 0,1%. La temperatura del medio se mantuvo a 37ºC.

Se constata que los efectos de estos tres poloxámeros son rápidos ya que no se obtiene ninguna actividad significativa de la LDH después de 15 minutos de exposición. Los efectos se estancan o disminuyen según estos poloxámeros a lo largo del tiempo. Se muestra que el P123 se mantiene a una lisis próxima al 40%.

c) Actividad de la LDH en función de la concentración de la sal de ácido biliar DC presente en la solución salina acuosa:

La figura 12 es un gráfico que representa la actividad de la LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos al cabo de una hora en función de la concentración en sal de ácido biliar DC (de 0 a 750 µM) presente en una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l.

Se observa una lisis máxima del 42±7% obtenida con una incubación de una hora en presencia de los adipocitos.

d) Actividad de la LDH en función del tiempo de una solución salina acuosa que comprende sal de ácido biliar DC a una concentración de 750 µM:

La figura 13 es un gráfico que representa la actividad de LDH liberada durante la lisis completa de los adipocitos en función del tiempo (0 a 120 minutos) de una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende el DC como sal de ácido biliar y a una concentración de 750 µM.

Se constata que al cabo de 30 minutos de incubación, la actividad de la LDH se eleva al 26% y alcanza un valor del 37% después de 2 horas de incubación.

e) Actividad de la LDH en función de la osmolaridad de una solución salina acuosa:

La figura 14 es un gráfico que representa la actividad de la LDH después de una hora en función de la osmolaridad de una solución salina acuosa (variando la osmolaridad entre 300 y 115 mOsm/l).

Se observa un aumento de la actividad de la LDH próximo al 25% para una hipo-osmolaridad baja a 225 mOsmol/l y que alcanza el 45±6% para la osmolaridad más baja ensayada, es decir 115 mOsmol/l.

f) Actividad de la LDH en función de la combinación de diferentes parámetros (naturaleza del fragilizante membranario, osmolaridad de la solución salina acuosa):

La figura 15 representa un diagrama de la actividad de la LDH después de una hora, para:

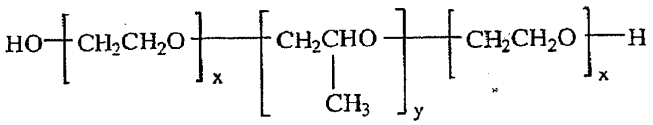
A: una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende el 0,1% de P123,
B: una solución salina acuosa de osmolaridad de 300 mOsm/l que comprende 750 µM de DC,
C: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l,
D: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende 750 µM de DC,
E: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende el 0,1% de P123,
F: una solución salina acuosa de osmolaridad de 160 mOsm/l que comprende el 0,1 % de P123 y 750 µM de DC.

Se constata así una actividad lítica importante del orden del 59±5% del poloxámero P123 por comparación con la obtenida con sal de ácido biliar DC a una concentración de 750 µM (38±5%). La hipo-osmolaridad sola (160 mOsmol/l) conlleva una actividad de la LDH del orden del 40±8%. Además, se muestra el efecto sinérgico obtenido combinando la hipo-osmolaridad con la presencia de poloxámero P123 con la obtención de una actividad de la LDH que se eleva al 79±7%. Se observa por otro lado que la adición del DC a una solución salina acuosa hipo-osmolar no induce una lisis suplementaria, ya que la actividad de la LDH es próxima al 72±8%.

Los resultados experimentales descritos anteriormente, ciertamente obtenidos en condiciones diferentes (a saber *in vitro* y por lo tanto, para ello, de osmolaridad apropiada) de las de la realización de la solución salina acuosa según la invención, tienden a apoyar la eficacia de esta solución en su utilización *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Solución salina acuosa de osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 y 100 mOsm/l, caracterizada por que comprende además por lo menos un fragilizante membranario, siendo dicho fragilizante membranario por lo menos una sal de ácido biliar y/o por lo menos un poloxámero de fórmula estructural (I):



(I)

que comprende una parte hidrófila y una parte hidrófoba, siendo x e y unos números enteros, y estando seleccionados de manera que la parte hidrófila represente entre el 10 y el 80% del peso del poloxámero, preferentemente entre el 30 y el 50% y que el HLB (balance hidrofílico/lipofílico) sea inferior a 35, preferentemente inferior a 20.

2. Solución salina acuosa según la reivindicación 1, caracterizada por que la concentración en sal de ácido biliar está comprendida entre 50 µM y 3000 µM, preferentemente entre 50 y 1000 µM, aún más preferentemente entre 150 y 750 µM y/o la concentración en poloxámero está comprendida entre el 0,001% y el 5% en peso/volumen, preferentemente entre el 0,1% y el 1% en peso/volumen.

3. Solución salina acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que la por lo menos una sal de ácido biliar está seleccionada de entre el desoxicolato de sodio (DC), el tauro-desoxicolato de sodio (TDC), el litocolato de sodio (LC) y el tauro-litocolato de sodio (TLC).

4. Solución salina acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que por lo menos un poloxámero está seleccionado de entre los poloxámeros de fórmula (I) que tienen:

- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero y el HLB es de 16,
- una parte hidrófila que representa el 10% del poloxámero, y el HLB es de 3,
- una parte hidrófila que representa el 20% del poloxámero, y el HLB es de 7,
- una parte hidrófila que representa el 30% del poloxámero, y el HLB es de 11,
- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero, y el HLB es de 15,
- una parte hidrófila que representa el 50% del poloxámero, y el HLB es de 14,
- una parte hidrófila que representa el 40% del poloxámero, y el HLB es de 14,
- una parte hidrófila que representa el 50% del poloxámero, y el HLB es de 16,
- una parte hidrófila que representa el 30% en peso del poloxámero, y el HLB es de 8.

5. Solución salina acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que comprende por lo menos una sal seleccionada de entre NaCl a una concentración comprendida entre 10 y 25 mmoles/l, $NaHCO_3$ a una concentración comprendida entre 5 y 15 mmoles/l, $MgCl_2$ a una concentración comprendida entre 0,5 y 5 mmoles/l.

6. Solución salina acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada por que comprende además por lo menos una sustancia seleccionada de entre la adrenalina, un anestésico tal como la lidocaína.

7. Utilización de una solución salina acuosa de osmolaridad comprendida entre 50 mOsm/l y 170 mOsm/l, preferentemente entre 50 y 100 mOsm/l, comprendiendo dicha solución salina acuosa además por lo menos un fragilizante membranario, para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de la esteatomería, así como del lipoma.

8. Utilización según la reivindicación 7, caracterizada por que el por lo menos un fragilizante membranario está seleccionado de entre los detergentes iónicos, los detergentes no iónicos, los detergentes zwitteriónicos y los derivados del glicerol.

9. Utilización según la reivindicación 8, caracterizada por que el por lo menos un fragilizante membranario está seleccionado de entre los alquilglucósidos, las glucamidas, los polioxietilenos, las sales de ácidos biliares.

10. Utilización no terapéutica de una solución salina acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el tratamiento de la celulitis.

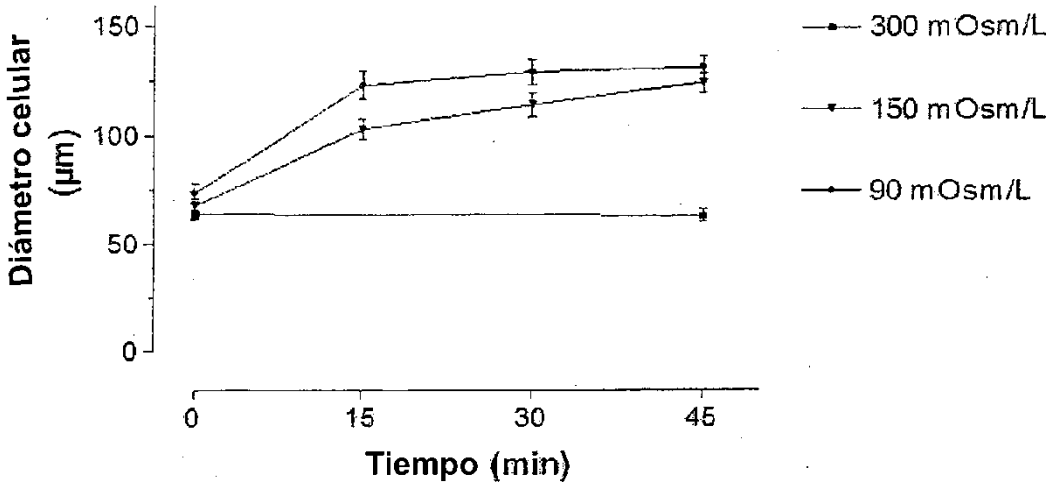

Diámetro celular (µm)
150
100
50
0
0
15
30
45
Tiempo (min)
300 mOsm/L
150 mOsm/L
90 mOsm/L

Fig 1

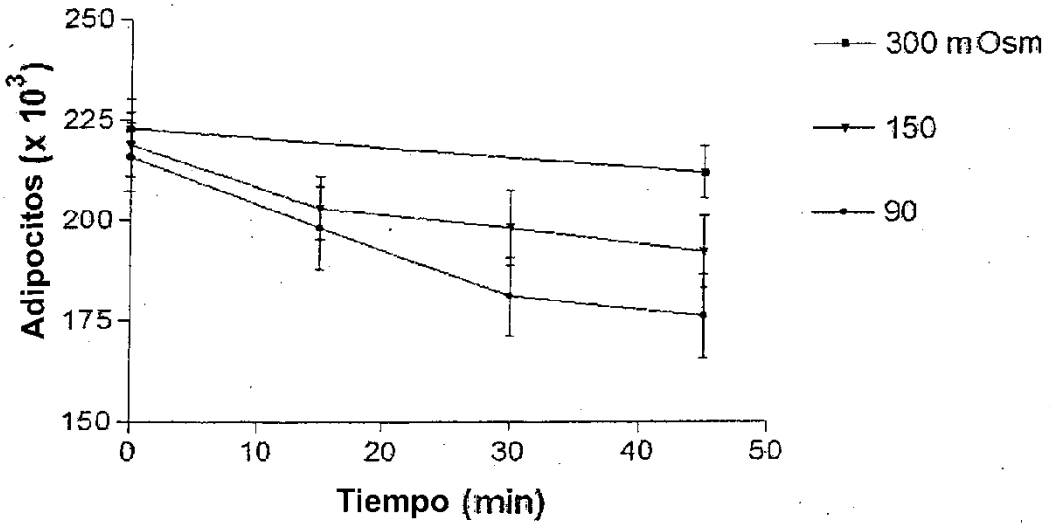

Adipocitos (x 10³)
250
225
200
175
150
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
300 mOsm
150
90

Fig 2

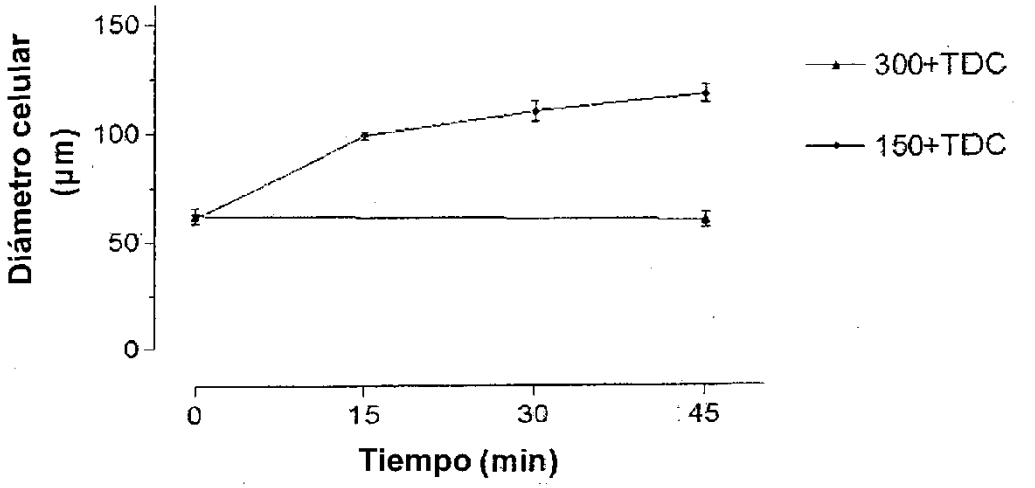

Diámetro celular (µm)
150
100
50
0
0
15
30
45
Tiempo (min)
300+TDC
150+TDC

Fig 3

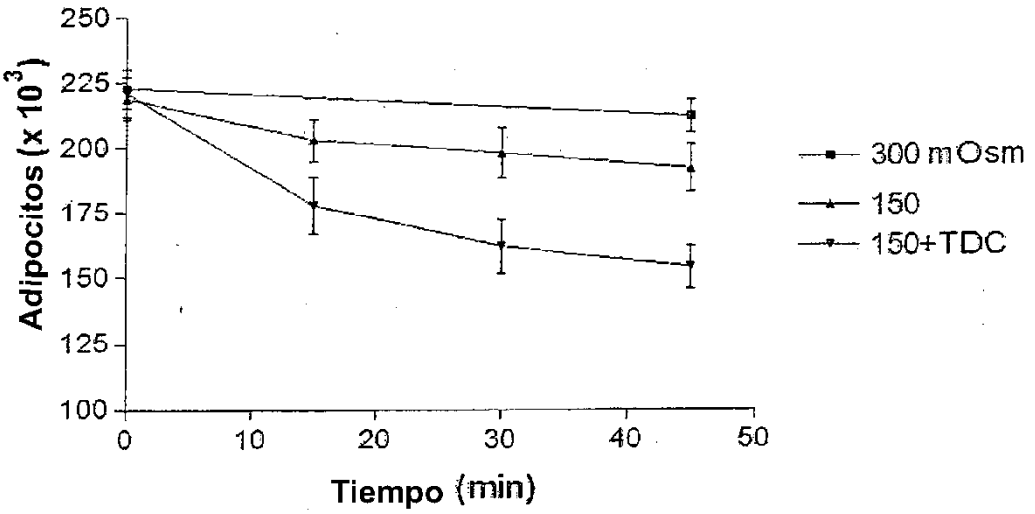

Adipocitos (x 10^3)
250
225
200
175
150
125
100
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
300 mOsm
150
150+TDC

Fig 4

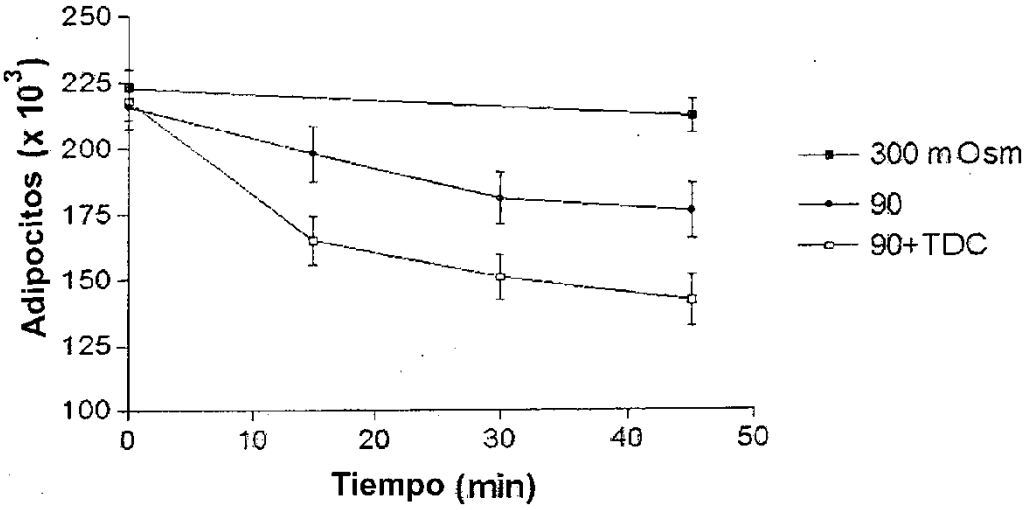

Adipocitos (x 10^3)
250
225
200
175
150
125
100
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
300 mOsm
90
90+TDC

Fig 5

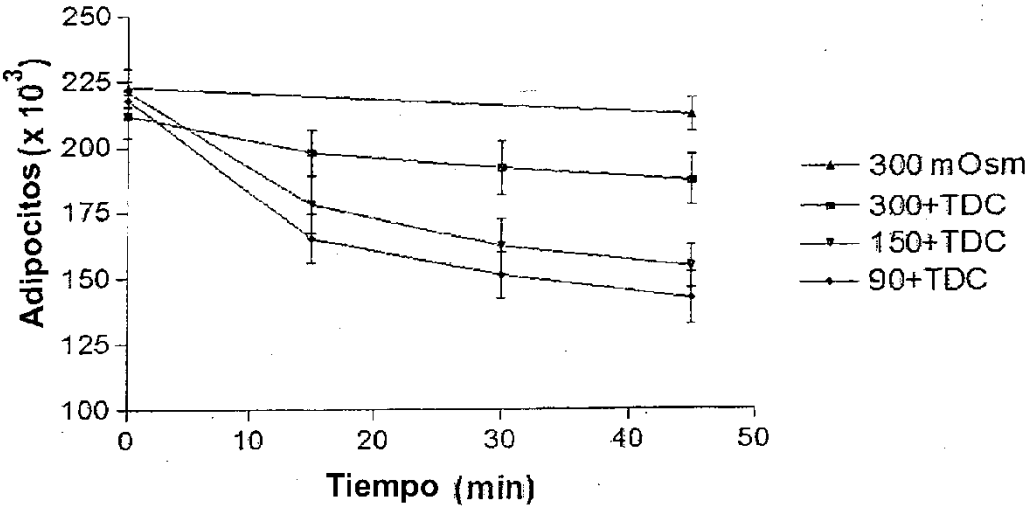

Adipocitos (x 10^3)
250
225
200
175
150
125
100
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
300 mOsm
300+TDC
150+TDC
90+TDC

Fig 6

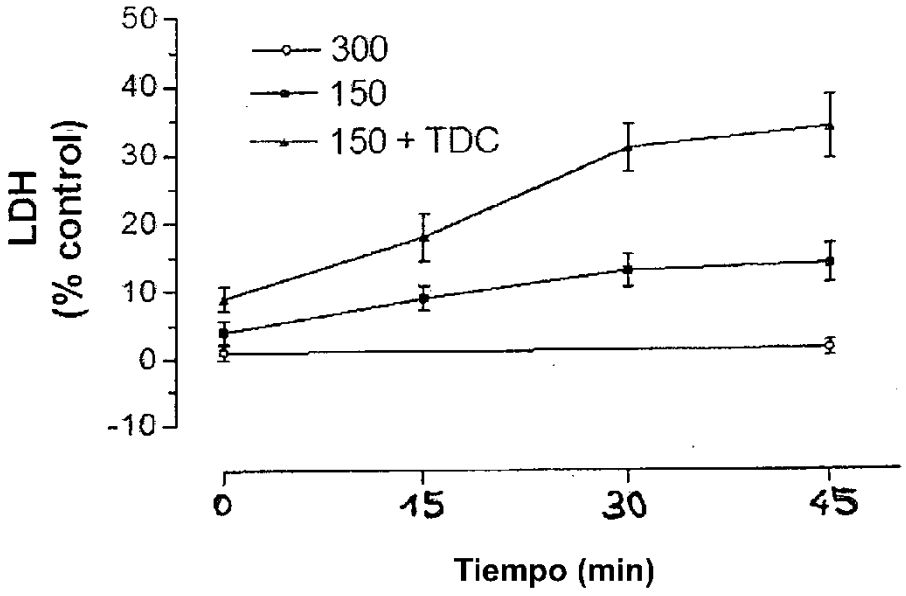

LDH
(% control)
50
40
30
20
10
0
-10
300
150
150 + TDC
0
15
30
45
Tiempo (min)

Fig 7

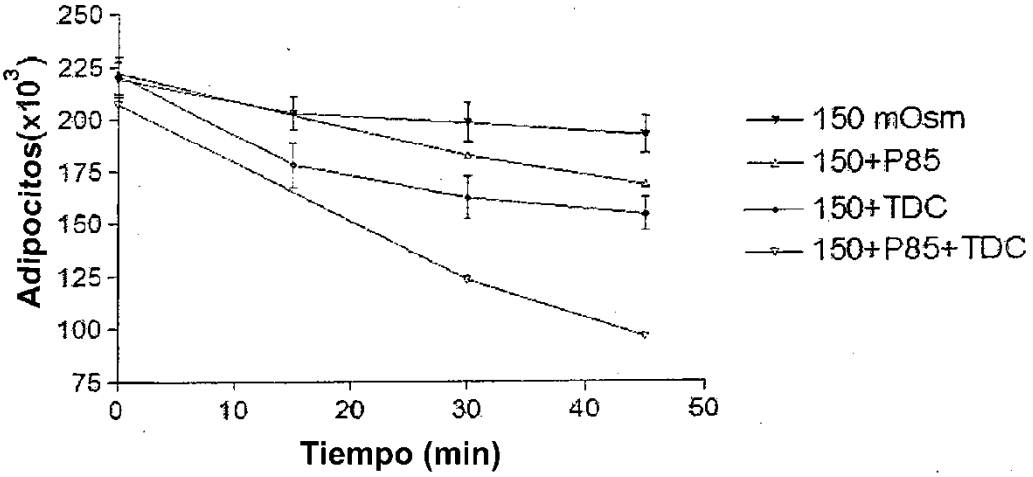

Adipocitos(x10^3)
250
225
200
175
150
125
100
75
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
150 mOsm
150+P85
150+TDC
150+P85+TDC

Fig 8

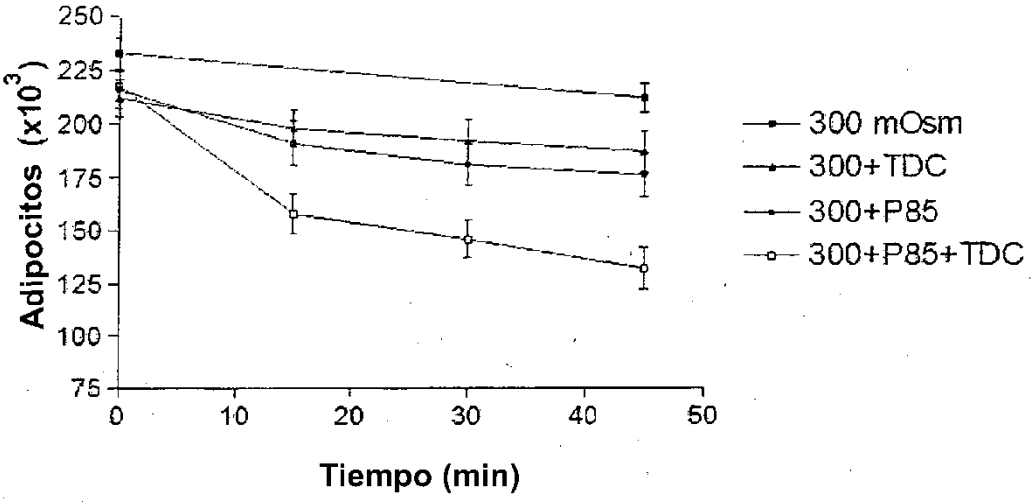

250
225
200
175
150
125
100
75
Adipocitos (x10^3)
0
10
20
30
40
50
Tiempo (min)
300 mOsm
300+TDC
300+P85
300+P85+TDC

Fig 9

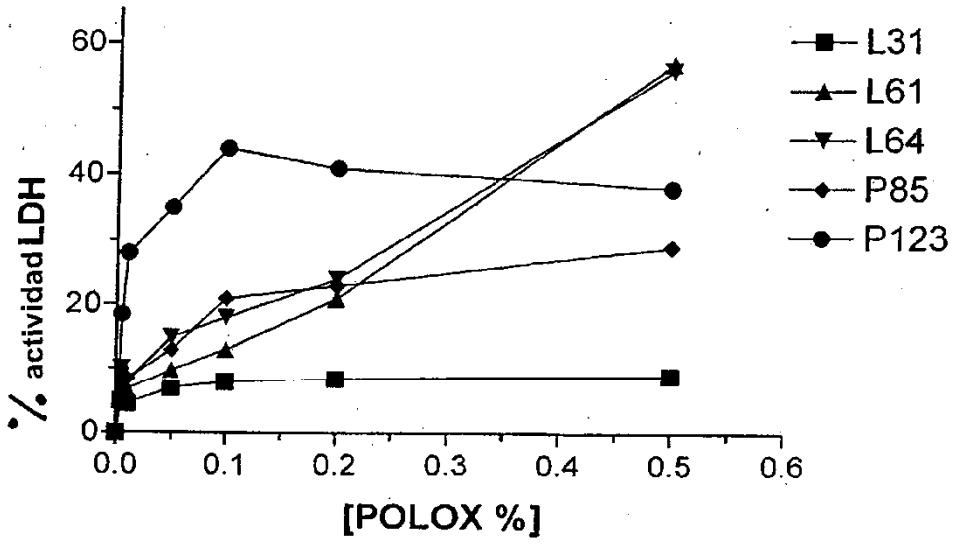

60
40
20
0
% actividad LDH
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
[POLOX %]
L31
L61
L64
P85
P123

Fig 10

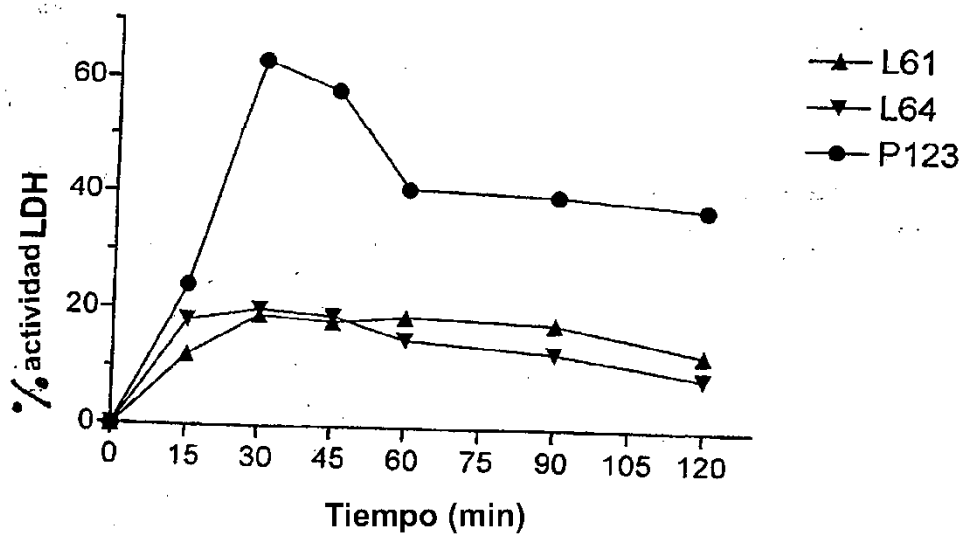

60
40
20
0
% actividad LDH
0
15
30
45
60
75
90
105
120
Tiempo (min)
L61
L64
P123

Fig 11

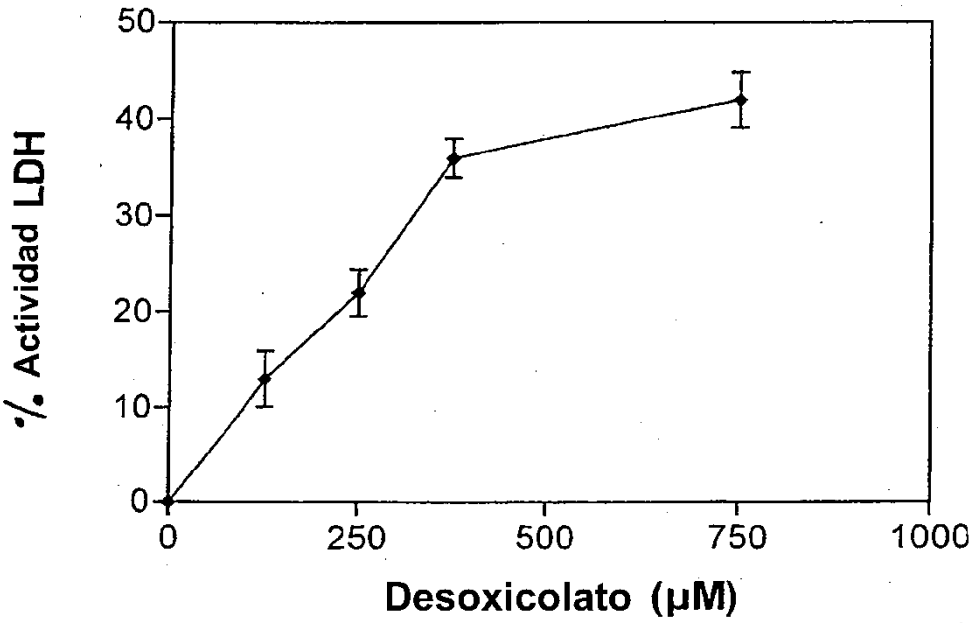

% Actividad LDH
50
40
30
20
10
0
0
250
500
750
1000
Desoxicolato (µM)

Fig 12

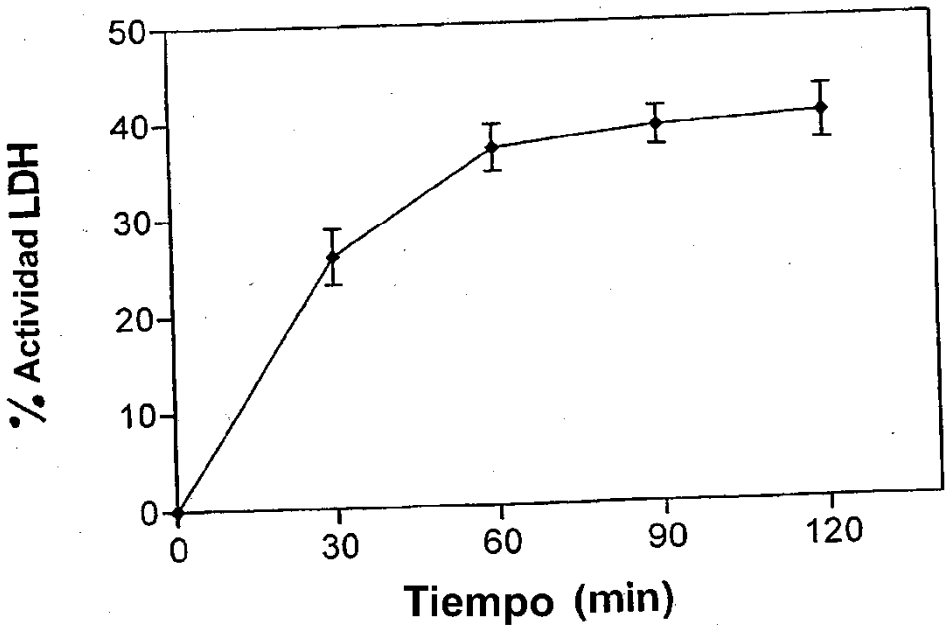

% Actividad LDH
50
40
30
20
10
0
0
30
60
90
120
Tiempo (min)

Fig 13

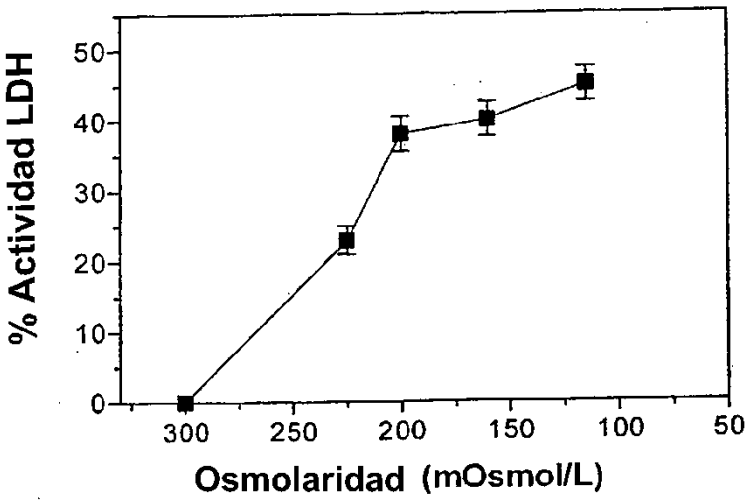

% Actividad LDH
50
40
30
20
10
0
300
250
200
150
100
50
Osmolaridad (mOsmol/L)

Fig 14

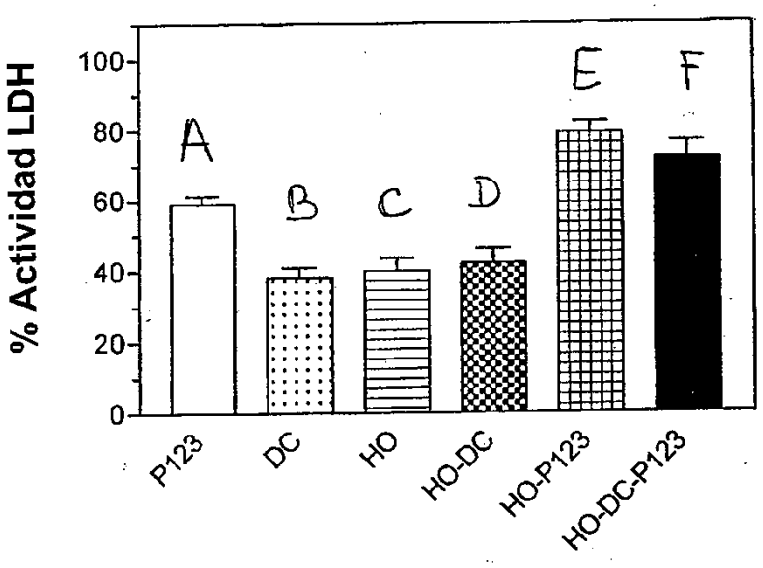

% Actividad LDH
100
80
60
40
20
0
A
B
C
D
E
F
P123
DC
HO
HO-DC
HO-P123
HO-DC-P123

Fig 15