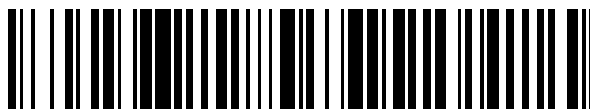


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 360**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 1/14 (2006.01)

A61K 8/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2014** **PCT/CA2014/000663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015** **WO15027328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014** **E 14838935 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 3038596**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la eliminación de tatuajes**

30 Prioridad:

30.08.2013 US 201361871929 P

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

14.09.2020

73 Titular/es:

DALHOUSIE UNIVERSITY (100.0%)
6299 South Street
Halifax, NS B3H 4H6, CA

72 Inventor/es:

FALKENHAM, ALEC GUY

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 782 360 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

Composiciones y procedimientos para la eliminación de tatuajes

Referencia cruzada a solicitudes anteriores

Campo

- 5 La presente invención se refiere, en general, a composiciones y a su uso en el tratamiento y eliminación de arte corporal, particularmente, para eliminar tatuajes.

Antecedentes

Las declaraciones en esta sección simplemente proporcionan información de antecedentes relacionada con la presente divulgación y pueden no constituir un estado de la técnica.

- 10 Los tatuajes son un procedimiento popular de arte corporal, y se estima que hay 20-30 millones de personas tatuadas en el mundo. Aproximadamente el 50 % de los que se hacen tatuajes lamentan la totalidad o parte de sus tatuajes y desean que se los eliminen por completo, o que se desvanezcan lo suficiente como para permitir que se vuelva a tatuar un nuevo diseño sobre el tatuaje antiguo. En la actualidad, no hay procedimientos fiables, seguros, consistentes o asequibles para la eliminación de tatuajes. Las terapias basadas en láser son el estándar de atención y han
15 demostrado ser prometedoras en tatuajes muy específicos (es decir, tipo de pigmento, tamaño y color de piel del paciente), pero tienen varias deficiencias que impiden que muchas personas busquen este tratamiento.

- Los tatuajes profesionales se crean inyectando tintas de tatuaje con una aguja de movimiento rápido que conduce las partículas de tinta hacia la dermis a una profundidad de 0,6 mm a 2,2 mm. Las tintas utilizadas en los tatuajes se derivan de pigmentos exógenos. Los pigmentos en la tinta del tatuaje pueden incluir óxidos de hierro, óxido de cromo,
20 óxido de aluminio, óxido de titanio, sulfato de bario, óxido de cinc, silicato de cobre y sodio, silicato de sodio y aluminio, carbonato de cobre, dioxazina y carbazol, entre otras formulaciones de pigmentos conocidas. Después de la inyección de las partículas de pigmento de tinta en una región de la piel, las partículas de pigmento de tinta residen en el espacio intersticial entre las células dérmicas donde forman grandes agregados de aproximadamente 100 µm a 200 µm hasta que los fibroblastos o macrófagos engullen las partículas de pigmento e internalizan la tinta del tatuaje. El tamaño de
25 los agregados de partículas de tinta y la red de colágeno que rodea los agregados ayudan a mantener los pigmentos de tinta dentro de la piel haciendo que el tatuaje sea permanente, de ahí la dificultad con la eliminación de los tatuajes.

- La eliminación del tatuaje depende de varios factores, incluido el tamaño del tatuaje, la ubicación del tatuaje, el procedimiento de curación del individuo, cómo se aplicó el tatuaje y el tiempo que ha permanecido en la piel. Los tatuajes se desvanecen naturalmente con el tiempo debido a la exposición al sol y la respuesta inmune continua a
30 cuerpos extraños (es decir, partículas de pigmento de tinta). Las terapias basadas en láser utilizan emisiones de luz de alta energía a longitudes de onda específicas para, en esencia, acelerar y mejorar la especificidad de la descomposición natural de la tinta del tatuaje por la exposición al sol. Como las tintas de tatuaje varían en color y, en consecuencia, en longitudes de onda de absorción, son necesarios láseres con diferentes longitudes de onda de emisión para eliminar pigmentos específicos, requiriendo esencialmente tratamientos láser avanzados y costosos con
35 láseres sofisticados que pueden emitir a varias longitudes de onda. La luz de alta energía descompone la tinta que reside en los cuerpos residuales, permitiendo que continúe la respuesta inmune natural. Los inconvenientes de las terapias basadas en láser para la eliminación de tatuajes incluyen, entre otros, asequibilidad, disponibilidad, fiabilidad, consistencia, dolor e incomodidad asociados, hipo o hiperpigmentación de la piel y cicatrización. Otras modalidades de tratamiento comúnmente aceptadas para la eliminación de tatuajes incluyen la dermoabrasión y la eliminación
40 quirúrgica, que pueden aumentar aún más el riesgo de efectos secundarios adversos y posibles marcas irreversibles que quedan en el procedimiento de eliminación.

- Además de los tatuajes corporales más frecuentes, los tatuajes cosméticos o el "maquillaje permanente" también son problemas de la piel que muchos intentan eliminar con láser, dermoabrasión y tratamientos quirúrgicos. En algunos
45 ejemplos de tatuajes cosméticos, también se busca a menudo eliminar cejas tatuadas, delineador de ojos y delineador de labios.

- Cuando se trabaja alrededor del área de los ojos con láser o tratamiento quirúrgico, se debe tener especial cuidado para garantizar que no haya daño ocular, lo que requiere el uso de protectores oculares que se asientan en la córnea para la eliminación de tatuajes permanentes de delineador de ojos. El láser utilizado para eliminar estos pigmentos
50 también puede eliminar el vello (pero solo temporalmente) y esto puede ser un problema al eliminar tatuajes de delineador de ojos y cejas.

Además, con tatuajes cosméticos, es posible que ocurra un cambio de color, por ejemplo, un tatuaje de delineador de labios rosado puede volverse verde oscuro o negro. Aunque, este color más oscuro todavía se puede tratar con láser, puede no parecer estéticamente agradable durante el periodo de eliminación y aumenta aún más las molestias, el tiempo y el coste para la eliminación permanente.

- 55 IBIS World (Tattoo Removal Practitioners Market Research Report, Ene 2012) valora el mercado de eliminación de

tatuajes en 66 millones de dólares americanos y determinó un crecimiento anual del 21 % entre 2007-2012. Para poner el coste de bolsillo en perspectiva, el coste inicial promedio por pulgada cuadrada de eliminación de tatuajes puede variar de aproximadamente 100,00 \$ a aproximadamente 150,00 \$ (con un promedio de aproximadamente 125 \$ por tratamiento) y se necesitan entre 6-10 tratamientos, según el tamaño y los colores de tinta, para borrar la mayoría de los tatuajes. Por lo tanto, es razonable creer, que el coste de eliminar un tatuaje con terapias con láser es mucho mayor que el coste original del tatuaje. Se deduce que sería deseable una terapia alternativa, tanto desde el punto de vista del cliente como del económico.

Por al menos las razones proporcionadas anteriormente, existe la necesidad de proporcionar procedimientos dermatológicos para procedimientos seguros, fiables y económicos para la eliminación o decoloración de tatuajes permanentes.

Sumario

La tecnología actual proporciona composiciones novedosas para la eliminación y decoloración de los tatuajes aplicados a la piel de un sujeto mamífero.

En otro aspecto, la presente tecnología proporciona un procedimiento para eliminar un tatuaje en una región de la piel, comprendiendo el procedimiento: administrar a al menos una parte del tatuaje una composición que comprende una cantidad eficaz de un bisfosfonato y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable para causar, al menos, la decoloración del tatuaje en dicha región.

En un aspecto, la composición es una composición que se administra por vía intradérmica, una composición que se administra por vía tópica o un dispositivo transdérmico. En un aspecto relacionado, la composición proporciona partículas de bisfosfonato adecuadas para la administración en una región de la piel para eliminar o decolorar un tatuaje.

Otras áreas de aplicabilidad serán evidentes a partir de la descripción proporcionada en el presente documento.

Dibujos

Los dibujos descritos en el presente documento tienen fines ilustrativos.

La FIG. 1A muestra una fotomicrografía que representa la piel que fue tratada con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde. En la FIG. 1A, la fotomicrografía ilustra las capas dérmicas marcadas con flechas blancas para indicar la tinta del tatuaje captada por los macrófagos como se ve con microscopía óptica.

La FIG. 1B muestra una fotomicrografía que representa la piel que fue tratada con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde. En la FIG. 1B, la fotomicrografía ilustra las capas dérmicas marcadas con flechas blancas para indicar la tinta de tatuaje y los liposomas de clodronato captados por macrófagos como se ve con microscopía de fluorescencia.

La FIG. 1C muestra una fotomicrografía que representa la piel que fue tratada con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde. En la FIG. 1C, la fotomicrografía ilustra una superposición de las estructuras de microscopía óptica con la presencia de macrófagos que han fagocitado los liposomas de clodronato como se observa con la microscopía de fluorescencia.

La FIG. 1D muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal bajo microscopía óptica que se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 24 horas antes. En la FIG. 1D, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático en animales tratados 24 horas antes del sacrificio.

La FIG. 1E muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal que se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 24 horas antes. En la FIG. 1E, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático visto bajo microscopía de fluorescencia para ver los macrófagos que indican los liposomas de clodronato digeridos en animales tratados 24 horas antes del sacrificio.

La FIG. 1F muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal que se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 2 semanas antes. En la FIG. 1F, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático visto como una superposición bajo microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de macrófagos que han fagocitado los liposomas de clodronato en animales tratados 24 horas antes del sacrificio.

La FIG. 1G muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal bajo microscopía óptica que se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 2 semanas antes. En la FIG. 1G, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático en animales tratados 2 semanas antes del sacrificio.

La FIG. 1H muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal que se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 2 semanas antes. En la FIG. 1H, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático visto bajo microscopía de fluorescencia para ver los macrófagos que indican los liposomas de clodronato digeridos en animales tratados 2 semanas antes del sacrificio.

La FIG. 1I muestra una fotomicrografía que representa una sección de tejido de ganglio linfático en un animal que

se trató con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente con un tinte verde 2 semanas antes. En la FIG. 1I, la fotomicrografía ilustra el ganglio linfático visto como una superposición bajo microscopía de fluorescencia para detectar la presencia de macrófagos que han fagocitado los liposomas de clodronato en animales tratados 2 semanas antes del sacrificio.

La FIG. 2 muestra una fotomicrografía que representa el tejido cutáneo dérmico en un animal experimental tratado con liposomas de clodronato de la presente tecnología y un anticuerpo de apoptosis para ilustrar la presencia de macrófagos apoptóticos. Como se puede ver en la FIG. 2, los macrófagos apoptóticos se ven con partículas de tinta de tatuaje digeridas.

La FIG. 3 muestra una fotomicrografía que representa el tejido cutáneo dérmico en un animal experimental teñido con hematoxilina y eosina que se tatuó y se dejó curar durante 12 semanas.

La FIG. 4A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado después de 24 horas en un animal experimental tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 4B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado después de 24 horas en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 4C muestra una fotomicrografía que representa la imagen de microscopía óptica superpuesta sobre la imagen de microscopía de fluorescencia de la sección de tejido cutáneo dérmico tatuado después de 24 horas en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 5A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida después de 24 horas en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 5B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida después de 2 días en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 5C muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida después de 5 días en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 5D muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida después de 7 días en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 5E muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida después de 14 días en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 6A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida 2 días después del tratamiento en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato que identifican la apoptosis en las células de la dermis.

La FIG. 6B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 2 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas que contienen clodronato que identifican la apoptosis en las células de la dermis. Obsérvese que la falta de tinción de TUNEL indica una falta de células apoptóticas en el ganglio linfático.

La FIG. 7 muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida después de 7 días en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología. Las células CD11b+ que migran de la piel al ganglio linfático se identifican en la sección de tejido de ganglio linfático como se muestra por la tinción positiva de CD11b después del tratamiento con los liposomas que contienen clodronato de la presente tecnología.

La FIG. 8A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado no tratado obtenida 7 días después de la aplicación del tatuaje.

La FIG. 8B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida 7 días después del tratamiento en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato.

La FIG. 8C muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado no tratado obtenida 14 días después de la aplicación del tatuaje.

La FIG. 8D muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tratado con liposomas que contienen clodronato.

La FIG. 9A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 1 día después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 9B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 1 día después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 9C muestra una fotomicrografía que representa la imagen de microscopía óptica superpuesta sobre la imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático 1 día después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente

de la presente tecnología.

La FIG. 9D muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 9E muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 9F muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica superpuesta sobre la imagen de microscopía de fluorescencia de la sección de tejido de ganglio linfático 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 9G muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas de clodronato marcados fluorescentemente/restos celulares se indican con flechas blancas.

La FIG. 10 muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología y teñido con marcador de células fagocíticas (monocitos y macrófagos) CD11b. La colocación de los liposomas de clodronato/restos celulares marcados fluorescentemente y la tinción de CD11b+ se indican con flechas blancas.

La FIG. 11A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 1 día después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 11B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 2 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 11C muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 5 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 11D muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 7 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 11E muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía de fluorescencia de una sección de tejido de ganglio linfático obtenida 14 días después del tratamiento en un animal experimental tatuado tratado con liposomas de clodronato marcados fluorescentemente de la presente tecnología.

La FIG. 12A muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado recogido después de 12 semanas de tratamiento con un control liposómico en un animal experimental. Los animales fueron tratados una vez a la semana durante 12 semanas.

La FIG. 12B muestra una fotomicrografía que representa una imagen de microscopía óptica de una sección de tejido cutáneo dérmico tatuado recogido después de 12 semanas de tratamiento con liposomas de clodronato de la presente tecnología en un animal experimental. Los animales fueron tratados una vez a la semana durante 12 semanas.

Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, las palabras "preferido" y "preferentemente" se refieren a realizaciones de la tecnología que ofrecen ciertos beneficios, en ciertas circunstancias. Sin embargo, también pueden ser preferentes otras realizaciones, en las mismas circunstancias u otras. Además, citar una o más realizaciones preferentes no implica que otras realizaciones no sean útiles, y no pretende excluir otras realizaciones del ámbito de la invención.

Como se menciona en el presente documento, todos los porcentajes composicionales son en peso de la composición total, a menos que se especifique de otra manera. Como se usa en el presente documento, el término "incluir" y sus variantes, está destinado a ser no limitativo, de tal modo que citar artículos en una lista no excluya otros artículos similares que también pueden ser útiles en los materiales, composiciones, dispositivos y procedimientos de esta tecnología. De forma similar, los términos "puede" y "podría" y sus variantes están destinados a ser no limitativos, de tal modo que citar que una realización puede o podría comprender ciertos elementos o características no excluye otras realizaciones de la presente tecnología que no contienen esos elementos o características.

La divulgación de valores e intervalos de valores para parámetros específicos (tales como temperaturas, pesos moleculares, porcentajes en peso, etc.) no son exclusivos de otros valores e intervalos de valores útiles en el presente documento. Se prevé que dos o más valores ejemplificados específicos para un parámetro dado pueden definir puntos finales para un intervalo de valores que pueden reivindicarse para el parámetro. Por ejemplo, si el parámetro X se ejemplifica en el presente documento como que tiene el valor A y también se ejemplifica como que tiene el valor Z, se prevé que el parámetro X pueda tener un intervalo de valores de aproximadamente A a aproximadamente Z. De manera similar, se prevé que la divulgación de dos o más intervalos de valores para un parámetro (ya sea que dichos intervalos estén anidados, se superpongan o sean distintos) incluye todas las combinaciones posibles de intervalos

para el valor que podría reivindicarse utilizando los puntos finales de los intervalos desvelados. Por ejemplo, si el parámetro X se ejemplifica en el presente documento como que tiene valores en el intervalo de 1 - 10, o 2 - 9, o 3 - 8, también se prevé que el parámetro X pueda tener otros intervalos de valores, incluidos 1 - 9, 1 - 8, 1 - 3, 1 - 2, 2 - 10, 2 - 8, 2 - 3, 3 - 10 y 3 - 9.

- 5 Aunque el término abierto "que comprende" como sinónimo de términos tales como que incluye, que contiene o que tiene, se usa en el presente documento para describir y reivindicar la presente invención, la invención, o realizaciones de la misma, puede describirse alternativamente usando términos más limitantes tales como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los ingredientes citados.

- 10 En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para eliminar un tatuaje en una región de la piel, comprendiendo el procedimiento: administrar a al menos una parte del tatuaje una composición que comprende una cantidad eficaz de un bisfosfonato y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable para causar, al menos, la decoloración del tatuaje en la región de la piel.

Un "tatuaje" es una parte de la piel en la que se ha incrustado la tinta del tatuaje.

- 15 En diversas realizaciones, la expresión "eliminar un tatuaje" de una región de la piel significa extraer, por ejemplo desplazando, la tinta de tatuaje (pigmento de tinta o partículas de tinta) de la región del tejido subyacente o que rodea el tatuaje, e incluye el desplazamiento y la extracción de las partículas de tinta que es suficiente para causar algo de decoloración, con o sin eliminación total, del tatuaje en la región de la piel a tratar. "Eliminar" un tatuaje de una región de la piel de manera similar significa haber extraído la tinta del tatuaje del tejido que es suficiente para causar algo de decoloración, con o sin eliminación total, del tatuaje.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "partícula" se refiere a moléculas transportadoras completamente cerradas que pueden ser fagocitadas por células fagocíticas, incluyendo, pero sin limitación, partículas poliméricas, microcápsulas, liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas y nanoesferas. En diversas realizaciones, las partículas de bisfosfonato son partículas que contienen uno o más de bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. El bisfosfonato, 25 difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos se liberan de la partícula de bisfosfonato una vez que la partícula de bisfosfonato ha sido engullida por la célula fagocítica. En diversas realizaciones, las partículas de bisfosfonato de la presente tecnología pueden medir (diámetro y/o longitud) de aproximadamente 0,01 micrómetros a aproximadamente 30 micrómetros, preferentemente de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 25 micrómetros, o de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros (µm), o de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros, o de 30 aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 1 micrómetro.

Composiciones

- El presente inventor ha identificado una clase de fármacos, los bisfosfonatos, que son útiles en la reducción y destrucción de las células fagocíticas que han absorbido el pigmento de la tinta del tatuaje y las partículas de tinta del tatuaje, reduciendo así la cantidad de pigmento de tinta visible y las partículas de un tatuaje en la piel tratada. Se cree que durante e inmediatamente después de que la tinta del tatuaje se haya incrustado en la piel del sujeto, la célula fagocítica implicada en la respuesta inmune engulle el pigmento y las partículas de la tinta del tatuaje y lo transporta al ganglio linfático de drenaje a través del sistema linfático. Una proporción menor de las células fagocíticas permanecen en el sitio del tatuaje en las áreas perivasculares. Estas células fagocíticas almacenan el pigmento y las partículas de tinta de tatuaje no digeribles en cuerpos residuales donde pueden residir durante décadas, siendo así responsables de la permanencia de un tatuaje.

- Se cree que los bifosfonatos como una clase de fármacos inhiben la resorción ósea osteoclástica a través de un mecanismo que difiere del de otros agentes antirresortivos. Se cree que los bisfosfonatos se unen a los sitios de unión de hidroxiapatita en las superficies óseas, especialmente superficies que sufren reabsorción activa. Cuando los osteoclastos comienzan a reabsorber el hueso que está impregnado con bisfosfonato, el bisfosfonato liberado durante la reabsorción perjudica la capacidad de los osteoclastos para formar el borde ondulado, para adherirse a la superficie ósea y producir los protones necesarios para la resorción ósea continua. Los bisfosfonatos también reducen la actividad de los osteoclastos disminuyendo el desarrollo y reclutamiento de progenitores de osteoclastos y promoviendo la apoptosis de los osteoclastos. Además de su efecto inhibitorio sobre los osteoclastos, los bifosfonatos parecen tener efectos beneficiosos sobre los osteoblastos. En un modelo murino de osteoporosis inducida por glucocorticoides, los bisfosfonatos previenen la apoptosis de los osteocitos y los osteoblastos. Los bisfosfonatos se emplean comúnmente por razones médicas para inhibir la resorción ósea y, por lo tanto, encuentran utilidad en el tratamiento de hipercalcemia, osteoporosis, enfermedad ósea metastásica y enfermedad de Paget. Todos los bisfosfonatos tienen en común la estructura P-C-P, que es similar a la estructura P-O-P del pirofosfato nativo y difieren entre sí solo en los dos grupos "R". Algunos bisfosfonatos, por ejemplo, neridronato, ibandronato, pamidronato, risedronato y ácido zoledrónico, tienen un grupo nitrógeno y se denominan bisfosfonatos que contienen nitrógeno a diferencia del etidronato y el tiludronato, que no lo tienen.

Los términos "bisfosfonato" y "difosfonato", como se usan en el presente documento, incluyen ácidos, sales, ésteres,

hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos.

En varias realizaciones, se usan bisfosfonatos, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos en composiciones de la presente tecnología para eliminar células fagocíticas residentes y no residentes que tienen pigmento y partículas de tinta de tatuaje digeridas en el área perivascular de las capas dérmicas del sujeto.

Ejemplos de células fagocíticas incluyen, pero sin limitación, células del sistema fagocítico mononuclear, incluyendo, pero sin limitación, macrófagos y monocitos circulantes. Otras células capaces de fagocitosis incluyen, por ejemplo, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos. Lo más preferentemente, las células fagocíticas son macrófagos y/o monocitos. Según esta realización de la presente invención, la inhibición de las células fagocíticas incluye reducir el número de, eliminar (es decir, suprimir), retardar la proliferación y/o reducir la actividad de las células fagocíticas (por ejemplo, reduciendo la capacidad de fagocitar o secretar citocinas). A continuación se describen agentes farmacéuticos capaces de inhibir las células fagocíticas.

En diversas realizaciones, las composiciones de la presente tecnología contienen al menos un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos seleccionados de: alendronato, cimadronato, incadronato, clodronato, etidronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, minodronato, pamidronato, piridronato, tiludronato, olpadronato, neridronato, YH529, EB 1053 e ISA-13-1. Al menos uno de estos bisfosfonatos, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos están formulados con al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable para formar una composición de eliminación de tatuajes que se puede aplicar al menos a una parte de un tatuaje mediante los procedimientos de administración desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, el bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos pueden mezclarse con el al menos un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, o el bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos pueden estar encapsulados en una partícula, formando así una partícula de bisfosfonato. Como se usa en el presente documento, una partícula de bisfosfonato puede incluir: liposomas, nanoesferas, microesferas, bicapas lipídicas, nanopartículas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas y similares. La partícula puede tener una pared exterior que define un espacio interior que se puede llenar con el bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, la partícula puede comprender al menos un material biodegradable, por ejemplo, uno o más lípidos (por ejemplo, un lípido formador de liposomas), PGLA, silicio, celulosa, minerales inorgánicos (por ejemplo, cerámicas a base de calcio) que se degradan cuando son absorbidos o fagocitados por una célula fagocítica. Como se usa en el presente documento, el término fagocitosis también abarca formas de endocitosis, incluyendo, pero sin limitación, pinocitosis, endocitosis mediada por receptor y otros medios celulares para absorber/internalizar pigmentos de tinta de tatuaje o material de partículas de tinta en las capas dérmicas de la piel.

La cantidad de dosificación del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, y el intervalo, pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles intradérmicos de piel del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, que son suficientes para inducir el efecto biológico (concentración eficaz, CE). La CE variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para alcanzar la CE dependerán de diversos factores relacionados con el sujeto a tratar y la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas de los liposomas y/o los niveles del bisfosfonato administrado, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones de la presente tecnología pueden administrarse a una región de la piel usando un medio inyectable. En algunas realizaciones, una composición inyectable puede comprender partículas de bisfosfonato que contienen al menos un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable. En diversas realizaciones, las partículas de bisfosfonato pueden incluir liposomas, nanoesferas, microesferas, bicapas lipídicas, nanopartículas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas y similares.

De acuerdo con este aspecto de la presente tecnología, las partículas de bisfosfonato se preparan de modo que el tamaño de la partícula de bisfosfonato sea lo suficientemente grande como para ser internalizado esencialmente por fagocitosis, dirigiendo así las composiciones de la presente tecnología específicamente a las células fagocíticas. En los presentes procedimientos se pueden emplear partículas de bisfosfonato que varían de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 5,0 μm , preferentemente de aproximadamente 0,05 μm a aproximadamente 1 μm . En algunas realizaciones, bisfosfonatos, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos que contienen partículas se dirigen directamente a las células fagocíticas en las capas dérmicas de la piel del sujeto, preferentemente en el intervalo de tamaño de 0,02-2,5 μm , más preferentemente 0,05-1,0 μm y más preferentemente 0,07-0,7 μm .

La partícula de bisfosfonato se puede proporcionar en cualquier forma adecuada que incluya, pero sin limitación, una

- solución, una suspensión, una emulsión, o cualquier forma de mezcla. La partícula de bisfosfonato puede administrarse en formulación con cualquier excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la formulación puede administrarse en una forma de dosificación tópica convencional tal como, por ejemplo, una crema, una pomada, una formulación en aerosol, un pulverizador sin aerosol, un gel, una espuma, una solución, una suspensión, una dispersión, una emulsión, una microemulsión, una pasta, un polvo, una barra sólida (por ejemplo, barras a base de cera o petróleo), una toallita, un aceite, una loción y similares. En una realización particular, la partícula de bisfosfonato se proporciona en una formulación en crema adecuada para administración tópica. En otra realización, la partícula de bisfosfonato se proporciona como una formulación inyectable, por ejemplo, una formulación intradérmica.
- En diversas realizaciones, la partícula de bisfosfonato puede comprender uno o más bisfosfonatos mezclados con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso con partículas de bisfosfonato pueden incluir uno o más de un vehículo, un diluyente, un aglutinante, un lípido, por ejemplo, colesterol, aceite de oliva, etc., un lípido formador de liposomas, un polímero o monómero liberador de fármacos, un potenciador de la penetración de la piel, por ejemplo un alcohol inferior (por ejemplo metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, o combinaciones de los mismos), un agente quelante, un tensioactivo, un agente emulsionante, un agente espesante, un modificador del pH, un analgésico, un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un anestésico, un esteroide y un agente quelante (por ejemplo: etilendiaminotetraacetato (EDTA), desferrioxamina, clioquinol, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), pequeños quelantes hidrófobos, tales como fenantrolina o bupiridina, quelante de hierro hexadentado y deferoxamina (también conocida como desferrioxamina, desferoxamina, DFO, DFOA o desferal).
- En una realización específica, la partícula de bisfosfonato es un liposoma que contiene uno o más de bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos o derivados de los mismos. En esta realización, los liposomas útiles en la presente tecnología pueden incluir cualquier estructura sintética (vesículas unilamelares o multilamelares) que esté hecha con lípidos liposómicos en una fase cristalina líquida o en una fase de gel líquido, que encierran un volumen de líquido que comprende un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los liposomas pueden estar recubiertos (por ejemplo, con albúmina) o no recubiertos.
- En algunas realizaciones, los liposomas pueden incluir emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares. Los liposomas se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Los liposomas pueden estar cargados positivamente, ser neutros o, más preferentemente, estar cargados negativamente. En diversas realizaciones, el liposoma puede comprender colesterol, un lípido formador de liposomas y, opcionalmente, un polímero poliiónico. En algunas de estas realizaciones, el lípido formador de liposomas seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diesteoilfosfatidilcolina, esfingomielina, diacilglicerol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, diesteoilfosfatidilcolina y diesteoilfosfatidil etanolamina y combinaciones de las mismas.
- En diversas realizaciones, los liposomas de la presente tecnología también pueden comprender un tensioactivo no iónico. En algunos ejemplos, el tensioactivo no iónico puede incluir: polioxil 35, aceite de ricino hidrogenado polioxil 40 (Cremophor RH 40) y aceite de ricino hidrogenado polioxil 60 (Cremophor RH 60), así como d- α -tocoferol, succinato de polietilenglicol 1000, polisorbato 20, polisorbato 80, monolaurato de sorbitano (Span 20), monopalmitato de sorbitano (Span 40); monoestearato de sorbitano (Span 60); monooleato de sorbitano (Span 80), Solutol HS 15, poloxámero 407, Labrafil M-1944CS, Labrafil M-2125CS, Labrasol, Gellucire 44/1. En algunas realizaciones, el tensioactivo no iónico es monooleato de sorbitano.
- Como se ha detallado anteriormente, muchas propiedades influyen en la captación de liposomas por las células fagocíticas, incluyendo, pero sin limitación, el tamaño de los liposomas, la carga y la hidrofobicidad, así como los componentes fosfolípidicos y no fosfolípidicos del liposoma.
- Los liposomas pueden modificarse de cualquier otra forma para mejorar su absorción por las células fagocíticas, por ejemplo, uniéndoles moléculas reconocidas selectivamente por las células fagocíticas, tales como ligandos que interactúan con el receptor Fc de macrófagos, proteínas séricas tales como albúmina o ligandos de galactosilo, o la inclusión de sustancias en la bicapa tales como complemento, fibronectina, lipoproteínas, albúminas o gammaglobulina.
- Los liposomas pueden ser una sola capa lipídica o pueden ser multilamelares. Si el agente capaz de inhibir las células fagocíticas es hidrófilo, su suministro puede mejorarse aún más utilizando grandes vesículas unilamelares debido a su mayor volumen interno. Por el contrario, si el agente es hidrófobo, su suministro puede mejorarse aún más usando vesículas multilamelares. Como alternativa, el agente capaz de regular negativamente las células fagocíticas (por ejemplo, oligonucleótido) puede no ser capaz de penetrar en la bicapa lipídica y, en consecuencia, permanecería adsorbido en la superficie del liposoma. En este caso, aumentar el área de superficie del liposoma puede mejorar aún más el suministro del agente terapéutico. Los liposomas adecuados de acuerdo con la invención son preferentemente liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir de uno cualquiera o más de fosfatidilcolina, diesteoilfosfatidilcolina, esfingomielina, diacilglicerol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilglicerol, diesteoilfosfatidilcolina y diesteoilfosfatidil etanolamina y colesterol. El diámetro de los liposomas usados varía preferentemente de aproximadamente 0,05-25 micrómetros, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente

10 micrómetros, o de aproximadamente 0,08 a aproximadamente 1,0 micrómetros. Sin embargo, también se pueden usar otros tamaños de liposomas o intervalos de diámetro adecuados para la fagocitosis por las células fagocíticas, y pueden variar mucho entre los tipos de células, tales como monocitos y macrófagos. En algunas realizaciones ilustrativas, los liposomas pueden variar en diámetros entre, por ejemplo, de 0,01 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, o por ejemplo, de aproximadamente 0,1 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros, o de aproximadamente 0,008 micrómetros a aproximadamente 1 micrómetro. Para dimensionar los liposomas, se puede usar homogeneización, que se basa en la energía de corte para fragmentar los liposomas grandes en pequeños. Los homogeneizadores, que pueden usarse convenientemente, incluyen microfluidizadores producidos por Microfluidics de Boston, Massachussets. En un procedimiento de homogeneización típico, los liposomas se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de liposomas seleccionados. La distribución del tamaño de partícula se puede controlar mediante la discriminación convencional del tamaño de partícula del haz láser. La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica es un procedimiento eficaz para reducir los tamaños de liposomas a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión realiza un ciclo a través de la membrana, una o más veces, hasta que se logra la distribución deseada del tamaño de liposoma. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poros sucesivamente más pequeñas para lograr una reducción gradual del tamaño de los liposomas.

En algunas realizaciones, los liposomas de la presente tecnología comprenden un bisfosfonato, por ejemplo, clodronato, encapsulado en un liposoma hecho de fosfatidilcolina de soja hidrogenada como el lípido formador de liposomas. Los liposomas de clodronato también pueden contener monooleato de sorbitano. Se conocen procedimientos para fabricar liposomas que contienen clodronato, por ejemplo, según lo dispuesto en Van Rooijen, N, Sander, A. (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications J. Immunol. Methods 174:83-93, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, los liposomas de clodronato se pueden producir mediante la mezcla de un lípido formador de liposomas con colesterol y una solución de clodronato (que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,5 M) y sonicando suavemente la mezcla. Los liposomas resultantes pueden entonces dializarse, centrifugarse, o lavarse de otro modo para eliminar el clodronato libre antes de la administración o formulación en una dosis tópica, transdérmica o inyectable. En algunas realizaciones, los liposomas de clodronato listos para inyección (liposomas encapsulados de clodronato multilamelar) están disponibles comercialmente en Encapsula NanoSciences, (Brentwood, TN EE. UU.).

La cantidad de una composición a administrar será, por supuesto, dependiente del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que la receta, etc. La concentración de partículas de bisfosfonato en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,5 %, por lo general, o al menos aproximadamente, hasta un 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

En una realización, el bisfosfonato atrapado, encapsulado o capturado utilizado en relación con las formulaciones y procedimientos de la presente tecnología puede tener una concentración que varía de aproximadamente 0,7 M a aproximadamente 0,001 M. En algunas realizaciones, la cantidad de bisfosfonato relativa a la cantidad de partícula puede representar de aproximadamente menos de aproximadamente 0,5 %, a aproximadamente el 20 % de la partícula (por ejemplo, liposoma) en una base molar y del 0,05 al 10 % en una base por peso. Descrito por relación, en algunas realizaciones, las partículas de liposoma tienen una relación de bisfosfonato encapsulado a lípidos (en una base molar) de aproximadamente 1:3 a 1:250 y una relación de bisfosfonato encapsulado a lípidos (en una base por peso) de aproximadamente 1:10 a 1:2000. En algunas realizaciones, la relación molar de bisfosfonato encapsulado, por ejemplo, clodronato, a lípidos en la preparación liposómica puede variar de 1:4 a 3:4. En algunas realizaciones, la relación en peso de bisfosfonato a lípido puede variar de 1:3 a 1:10. En diversas realizaciones, las partículas de bisfosfonato pueden formularse para producir una crema, una pomada, una formulación en aerosol, un pulverizador sin aerosol, un gel, una espuma, una solución, una suspensión, una dispersión, una emulsión, una microemulsión, una pasta, un polvo, una barra sólida (por ejemplo, barras a base de cera o petróleo), una toallita, un aceite, una loción, tal que cuando se administra a una región de la piel, se blanquean a través de una aplicación tópica, un dispositivo transdérmico, tal como un parche o inyectado por vía intradérmica, la dosis administrada de la formulación de partículas de bisfosfonato proporciona desde aproximadamente 1 nanogramo de bisfosfonato por 50 microgramos de tejido intradérmico hasta aproximadamente 25 microgramos de bisfosfonato por 50 microgramos de tejido en una base por peso. En otras realizaciones, las formulaciones de la presente tecnología comprenden de aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % (% p/vol.) de los liposomas, en las que la relación de bisfosfonato a lípido en los liposomas varía de 1:3 a 1:250 en una base por peso.

En algunas realizaciones, las diversas composiciones liposómicas comprenden liposomas que contienen de 0,1 mg/ml a aproximadamente 1.000 mg/ml del bisfosfonato, por ejemplo, clodronato dentro de los liposomas, preferentemente, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas realizaciones, la relación molar de bisfosfonato, por ejemplo, clodronato, a lípidos en el liposoma puede variar de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 3:4. En diversas realizaciones, la solubilidad máxima del bisfosfonato usado, por ejemplo, clodronato, puede variar de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. En diversas realizaciones, las partículas de liposoma de la presente invención atrapan aproximadamente del 0,5 % a aproximadamente el 5 %, o de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 2 % de un bisfosfonato, por ejemplo, una solución de clodronato

(que tiene una concentración de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml). En diversas realizaciones, la relación en peso de bisfosfonato a lípido en los liposomas preparados puede variar de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación molar de bisfosfonato encapsulado, por ejemplo, clodronato, a lípidos en la preparación liposómica puede variar de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 3:4. En algunas realizaciones, la relación en peso de bisfosfonato, por ejemplo, el clodronato a los lípidos puede variar de 1:2 a 1:10, por ejemplo, de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10.

Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar el tamaño de la partícula antes de la administración a un paciente que lo necesite. Por ejemplo, se puede usar un medidor de partículas Nicomp Submicron (modelo 370, Nicomp Santa Bárbara, Calif.) utilizando dispersión de luz láser. Se conocen también en la técnica otros procedimientos para dimensionar partículas.

La determinación del tamaño óptimo, formulación y/o cantidad, de una partícula para ser engullida por una célula fagocítica puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los ensayos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 20040266734 y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 20040266734; y en Danenberg y col., Journal of cardiovascular pharmacology 2003, 42:671-9; Circulation 2002, 106:599-605; Circulation 2003, 108:2798-804. En un ensayo de detección *in vitro*, la captación de liposomas se puede inspeccionar visualmente usando cultivo de tejido *in vitro* de macrófagos. Las células fagocíticas pueden obtenerse a partir de una línea celular establecida o aislarse de un individuo como una línea celular primaria. En un ensayo *in vivo*, las partículas de bisfosfonato se pueden administrar a un sujeto de ensayo (por ejemplo, un sujeto experimental, un ratón o un conejo) y después de un periodo de tiempo establecido, los tejidos pueden ser extraídos y examinados usando microscopía confocal para buscar evidencias de ingestión de células fagocíticas de las partículas de bisfosfonato y la disminución de células fagocíticas. De forma similar, la disminución de las células fagocíticas que contienen pigmento o partículas de tinta puede visualizarse de manera similar usando microscopía confocal.

Normalmente, las partículas de la presente invención secuestran el bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, capaces de inhibir las células fagocíticas durante un tiempo suficiente para mejorar el suministro del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, y se vuelven biodisponibles cuando son digeridos por células fagocíticas en el área perivascular de la piel tratada del sujeto. Además, el bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos se liberan normalmente de las partículas de bisfosfonato cuando se ingieren dentro de la célula objetivo (por ejemplo, la célula fagocítica) en el sitio objetivo.

Además de las soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, microemulsiones, pastas, polvos que pueden inyectarse por vía intradérmica, las partículas de bisfosfonato también se pueden formular y administrar como formulaciones tópicas tales como cremas, pomadas, formulaciones en aerosol, un pulverizador sin aerosol, geles, espumas y cualquier otra formulación tópica conocida y médicamente aceptable, que se conocen en la técnica y se describen en "Remington: The Science And Practice Of Pharmacy", 1577-1591, 1672-1673, 866-885 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995); Ghosh, T. K.; y col. Transdermal And Topical Drug Delivery Systems (1997), ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden formularse, por tanto, de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. La formulación específica depende de la vía de administración elegida y del agente. En una realización, la composición se aplica por vía tópica a una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje. Una composición administrada por vía tópica que puede usarse en las realizaciones de la presente invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. Los vehículos útiles para el suministro tópico de los compuestos especificados de acuerdo con las realizaciones de la invención pueden ser cualquier vehículo conocido en la técnica para administrar productos farmacéuticos por vía tópica, incluyendo, pero sin limitación, disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como un polialcohol o agua; emulsiones (ya sean de aceite en agua o de agua en aceite), tales como cremas o lociones; micro emulsiones; geles; pomadas; liposomas; nanopartículas o micropartículas, polvos; y soluciones o suspensiones acuosas. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser uno o más excipientes inactivos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitación, aglutinantes, vehículos, diluyentes, agentes de suspensión, lubricantes, emulsionantes, aromatizantes, conservantes, colorantes y revestimientos.

Las composiciones administrables por vía tópica se preparan mezclando un vehículo farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz de un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, procedimientos proporcionados por textos de referencia convencionales tales como, Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 1577-1591, 1672-1673, 866-885 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995); Ghosh, T. K.; y col. Transdermal And Topical Drug Delivery Systems (1997), ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización, la composición administrable por vía tópica está en forma de una emulsión. Las emulsiones, tales como cremas y lociones son formulaciones tópicas adecuadas para su uso en la invención. Una emulsión es un sistema dispersado que comprende al menos dos fases inmiscibles, una fase dispersada en la otra en forma de gotitas que variaban en diámetro de 0,1 µm a 100 µm. Normalmente se incluye un agente emulsionante para mejorar la estabilidad. Cuando el agua es la fase dispersada y el aceite es el medio de dispersión, la emulsión se denomina emulsión de agua en aceite. Cuando el aceite se dispersa como gotitas en toda la fase acuosa como gotitas, la emulsión se denomina emulsión de aceite en agua. Las emulsiones, tales como cremas y lociones que pueden usarse como vehículos tópicos y su preparación se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 282-291 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995), que se incorpora en el presente documento por referencia.

En otra realización, la composición administrable por vía tópica está en forma de un gel, por ejemplo, un gel bifásico o un gel monofásico. Los geles son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones de pequeñas partículas inorgánicas o grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido. Cuando la masa de gel comprende una red de pequeñas partículas inorgánicas discretas, se clasifica como un gel bifásico. Los geles monofásicos consisten en macromoléculas orgánicas distribuidas uniformemente a través de un líquido, de modo que no existen límites aparentes entre las macromoléculas dispersadas y el líquido. Los geles adecuados para su uso en la invención se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1517-1518 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995), que se incorpora en el presente documento por referencia.

En una realización, la composición administrable por vía tópica comprende un gel acuoso que comprende agua y una cantidad gelificante de agua de un agente gelificante farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en carbómeros, poliacrilato de glicerina, y mezclas de los mismos, y la composición tópica tiene un pH fisiológicamente aceptable.

Los espesantes poliméricos (agentes gelificantes) que pueden usarse en composiciones de acuerdo con las realizaciones de la presente invención incluyen los conocidos por un experto en la materia, tales como gelificantes hidrófilos e hidroalcohólicos utilizados frecuentemente en las industrias cosmética y farmacéutica. Preferentemente, el gelificante hidrófilo o hidroalcohólico comprende "CARBOPOL®" (B.F. Goodrich, Cleveland, Ohio), "HYPAN®" (Kingston Technologies, Dayton, N.J.), "NATROSOL®" (Aqualon, Wilmington, Del.), "KLUCEL®" (Aqualon, Wilmington, Del.) O "STABILEZE®" (ISP Technologies, Wayne, N.J.). Preferentemente, el agente gelificante comprende entre aproximadamente el 0,2 % y aproximadamente el 4 % en peso de la composición. Más particularmente, el intervalo de porcentaje en peso composicional preferido para "CARBOPOL®" está entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 2 %, mientras que el intervalo de porcentaje en peso preferido para "NATROSOL®" y "KLUCEL®" está entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 4 %. El intervalo de porcentaje en peso composicional preferido tanto para "HYPAN®" como para "STABILEZE®" está entre 0,5 % y aproximadamente 4 %.

"CARBOPOL®" es uno de los numerosos polímeros de ácido acrílico reticulado que reciben el nombre general adoptado de carbómero. Estos polímeros se disuelven en agua y forman un gel transparente o ligeramente turbio tras la neutralización con un material cáustico tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina u otras bases de amina. "KLUCEL®" es un polímero de celulosa que se dispersa en agua y forma un gel uniforme tras la hidratación completa. Otros polímeros gelificantes preferidos incluyen hidroxietilcelulosa, goma de celulosa, crosopolímero de decadieno MVE/MA, copolímero de PVM/MA, o una combinación de los mismos.

En otra realización preferida, la composición administrable por vía tópica tiene la forma de una pomada. Los ungüentos son semisólidos oleaginosos que contienen poca o ninguna agua. Preferentemente, la pomada está basada en hidrocarburos, tales como una cera, vaselina o aceite mineral gelificado. Los ungüentos adecuados para su uso en la invención son bien conocidos en la técnica y se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1585-1591 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995), que se incorpora en el presente documento por referencia.

En una realización de la presente invención, la composición administrable por vía tópica comprende al menos una de entre una crema, una emulsión, una espuma, una pomada, una dispersión, una pasta, un pulverizador, una solución, un aceite o una microemulsión, en la que las composiciones tópicas comprenden una partícula de bisfosfonato y al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en: ácido esteárico, monooleato de sorbitano (Span80), alcohol estearílico, alcohol cetílico, etanol, glicerina, polietilenglicol, agua y mezclas de los mismos, y la composición tópica tiene un pH fisiológicamente aceptable.

En otra realización, la composición administrable por vía tópica está en forma de una solución o suspensión acuosa, preferentemente, una solución acuosa. Las formulaciones tópicas acuosas adecuadas para su uso en la invención incluyen las descritas en (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995), que se incorpora en el presente documento por referencia.

El pH de las formulaciones tópicas de la invención está preferentemente dentro de un pH fisiológicamente aceptable, por ejemplo, dentro del intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferentemente, de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 6,5. Para estabilizar el pH, preferentemente, se incluye una cantidad eficaz de un tampón. En una realización, el agente tamponante está presente en la formulación tópica acuosa en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1 por ciento en peso de la formulación. Se pueden usar ácidos o bases

para ajustar el pH según sea necesario.

Los agentes de ajuste de la tonicidad pueden incluirse en las formulaciones tópicas acuosas para su uso en las realizaciones de la presente invención. Los ejemplos de agentes de ajuste de la tonicidad adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol, dextrosa, glicerina, polietilenglicol y propilenglicol. La cantidad del agente de tonicidad puede variar ampliamente dependiendo de las propiedades deseadas de la formulación. En una realización, el agente de ajuste de la tonicidad está presente en la formulación tópica acuosa en una cantidad de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 0,9 por ciento en peso de la formulación.

Preferentemente, las formulaciones tópicas acuosas tienen una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 15 cps a aproximadamente 25 cps. La viscosidad de las soluciones acuosas de la invención se puede ajustar añadiendo agentes de ajuste de la viscosidad, por ejemplo, pero sin limitación, alcohol polivinílico, povidona, hidroxipropil metilcelulosa, poloxámeros, carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

En una realización preferida, la formulación tópica acuosa es solución salina isotónica que comprende un conservante, tal como cloruro de benzalconio o dióxido de cloro, un agente de ajuste de la viscosidad, tal como alcohol polivinílico y un sistema tampón tal como citrato de sodio y ácido cítrico.

La composición administrable por vía tópica puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables tales como los enumerados en Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 866-885 (Alfonso R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995; Ghosh, T. K.; y col. Transdermal And Topical Drug Delivery Systems (1997), incorporadas en el presente documento por referencia, incluyendo, pero sin limitación, protectores, adsorbentes, demulcentes, emolientes, conservantes, antioxidantes, hidratantes, agentes tamponantes, agentes solubilizantes, agentes de penetración de la piel y tensioactivos.

Los protectores y adsorbentes adecuados incluyen, pero sin limitación, polvos finos, estearato de cinc, colodón, dimeticona, siliconas, carbonato de cinc, gel de aloe vera y otros productos de aloe, aceite de vitamina E, alatoína, glicerina, vaselina y óxido de cinc.

Los demulcentes adecuados incluyen, pero sin limitación, benzoína, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa y alcohol polivinílico.

Los emolientes adecuados incluyen, pero sin limitación, grasas y aceites animales y vegetales, alcohol miristílico, alumbre y acetato de aluminio.

En una realización de la presente invención, la composición administrable por vía tópica comprende además uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un conservante, un anestésico local y un humectante para la piel.

Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, compuestos de amonio cuaternario, tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cetrimida, cloruro de dequalinio y cloruro de cetilpiridinio; agentes mercuriales, tales como el nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico y timerosal; agentes alcohólicos, por ejemplo, clorobutanol, alcohol feniletílico y alcohol bencílico; dióxido de cloro estabilizado, por ejemplo, el dióxido de cloro estabilizado patentado de BioCide International, Inc. de Norman, Okla., comercializado con la marca registrada Purogene™ o Purite™. Otros productos adecuados de dióxido de cloro estabilizado incluyen los ésteres antibacterianos comercializados con la marca registrada DuraKlor® por Rio Linda Chemical Company, Inc., y los comercializados con la marca registrada Antheium Dioxide® de International Dioxide, Inc., por ejemplo, ésteres del ácido parahidroxibenzoico; y otros agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, clorocresol, ácido benzoico y polimixina.

Los antioxidantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido ascórbico y sus ésteres, bisulfito de sodio, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, tocoferoles y agentes quelantes tales como EDTA y ácido cítrico.

Los humectantes adecuados incluyen, pero sin limitación, glicerina, sorbitol, polietilenglicoles, urea y propilenglicol.

Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, tampones acetato, tampones citrato, tampones fosfato, tampones de ácido láctico y tampones borato.

Los agentes solubilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruros de amonio cuaternario, ciclodextrinas, benzoato de bencilo, lecitina, ésteres de sorbitano y polisorbatos.

Los agentes de penetración cutánea adecuados incluyen, pero sin limitación, alcohol etílico, alcohol isopropílico, octilfenilpolietilenglicol, ácido oleico, polietilenglicol 400, propilenglicol, N-decilmetilsulfóxido, ésteres de ácido graso (por ejemplo, miristato de isopropilo, laurato de metilo, monooleato de glicerol y monooleato de propilenglicol); y N-metilpirrolidona.

La composición administrable por vía tópica según las realizaciones de la presente tecnología puede incluir productos farmacéuticos o sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos y, opcionalmente, uno o más de otros ingredientes farmacéuticamente activos, incluyendo, pero sin limitación, alquitrán, ditranol (antralina), corticosteroides

tales como desoximetasona (Topicort), fluocinonida, análogos de vitamina D (por ejemplo, calcipotriol), retinoides, aceite de argán, psoraleno, metotrexato, ciclosporina, retinoides u otras formas sintéticas de vitamina A, que pueden ayudar en la eliminación de células fagocíticas en el área de administración.

La composición administrable por vía tópica según las realizaciones de la invención puede incluir además anestésicos y analgésicos locales, tales como alcanfor, mentol, lidocaína y dibucaína y pramoxina; antifúngicos, tales como ciclopirox, cloroxilenol, triacetina, sulconazol, nistatina, ácido undecilénico, tolnaftato, miconizol, clotrimazol, oxiconazol, griseofulvina, econazol, ketoconazol y anfotericina B; antibióticos y antiinfecciosos, tales como mupirocina, eritromicina, clindamicina, gentamicina, polimixina, bacitracina y sulfadiazina de plata; y antisépticos, tales como yodo, yodopovidona, cloruro de benzalconio, ácido benzoico, clorhexidina, nitrofurazina, peróxido de benzoílo, peróxido de hidrógeno, hexaclorofeno, fenol, resorcinol y cloruro de cetilpiridinio.

En diversas realizaciones, la cantidad de agente activo en las composiciones descritas en el presente documento (es decir, en formulaciones inyectables, formulaciones tópicas y formulaciones transdérmicas), puede variar de 0,01 % a 5 % en peso del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. Por ejemplo, la composición puede comprender, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 18 % o 20 % en peso o en volumen de la composición final, del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos.

En una realización preferida, la composición comprende 0,05 %-20 %, 0,1 %-10 % o 0,1-5 % en peso del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos.

En varias realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del bisfosfonato, difosfonato, o ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, y comprenden al menos un lípido formador de liposomas seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina de soja hidrogenada, diestearoilfosfatidilcolina, esfingomielina, diacilglicerol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilglicerol, diestearilfosfatidilcolina y diestearilfosfatidil etanolamina y combinaciones de las mismas, y un emulsionante.

Procedimientos de uso

En algunas realizaciones, los procedimientos actuales implican la administración de una cantidad eficaz de un bisfosfonato o difosfonato, como se usa en el presente documento, que incluyen ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos a una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje para ser eliminado o decolorado.

Los procedimientos de la presente invención pueden realizarse sobre cualquier sujeto adecuado. Los sujetos adecuados incluyen, pero sin limitación, mamíferos, tales como, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejillos de indias, conejos, hámsteres, hurones, y similares), animales de compañía, tales como perros, gatos y animales de ganadería tales como vacas, cerdos, caballos, ovejas, cabras y similares. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto humano.

En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente tecnología proporciona la eliminación o la decoloración de un tatuaje en una región de la piel, comprendiendo el procedimiento: administrar a al menos una parte del tatuaje una composición que comprende una cantidad eficaz de un bisfosfonato y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable para causar, al menos, la decoloración del tatuaje en dicha región.

En diversas realizaciones, la cantidad eficaz administrada de un bisfosfonato y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable, se logra con el uso de una composición farmacéuticamente aceptable que proporciona una relación beneficio/riesgo adecuada que sea proporcional a las prácticas médicas convencionales para la eliminación dermatológica de tatuajes.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones útiles de los presentes procedimientos pueden utilizar bisfosfonato, y/o partículas que contienen al menos un bisfosfonato, o un difosfonato, o ácidos farmacéuticamente aceptables, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, los bisfosfonatos, cuando se encapsulan en liposomas o micropartículas, o nanopartículas en una forma de dosificación de tipo "partículas", son captados, por el procedimiento fagocítico mediado por los macrófagos y monocitos, y en cierta medida por otras células con actividad fagocítica, tales como los fibroblastos que residen en las capas dérmicas de la piel del sujeto. En una realización, la administración de partículas de bisfosfonato en forma de liposomas, una vez dentro de las células fagocíticas, la estructura liposómica del liposoma se ve alterada y los bifosfonatos encapsulados, difosfonato, o ácidos farmacéuticamente aceptables, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos se liberan en el citosol de la célula fagocítica, matando así las células fagocíticas en el área perivascular del sitio del tatuaje. Puesto que los macrófagos, en su estado normal, son reclutados a las capas dérmicas, participan en la fagocitosis para eliminar los pigmentos y las partículas de tinta del tatuaje.

Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que la administración de las composiciones de bisfosfonato

que contienen uno o más bisfosfonatos o difosfonato, ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, o partículas que contienen uno o más bisfosfonatos o difosfonato, ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos, reduce o decolora el tatuaje visible al agotar y/o destruir las células fagocíticas que tienen tinta de tatuaje fagocitada, y/o son importantes en la acumulación de pigmentos y partículas de tinta de tatuaje como materia extraña. Sin desear quedar limitado por una teoría particular, se cree que la destrucción de estas células fagocíticas residuales que contienen pigmento de tinta de tatuaje y/o partículas de tinta en las áreas perivasculares de la dermis da como resultado que el pigmento de tinta de tatuaje y las partículas de tinta se transporten a los ganglios linfáticos para su posterior eliminación, lo que da como resultado la decoloración del tatuaje en la zona tratada con las composiciones de la presente tecnología.

Otras células capaces de fagocitosis incluyen, por ejemplo, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos. Lo más preferentemente, las células fagocíticas son macrófagos y/o monocitos. En algunas realizaciones, el uso de las composiciones descritas en el presente documento que contienen uno o más bisfosfonatos o difosfonatos, ácidos, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos y derivados de los mismos para eliminar macrófagos y/o monocitos de las capas dérmicas puede ocurrir cuando el tatuaje se aplica recientemente en una región de la piel (es decir, dentro de las 24-72 horas) o después de que el tatuaje haya madurado (de 2 semanas a 50 años).

Los liposomas tienen el beneficio de ampliar la vida media al proteger el clodronato de la descomposición, mientras que también mejora la especificidad para los macrófagos. Los macrófagos engullen e ingieren fácilmente los liposomas de clodronato, liberando posteriormente el clodronato en el citosol. El clodronato es reconocido incorrectamente por la célula fagocítica en las mitocondrias de la célula, lo que en última instancia conduce a la muerte celular. A su vez, las partículas de pigmento contenidas dentro de los macrófagos se liberan y fragmentan y se disponen en los ganglios linfáticos del sujeto.

Administración

De acuerdo con la presente tecnología, un bisfosfonato, difosfonato, o ácidos farmacéuticamente aceptables, sales, ésteres, hidratos, polimorfos, hemihidratos, solvatos, y derivados de los mismos se administran en una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje para eliminar o decolorar un tatuaje en la región de la piel.

La presente invención proporciona así el uso de bisfosfonato o difosfonato, un complejo de bisfosfonato o difosfonato, o un ácido farmacéuticamente aceptable, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato y derivados de los mismos o partículas que contienen dicho bisfosfonato o difosfonato, un complejo de bisfosfonato o difosfonato, o un ácido farmacéuticamente aceptable, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, y derivados de los mismos, para la preparación de una composición para eliminar o decolorar un tatuaje en una región de la piel. En una realización, la composición comprende una forma de dosificación de tipo "partículas", en la que el bisfosfonato, o difosfonato, o un ácido farmacéuticamente aceptable, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, y un derivado de los mismos está encapsulado, incrustado y/o adsorbido dentro de una partícula, disperso en la matriz de partículas, adsorbido o unido en la superficie de la partícula, o en combinación de cualquiera de estas formas. La partícula incluye uno cualquiera de liposomas, micropartículas, nanopartículas, nanoesferas, microesferas, microcápsulas, o nanocápsulas conocidas en la técnica y ejemplos descritos en el presente documento, o combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las partículas que contienen bisfosfonato pueden administrarse en forma de solución intradérmica inyectable, emulsión, suspensión, dispersión y similares, o administrados como una composición tópica o como parte de un aplicador transdérmico, tal como un parche, a una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan para administración usando una solución inyectable que contiene las partículas de bisfosfonato de la invención. En algunas realizaciones, la composición se inyecta en una región de la piel que comprende al menos una parte de un tatuaje por vía intradérmica o mediante suministro intradérmico.

En diversas realizaciones de la presente tecnología, las partículas de bisfosfonato se suministran en el compartimento intradérmico o se suministran por vía intradérmica en una región de la piel que comprende al menos una parte de un tatuaje. De esta manera, las partículas de bisfosfonato se administran en la dermis de tal manera que las partículas de bisfosfonato alcanzan fácilmente la dermis papilar ricamente vascularizada y son absorbidas por las células fagocíticas que residen en las áreas perivasculares de la dermis papilar. En algunas realizaciones, las composiciones de bisfosfonato de la presente tecnología se pueden ubicar en la región superior de la dermis, es decir, la dermis papilar o en la parte superior de la dermis reticular relativamente menos vascular, de modo que el agente se difunda fácilmente en la dermis papilar.

En algunas realizaciones, las partículas de bisfosfonato de la presente tecnología pueden suministrarse predominantemente a una profundidad de al menos aproximadamente 0,3 mm, más preferentemente, al menos aproximadamente 0,4 mm y, lo más preferentemente, al menos aproximadamente 0,5 mm hasta una profundidad de no más de aproximadamente 2,5 mm, más preferentemente, no más de aproximadamente 2,0 mm y, lo más preferentemente, no más de aproximadamente 1,7 mm. En algunas realizaciones, las partículas de bisfosfonato liposómico pueden inyectarse por vía intradérmica en una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje a una profundidad de aproximadamente 0,3 mm a aproximadamente 1,25 mm, preferentemente a aproximadamente 1 mm de la superficie de la piel. Los procedimientos y dispositivos para el suministro intradérmico

de agentes activos son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos ilustrativos para la suministro intradérmico de agentes activos a regiones de la piel pueden incluir la administración intradérmica (ID) directa. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones de la presente tecnología en regiones de la piel que contienen al menos una parte de un tatuaje se puede lograr usando, por ejemplo, sistemas de inyección e infusión basados en microagujas, o cualquier otro medio conocido por un experto en la materia para dirigirse con precisión al compartimento intradérmico. Los dispositivos ejemplares incluyen los desvelados en las publicaciones de solicitud internacional PCT N.º WO 01/02178, publicada el 10 de enero de 2002; y WO 02/02179, publicada el 10 de enero de 2002, la patente de EE.UU. N.º 6.494.865, expedida el 17 de diciembre de 2002 y la patente de EE.UU. 6.569.143 expedida el 27 de mayo de 2003; y la publicación de los Estados Unidos N.º 2005/0163711 A1, publicada el 28 de junio de 2005; todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Las metodologías y dispositivos basados en microcánulas y microagujas también se describen en la publicación de los Estados Unidos N.º 2002-0095134, publicada el 18 de julio de 2002, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. La cánula de acero convencional también se puede usar para suministro intradérmico usando dispositivos y procedimientos como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.494.865, expedida el 17 de diciembre de 2002, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. Estos procedimientos y dispositivos incluyen el suministro de agentes a través de una "micro-cánula" de calibre estrecho (30 G o más estrecho) con una profundidad de penetración limitada (normalmente entre 100 µm y 2 mm), según lo definido por la longitud total de la cánula o la longitud total de la cánula que está expuesta más allá de una función de cubo que limita la profundidad.

En otras realizaciones, las partículas de bisfosfonato y las composiciones que comprenden las partículas de bisfosfonato pueden formularse para administración tópica usando las formulaciones tópicas descritas en el presente documento. Las formulaciones tópicas que contienen las partículas de bisfosfonato se pueden aplicar por vía tópica al tatuaje o partes del mismo usando una cantidad eficaz de la formulación tópica para causar, al menos, algo de decoloración del tatuaje después de una o más aplicaciones de la formulación tópica como se describe en el presente documento.

25 Dosificación

El término "cantidad eficaz" denota una cantidad de la composición que contiene partículas de bisfosfonato, que es eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado, es decir, al menos inducir una decoloración del tatuaje. La cantidad particular de la composición que contiene partículas de bisfosfonato que constituye una cantidad eficaz puede depender, al menos en parte, de uno o más factores. Tales factores incluyen, pero sin limitación, el bisfosfonato o difosfonato particular, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo que se administra, el estado del sistema inmunitario del sujeto (por ejemplo, suprimido, comprometido, estimulado); la vía de administración de la composición que contiene partículas de bisfosfonato; la antigüedad del tatuaje; el tipo de pigmentos contenidos en el tatuaje; la habilidad y/o experiencia de la persona que aplicó el tatuaje; el tamaño total del tatuaje; y el resultado deseado (es decir, reducción o eliminación completa). Por consiguiente, no es práctico establecer de forma general la cantidad que constituye una cantidad eficaz de un bisfosfonato o difosfonato, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo. El experto habitual en la materia, sin embargo, puede determinar fácilmente la cantidad apropiada con la debida consideración de tales factores.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención incluyen administrar suficiente bisfosfonato o difosfonato, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo para proporcionar una dosis de, por ejemplo, de aproximadamente 100 ng/kg a aproximadamente 50 mg/kg al sujeto, aunque en algunas realizaciones el procedimiento puede realizarse administrando el bisfosfonato o difosfonato, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo a una dosis fuera de este intervalo. En algunas de estas realizaciones, el procedimiento incluye administrar suficiente bisfosfonato o difosfonato, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo para proporcionar una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg al sujeto, por ejemplo, una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. El experto, por experimentación rutinaria, no debería tener dificultades sustanciales para determinar la cantidad eficaz en cada caso.

Una formulación adecuada puede contener, por ejemplo, aproximadamente 0,001 %, aproximadamente 0,002 %, aproximadamente 0,005 %, aproximadamente 0,01 %, aproximadamente 0,015 %, aproximadamente 0,02 %, aproximadamente 0,025 %, aproximadamente 0,05 %, aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,25 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,75 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, o aproximadamente 20 % de bisfosfonato o difosfonato activo, ácido, sal, éster, hidrato, polimorfo, hemihidrato, solvato, o derivado del mismo en una base (v/v), por ejemplo, uno o más de alendronato, cimadronato, clodronato, etidronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, minodronato, pamidronato, piridronato, tiludronato, olpadronato, neridronato, YH529, EB 1053 ISA-13-1 y sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y mezclas de los mismos. En una realización particular, la composición incluye aproximadamente el 5 % de uno o más de alendronato, cimadronato, incadronato, clodronato, etidronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, minodronato, pamidronato, piridronato, tiludronato, olpadronato, neridronato, YH529, EB 1053 ISA-13-1 y sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la cantidad de bisfosfonato en la composición varía de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml en una base de peso por volumen.

En algunas realizaciones de la invención, la composición de la presente tecnología que contiene partículas de bisfosfonato puede administrarse, por ejemplo, desde una dosis única hasta múltiples dosis administradas una o varias veces al día. En ciertas realizaciones, las partículas de bisfosfonato formuladas adecuadamente, se pueden administrar de aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente una vez al día. En una realización particular, la composición dosificada que contiene partículas de bisfosfonato se administra una vez al día. En una realización alternativa, la composición dosificada que contiene partículas de bisfosfonato se administra una vez cada dos días. En algunas realizaciones, la composición dosificada se administra a una región de la piel que contiene al menos una parte de un tatuaje, al menos una vez a la semana, o al menos dos veces a la semana, o al menos una vez al mes, o al menos 5-10 veces al mes o al menos 1-10 veces al 6 meses.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de composiciones de eliminación de tatuajes

Se usó la siguiente metodología para preparar 5 ml de solución de lípidos al 10 % (peso:volumen) para preparar una partícula liposómica encapsulada con el clodronato de bisfosfonato. En un matraz de fondo redondo de 100 ml se combinaron los siguientes: 0,5 gramos de fosfatidilcolina de soja al 95 % (sPC) (Avanti Lipids: 441601); 0,09 gramos de Span80 (Sigma-Aldrich: S6760). A esta mezcla, se le añaden 3 ml de cloroformo/metanol (2:1). El sPC y el Span80 se disuelven en la mezcla de cloroformo/metanol y se evaporan al vacío en un evaporador rotatorio hasta que se forma una película lipídica uniforme dentro del matraz. En un recipiente separado, el clodronato (es decir, el bisfosfonato seleccionado) (Sigma-Aldrich: D4434) se disuelve en etanol al 7 % (EtOH) para formar una solución con una concentración de 200 mg/ml. La película lipídica en el matraz de fondo redondo se hidrata con 10 ml de EtOH que contiene 200 mg/ml de clodronato. El matraz se lava con nitrógeno y luego se tapa. El matraz se hace girar luego durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). El matraz se deja reposar durante al menos 2 horas (o durante la noche) a temperatura ambiente. Los liposomas se forman por sonicación de la formulación a 40 W durante 20 minutos a 4 °C. Los liposomas formados que contienen clodronato se extruyen a través de una membrana de 400 nm veinte veces. Posteriormente, la formulación liposómica se extruye entonces a través de una membrana de 200 nm veinte veces.

La formulación liposómica extruida resultante se centrifuga en una centrifuga de rotor oscilante durante 8 horas a 50.000 RPM a 10 °C. La capa transparente inferior (es decir, clodronato libre en EtOH al 7 %) se elimina y se reutiliza para una preparación liposómica adicional. La capa superior se resuspende en EtOH al 7 %. La formulación resultante que contiene partículas de bisfosfonato (liposomas de clodronato) se centrifuga en una centrifuga de rotor oscilante durante 1 hora a 24.000 RPM a 10 °C. De nuevo, se elimina la capa flotante superior y el sedimento se resuspende en 5 ml de EtOH al 7 % para una concentración final de liposomas al 10 % (peso:volumen). Se forman alícuotas con los liposomas de clodronato y se enjuagan con nitrógeno, se tapan y se sellan con cinta de teflón. Los liposomas de clodronato se almacenan a 4 °C en la oscuridad.

Ejemplo 2. Apoptosis de macrófagos que contienen tinta con liposomas de clodronato *in vivo*

Usando un modelo establecido de tatuaje en ratones albinos, sin pelo, inmunocompetentes (SKH1), se ensayaron diversas formulaciones de liposomas encapsulados con clodronato. En resumen, se obtuvieron ratones macho SKH1 de Charles River (Boston, MA) a las 8 semanas de edad. Los ratones fueron alojados en el Centro de Cuidado de Animales Carleton en la Universidad Dalhousie y aclimatados en la sala de animales durante 2 semanas antes de su uso. Todos los tratamientos de los ratones cumplen con las pautas del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales. A las 10 semanas de edad, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y tatuados en la zona medioescapular con dos tatuajes medio sólidos y medio cubiertos de 1 cm² a 2 cm de distancia a cada lado de la columna usando una aguja de tatuaje cónica larga de 14 puntos (AIMS Inc., Honell, NY) en una máquina tatuadora comercial (AIMS Inc. Hornell, NY). Los tatuajes se dejaron curar durante 1 mes antes de iniciar el tratamiento con la formulación.

Al mes, la piel fue limpiada con dH₂O y se aplicaron 25 µl de (DiO⁺) marcado fluorescentemente a la formulación a un lado tatuado de la región medioescapular. La formulación se frotó uniformemente sobre el área de la piel usando un guante de caucho de nitrilo y luego se dejó secar sin cubrir. En diferentes puntos temporales, los animales fueron sacrificados mediante isoflurano seguido de dislocación cervical. Se cosecharon piel y ganglios linfáticos de drenaje. Cada segmento de piel y ganglio linfático se dividió por la mitad: (1) se fijó en PFA al 4 % durante la noche y se transfirió a tampón de Millonig hasta que se hunde en OCT 2:1: sacarosa (20 %) o (2) se fijó en formalina tamponada neutro al 10 % y se incrustó en parafina para histología general y marcado de apoptosis.

La piel congelada se cortó a 7 µm en un criostato y se almacenó a 4 °C hasta su uso. Las secciones congeladas se tiñeron para CD11b (AbD Serotec) seguido de una IgG anti-rata de cabra Alexa Fluor® 555 (H + L) (Invitrogen). Los núcleos se marcaron con Hoechst (H1399, Invitrogen).

Las secciones de parafina se cortaron a 5 µm y se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante para el kit de apoptosis Apoptag peroxidasa (Millipore). F4/80+, TUNEL, liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente, y Hoechst se visualizarán utilizando un Zeiss Axioplan II y se tomará una imagen con una cámara de color AxioCam HRC (Carl Zeiss International, Toronto, ON). La co-localización de F4/80-Alexa Fluor® 647, TUNEL-PE y liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente-DiO aparece en blanco. La tinta del tatuaje

aparece opaca, permitiendo así la visualización de F4/80, liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente, TUNEL, y el pigmento del tatuaje.

Las secciones de piel de los ratones tratados revelan la absorción de los liposomas de clodronato *in vivo* después de 24 horas y después de 2 semanas. En la FIG. 1A, la fotomicrografía ilustra las capas dérmicas marcadas con flechas blancas para indicar la tinta del tatuaje captada por los macrófagos como se ve con microscopía óptica, y como se muestra en la FIG. 1B, la fotomicrografía ilustra las capas dérmicas marcadas con flechas blancas para indicar la tinta de tatuaje y los liposomas de clodronato captados por macrófagos como se ve con microscopía de fluorescencia. Los liposomas inyectados tienen un tinte fluorescente y se ven claramente en las capas dérmicas después de 24 horas. Estos liposomas marcados fluorescentemente que contienen clodronato son absorbidos por los macrófagos residentes como se indica en la FIG. 1C, que ilustra una superposición de las estructuras de microscopía óptica con la presencia de macrófagos que han fagocitado los liposomas de clodronato como se ve con microscopía de fluorescencia.

Se cree que las células fagocíticas, tales como los macrófagos, captan las partículas de tinta y proceden a transportar la tinta al ganglio linfático de drenaje a través del sistema linfático. Los resultados mostrados en las FIGs. 1D-F ilustran que, en el primer punto de tiempo de 24 horas, parte de la tinta ha sido transportada a los ganglios linfáticos.

Sin embargo, después de 2 semanas, los macrófagos que contienen los liposomas de clodronato se ven visiblemente transportando tinta a los ganglios linfáticos como se muestra en las FIGs. 1G-H.

Para confirmar que los macrófagos que han captado la tinta y los liposomas son sensibles a la actividad apoptótica de la preparación liposómica administrada, la FIG. 2 muestra una fotomicrografía que representa el tejido cutáneo dérmico en el modelo de ratones con liposomas de clodronato de la presente tecnología y un anticuerpo de apoptosis para ilustrar la presencia de macrófagos apoptóticos. Como se puede ver en la FIG. 2, los macrófagos apoptóticos se ven con partículas de tinta de tatuaje digeridas. Estos resultados sugieren fuertemente que los macrófagos dérmicos absorben preferentemente los liposomas de clodronato. Los macrófagos que contienen partículas de tinta también captan los liposomas encapsulados en clodronato y sufren apoptosis, lo que da como resultado una reducción en la cantidad de partículas de tinta presentes en la piel tratada.

Ejemplo 3. Captación de partículas de tinta extrañas por macrófagos

La capacidad de inducir la muerte celular de macrófagos usando clodronato liposómico *in vitro* ha sido demostrada por el laboratorio del inventor. Se puede realizar un protocolo *in vivo* para eliminar tatuajes como se describe. Un tatuador profesional tatúa cerdos (al menos 4 por grupo-4 grupos, dos grupos de tratamiento y dos grupos de control), para imitar mejor un tatuaje administrado profesionalmente en un ser humano. El tatuaje se dividirá en un número representativo de regiones que van del 1 al 10. Se preparará una composición de partículas de bisfosfonato que comprende clodronato liposómico en etanol al 7 % como se describe en el Ejemplo 1. Se prepararán liposomas encapsulados de clodronato (ensayo) y liposomas de control (control) para dos formas de administración: (1) intradérmica (inyección) y (2) transdérmica (crema). Se permitirá que los tatuajes se curen antes de comenzar la administración de los liposomas de control y ensayo. Los liposomas de control y ensayo se administran (100 µl de la preparación liposómica por vía intradérmica o 100 mg de una crema que contiene 100 µl de la preparación liposómica; cada dosis administrada contiene una concentración liposómica de 10 mg/kg de peso del sujeto) a una o más regiones de la piel tatuada en el día 0, y después una vez al día durante un periodo de diez días. Los tatuajes se fotografian cada día, comenzando en la administración inicial y terminando con el cese del tratamiento y luego cuatro semanas después del cese del tratamiento. Las fotografías se toman con configuraciones de luz idénticas. El grado de decoloración se mide visualmente de manera cualitativa usando una escala +, ++, +++ y ++++ que representa: + ~ 10 % de decoloración, ++ representa ~ 10-33 % de decoloración, +++ representa ~ 34-66 % de decoloración y ++++ representa > 66 % de decoloración, comparando cada imagen con la imagen del tatuaje tomada en el día 0.

Ejemplo 4. Eliminación de tinta de tatuaje *in vivo*

Se obtuvieron ratones macho SKH1 de Charles River (Boston, MA) a las 8 semanas de edad. Los ratones fueron alojados en el Centro de Cuidado de Animales Carleton en la Universidad Dalhousie y aclimatados en la sala de animales durante 2 semanas antes de su uso. Todos los tratamientos de los ratones cumplen con las pautas del Consejo Canadiense para el Cuidado de Animales. Los animales fueron tatuados en la espalda con líneas longitudinales de 4 x 4 cm con tinta negra Phoenix TAT2, que luego se dejaron curar. Después de aproximadamente 12 semanas de curación, el sitio del tatuaje se trató por vía tópica con una composición de la presente invención. El tratamiento administrado por vía tópica es una composición (25 microlitros) compuesta por una solución que contiene lípidos 33,07 mM que contiene aproximadamente 3 mg/ml de clodronato en un medio de etanol al 7 % a pH 7,2, (en adelante "composición liposómica que contiene clodronato"). Cada dosis de la composición liposómica que contenía clodronato contenía 25 microlitros de la composición liposómica que contenía clodronato, se aplicó por vía tópica y se extendió por igual sobre una línea de tatuaje de 4 cm. La piel tatuada se trató con una dosis a la semana, para un total de 12 dosis por sitio de tratamiento. Se eliminaron secciones de piel tatuada y ganglios linfáticos de sitios tratados y no tratados en los siguientes momentos: t=día 1 (Figuras 4, 5, 9 y 11), t=día 2 (Figuras 5, 6 y 11), t=día 5 (Figuras 5 y 11), t=día 7 (Figuras 5, 7, 8 y 11), t=día 14 (Figuras 5, 8, 9, 10 y 11) y t=12 semanas (Figuras 3 y 12). Se eliminaron secciones completas de la piel capturando la epidermis y las capas dérmicas de la piel y se analizaron adicionalmente con microscopía óptica o tinción de fluorescencia.

Los ratones fueron tatuados y se dejaron curar durante 3 meses antes de iniciar el tratamiento. La Figura 3 representa una sección representativa de parafina de un tatuaje curado teñido con hematoxilina (núcleos) y eosina (citoplasma). En el tatuaje curado, la tinta del tatuaje en la dermis superior se ha reubicado en gran medida en la dermis interna. Como se muestra en las Figuras 4A-4C, la piel se trató por vía tópica con liposomas que contenían clodronato marcados fluorescentemente. Como se muestra en la Figura 4A, la fotomicrografía con microscopía óptica de la sección de piel muestra la dispersión de la tinta del tatuaje en la piel por toda la dermis reticular. La Fig. 4B representa liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente. La Fig. 4C representa una imagen superpuesta de la Fig. 4A y la Fig. 4B de piel de un animal tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente y cosechada 24 horas después. El pigmento del tatuaje se puede ver como negro opaco. La tinta del tatuaje sin curar se puede ver en la dermis reticular. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente se puede ver en múltiples áreas. La imagen fue tomada a 40x.

Las Figuras 5A-5E representan imágenes de fotomicrografía fluorescente de piel de ratones tratados con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente en t=día 0 y recogidos como se muestra en la Fig. 5A en t=día 1, Fig. 5B en t=día 2, Fig. 5C en t=día 5, Fig. 5D en t=día 7 y Fig. 5E en el día 14. El pigmento del tatuaje se puede ver como negro opaco. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente parece alcanzar su punto máximo a las 48 horas. Las imágenes fueron tomadas a 40x.

Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, secciones representativas (6A) de piel y (6B) de ganglios linfáticos de ratones tratados con composición liposómica que contiene clodronato en t=0, fueron recogida en el día 2 y teñidas para TUNEL (apoptosis). TUNEL fue desarrollado con DAB (marrón). El pigmento del tatuaje se puede ver como negro opaco. La colocación de la tinta del tatuaje y la apoptosis se pueden ver en múltiples células de la piel como se muestra en la Fig. 6A. Se puede ver pigmento en el ganglio linfático, pero hay una marcada ausencia de apoptosis en la sección de ganglios linfáticos como se muestra en la Fig. 6B. Las imágenes fueron tomadas a 63x.

Como se muestra en la Figura 7, una imagen representativa del flujo de células CD11b+ (macrófagos y monocitos) se dirige desde la piel hacia los ganglios linfáticos después de la dosificación con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente en t=0 y la recogida en el día 7. La tinta del tatuaje aparece como opaca.

En otros experimentos, los ratones fueron tratados (o no tratados) con composiciones liposómicas que contienen liposomas incrustados con clodronato como se describe en los presentes ejemplos. Los ratones se trataron (por vía tópica) al mismo tiempo con una dosis del clodronato que contiene la preparación liposómica, y la piel se recogió en 1 semana o 2 semanas después de la aplicación. Las secciones de piel se incrustaron en parafina y se cortaron a 5 micrómetros. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina (núcleos) y eosina (citoplasma). Las Figuras 8A-8D están orientadas con la epidermis en la parte inferior. En las secciones tratadas que se muestran en las Figs. 8B y 8D, la tinta del tatuaje se ha eliminado en su mayoría de la capa dérmica más profunda (parte media a superior de cada foto) en 1 semana y se ha eliminado prácticamente por completo en 2 semanas después de la aplicación. Esto indica que la tinta que reside en la capa dérmica interna (la tinta "permanente") se está eliminando en un procedimiento gradual que depende de las composiciones de eliminación de tatuajes con liposomas de bisfosfonato de la presente invención. Como se muestra en las Figs. 8A y 8C, la tinta de tatuaje permanente queda atrapada intra y extracelularmente en las capas dérmicas interna y superior.

En experimentos adicionales, se seccionaron los ganglios linfáticos de ratones no tratados y tratados con composiciones liposómicas marcadas fluorescentemente que contenían clodronato como se describe en el presente ejemplo. Como se muestra en las Figuras 9A y 9D, se tomaron imágenes de secciones de ganglios linfáticos tomadas después de 1 día y 14 días, respectivamente, mediante microscopía óptica. En las Figuras 9B y 9E, se tiñeron fluorescentemente secciones de tejido ganglionar para visualizar partículas y/o restos celulares que contienen clodronato marcados fluorescentemente. En cada uno de los procedimientos de tinción de tejidos, la fila superior ilustra las fotomicrografías de una sección de ganglio linfático de un animal tratado 24 horas antes y la segunda fila refleja el tejido ganglionar obtenido después de 14 días de tratamiento. En las Figuras 9C y 9F se muestra una superposición que muestra las partículas de tinta del tatuaje en relación con las composiciones liposómicas marcadas fluorescentemente que contienen clodronato. La Figura 9G se muestra como una ampliación de una imagen que representa un ganglio linfático a las 2 semanas en el cuadro blanco. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas/restos celulares que contienen clodronato marcados fluorescentemente puede verse en múltiples áreas, indicadas por flechas blancas, que parece aumentar con el tiempo después de la dosificación con liposomas que contienen clodronato. Los ganglios linfáticos fueron negativos para los marcadores de apoptosis, lo que sugiere que el marcado verde se debe a los restos celulares y a la eliminación mediada por el liposoma de clodronato no activo y, por lo tanto, sugiere, que la eliminación de liposomas que contienen clodronato acelera la eliminación de la tinta del tatuaje de la dermis a los ganglios linfáticos de drenaje, como lo indica la colocación de la tinta no de tatuaje y los restos celulares. Las imágenes fueron tomadas a 40x.

La Figura 10 muestra una fotomicrografía de un ganglio linfático de un ratón representativo tratado con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente y recogido 14 días después de la dosis inicial. El marcador de monocitos/macrófagos CD11b se distingue de otras tinciones fluorescentes y se observa que se coloca con los liposomas/restos celulares que contienen clodronato marcados fluorescentemente. La tinta del tatuaje se puede ver como negro opaco. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas/restos celulares que contienen clodronato marcados fluorescentemente puede verse en múltiples áreas, indicado por flechas blancas. Los ganglios linfáticos

fueron negativos para los marcadores de apoptosis, lo que sugiere que la presencia de un marcador de fluorescencia verde son restos celulares y no son liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente. La imagen fue tomada a 100x.

5 Se muestran fotomicrografías representativas en las Figuras 11A-11E, que representan imágenes de secciones de ganglios linfáticos de ratones tratados con liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente en $t=0$ y recogidos en el día 1 (Fig. 11A), en el día 2 (Fig. 11B), en el día 5 (Fig. 11C), en el día 7 (Fig. 11D), en el día 14 (Fig. 11E). La tinta del tatuaje se puede ver como negro opaco. La colocación de la tinta del tatuaje y los liposomas que contienen clodronato marcados fluorescentemente en los ganglios linfáticos parece alcanzar un pico a los 5-14 días. Las imágenes fueron tomadas a 40x.

10 Los ratones fueron tratados semanalmente con una preparación liposómica que contiene clodronato, o control liposómico. Posteriormente se recogieron secciones de piel después de 12 semanas de una dosis semanal única. Las secciones de piel se incrustaron en parafina y se cortaron a 5 micrómetros. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina (núcleos) y eosina (citoplasma). Como se muestra en la Figura 12B, la sección de la piel ilustra la eliminación de la tinta del tatuaje de la capa dérmica más profunda dejando tinta de tatuaje extracelular que es
15 invulnerable a la eliminación de la tinta a base de liposomas de clodronato. A diferencia de ello, en la sección representativa de control de liposomas, como se muestra en la Figura 12B, la tinta del tatuaje permanece tanto en la capa dérmica más profunda como en la dermis superior.

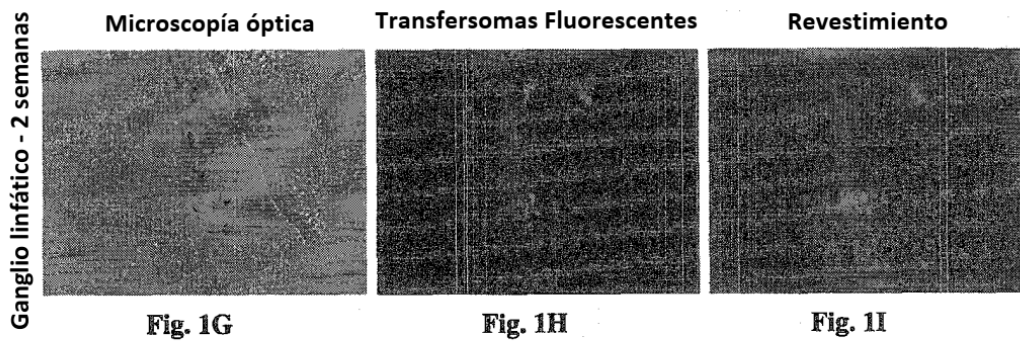
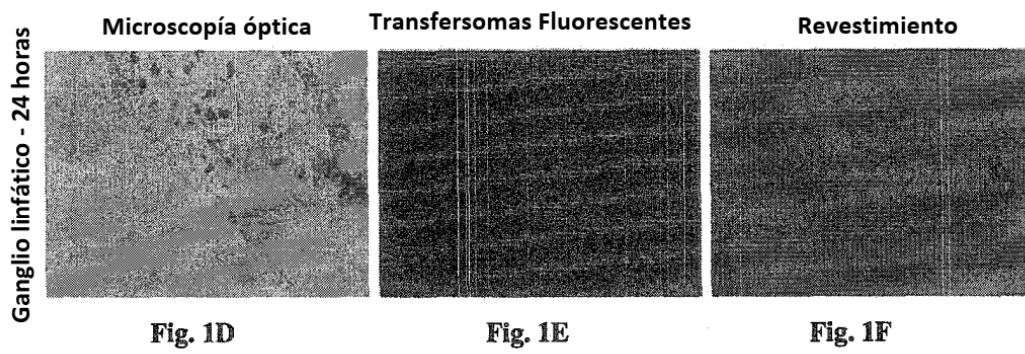
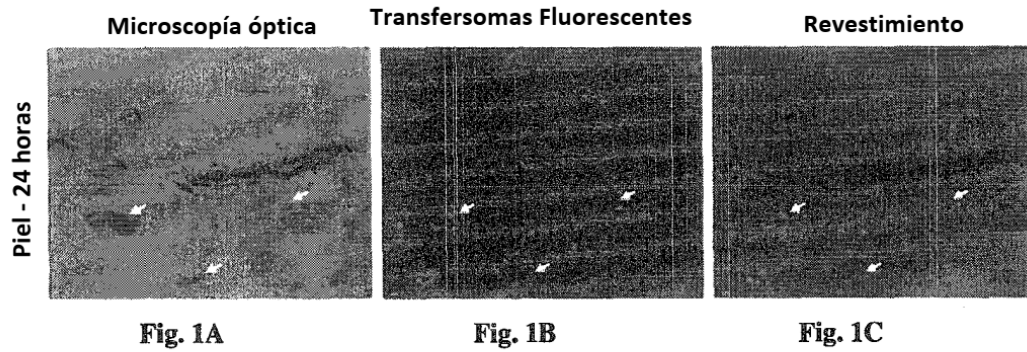
Resultados y conclusión:

20 Los resultados obtenidos como se muestra en las Figuras 3-12 ilustran que se descubrió que la formulación liposómica penetra la piel después de aplicarse por vía tópica, en el sitio del tatuaje en la dermis más profunda, donde pudo colocarse con áreas de tinta para tatuajes.

Además, se descubrió que los liposomas que contienen clodronato, marcados con colorante fluorescente soluble en lípidos, se habían eliminado de la piel para el día 7. Sin desear quedar ligado a teoría específica alguna, se cree que la administración de la formulación liposómica que contiene clodronato a una piel cubierta de tatuaje, condujo a la
25 selección de células que habían tomado la tinta del tatuaje para la apoptosis en la dermis más profunda, que era consistente con el patrón de infiltración de macrófagos, como se indica por las células CD11b+ que se muestran en la Figura 7. En la piel, la administración de la formulación liposómica que contiene clodronato se asoció con una reducción visual en la cantidad de tinta de tatuaje presente en la dermis más profunda en relación con la piel de control no tratada como se muestra en las Figuras 12A y 12B. Esta diferencia fue aún más pronunciada a las 2 semanas después del
30 tratamiento. De manera simultánea, aunque la apoptosis estaba ausente de los ganglios linfáticos, hubo un marcado aumento en la fluorescencia entre el día uno y el día catorce después del tratamiento, consistente con la eliminación de las células objetivo en la piel por la formulación de liposomas fluorescentes. Además, en los ganglios linfáticos, las células CD11b+ colocalizadas con tinta de tatuaje y la fluorescencia verde, que junto con la ausencia de apoptosis, apoya un mecanismo de acción probable para la formulación liposómica que contiene bisfosfonato de la presente
35 invención. Finalmente, a las 12 semanas de tratamiento semanal, la tinta del tatuaje estaba prácticamente ausente de la dermis más profunda de los animales tratados en relación con los animales no tratados. La tinta restante del tatuaje en la piel se localizaba en gran medida en la dermis superior y se descubrió que era extracelular.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para eliminar un tatuaje en una región de la piel que comprende:
administrar a al menos una parte del tatuaje, una composición que comprende una cantidad eficaz de un bisfosfonato y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable para causar, al menos, la decoloración del tatuaje en dicha región.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el compuesto es seleccionada del grupo que consiste en: alendronato, cimadronato, incadronato, clodronato, etidronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, minodronato, pamidronato, piridronato, tiludronato, olpadronato, neridronato, YH529, EB 1053 ISA-13-1 y sales, ésteres y mezclas de los mismos farmacéuticamente aceptables.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el bisfosfonato es clodronato o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el bisfosfonato es una partícula de bisfosfonato seleccionada del grupo que consiste en liposomas, bicapas lipídicas, nanopartículas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y microesferas.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la composición comprende una partícula de bisfosfonato que comprende liposomas atrapados con un bisfosfonato.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la composición comprende de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml del bisfosfonato y comprende al menos un lípido formador de liposomas seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina, diestearioilfosfatidilcolina, esfingomielina, diacilglicerol, fosfatidil etanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, diestearilfosfatidilcolina y diestearilfosfatidiletanolamina, colesterol y combinaciones de los mismos, y un emulsionante.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-6, en el que la composición es administrada al menos a una parte del tatuaje al menos una vez a la semana, al menos dos veces a la semana, al menos una vez al mes, al menos 5-10 veces al mes o al menos 1-10 veces en 6 meses, y se administra como una solución inyectable, una formulación tópica o un parche transdérmico, en el que la formulación tópica comprende una crema, una emulsión, una espuma, una pomada, una dispersión, una pasta, un pulverizador, una solución, un aceite o una microemulsión.
8. Una composición para eliminar o decolorar un tatuaje ubicado en una región de la piel de un sujeto, que comprende liposomas compuestos de un bisfosfonato, un lípido formador de liposomas, un emulsionante y un diluyente de alcohol inferior, en el que la relación de lípido formador de liposomas a emulsionante varía de 80:20 a 90:10.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende:
 - (a) liposomas compuestos de un bisfosfonato seleccionado de alendronato, cimadronato, incadronato, clodronato, etidronato, risedronato, zoledronato, ibandronato, minodronato, pamidronato, piridronato, tiludronato, olpadronato, neridronato, YH529, EB 1053 ISA-13-1 y sales, ésteres y mezclas de los mismos farmacéuticamente aceptables;
 - (b) un lípido formador de liposomas seleccionado del grupo que consiste en fosfatidilcolina, diestearioilfosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidil etanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, diestearilfosfatidilcolina y diestearilfosfatidil etanolamina y combinaciones de los mismos;
 - (c) un emulsionante seleccionado del grupo que consiste en polioxil 35, polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado, polioxil 60, d- α -tocoferol, polietilenglicol, succinato 1000 (TPGS), polisorbato 20, polisorbato 80, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano; monoestearato de sorbitano; y monooleato de sorbitano; y
 - (d) un diluyente de alcohol inferior seleccionado de metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, o combinaciones de los mismos,
 en la que la relación de lípido formador de liposomas a emulsionante varía de 80:20 a 90:10.
10. La composición de la reivindicación 8 o 9, en la que el bisfosfonato es clodronato o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, el lípido formador de liposomas es fosfatidilcolina y el emulsionante es monooleato de sorbitano y en la que la relación de lípido formador de liposomas a emulsionante varía de 80:20 a 90:10.
11. La composición de las reivindicaciones 8 a 10, en la que la composición es administrable por vía tópica.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que la administración tópica es en forma de una crema, una pomada, una formulación en aerosol, un pulverizador sin aerosol, un gel, una espuma, una solución, una suspensión, una dispersión, una emulsión, una microemulsión, una pasta, un polvo, una barra sólida, una toallita, un aceite o una loción.



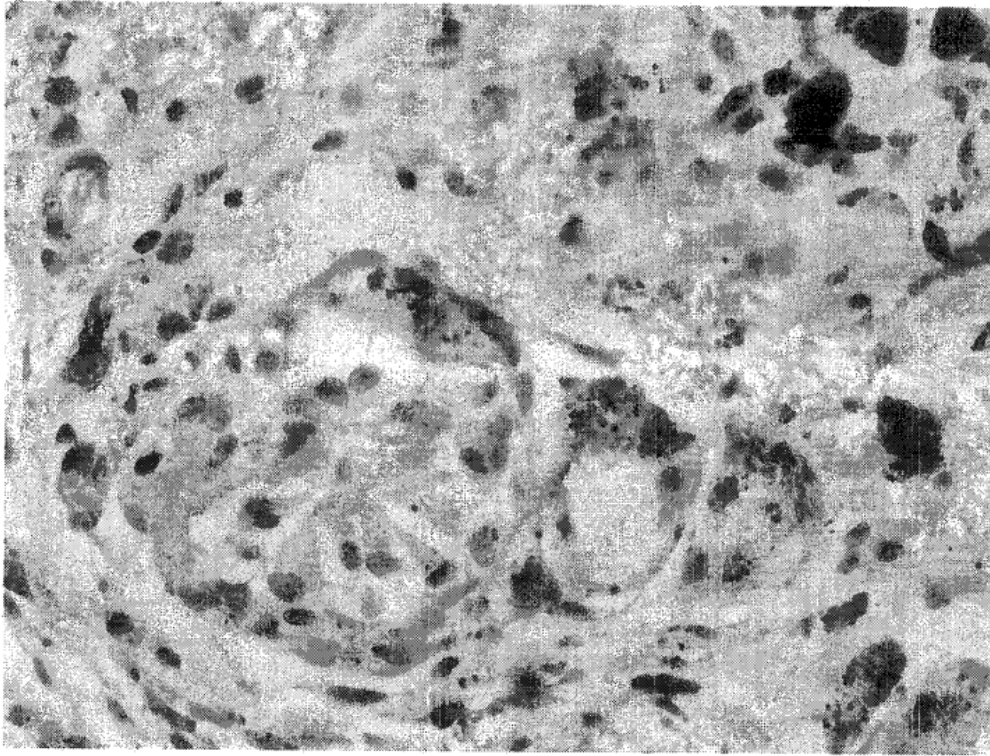


Fig. 2

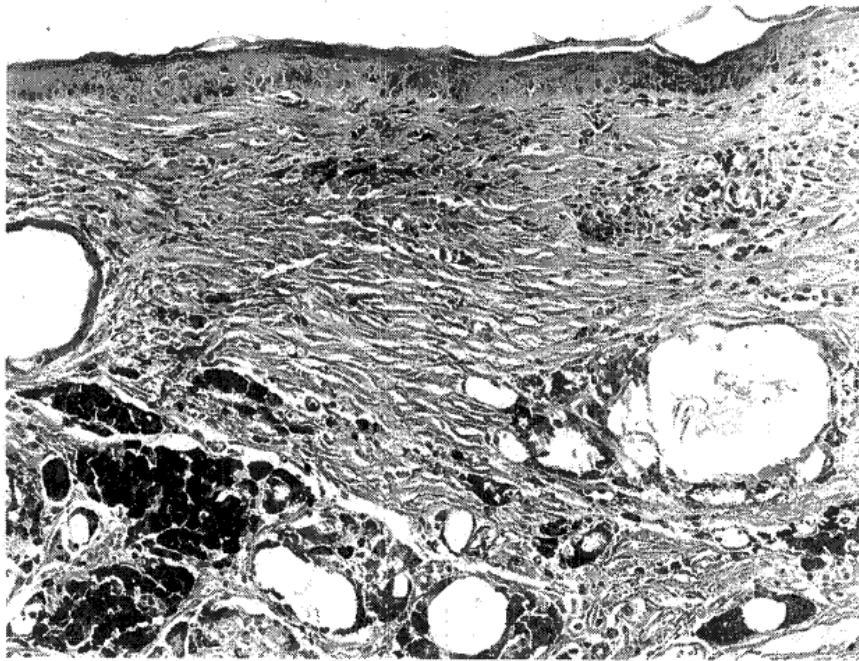


Fig. 3

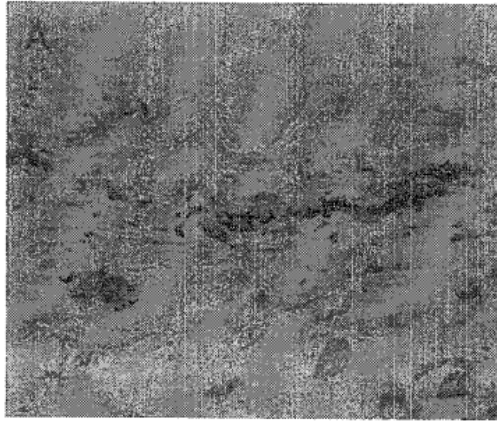


Fig. 4A

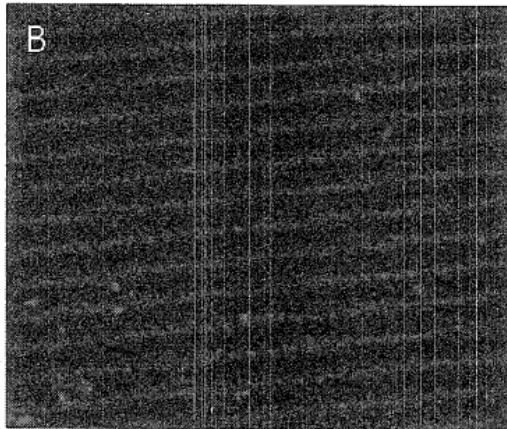


Fig. 4B

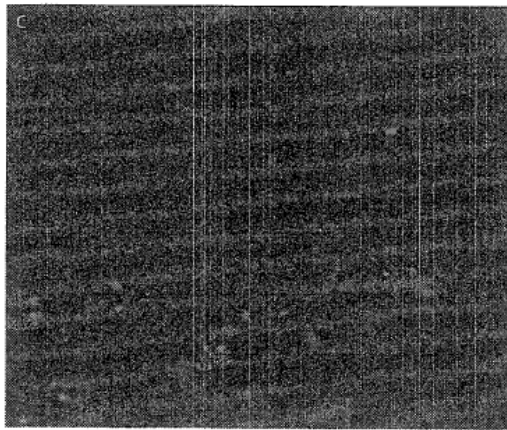


Fig. 4C

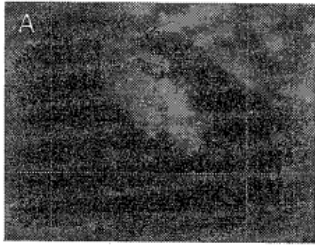


Fig. 5A

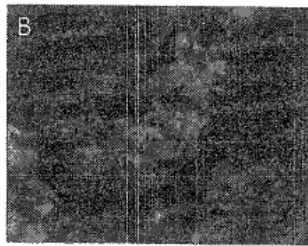


Fig. 5B

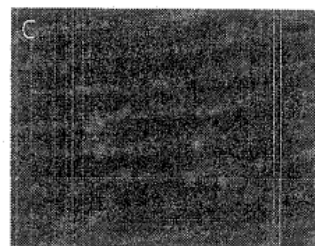


Fig. 5C

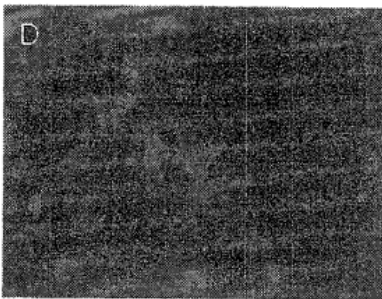


Fig. 5D

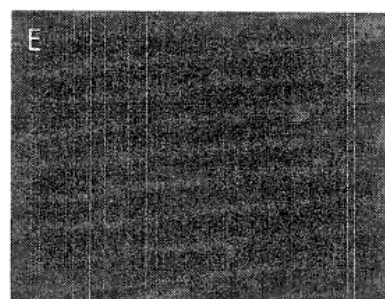


Fig. 5E

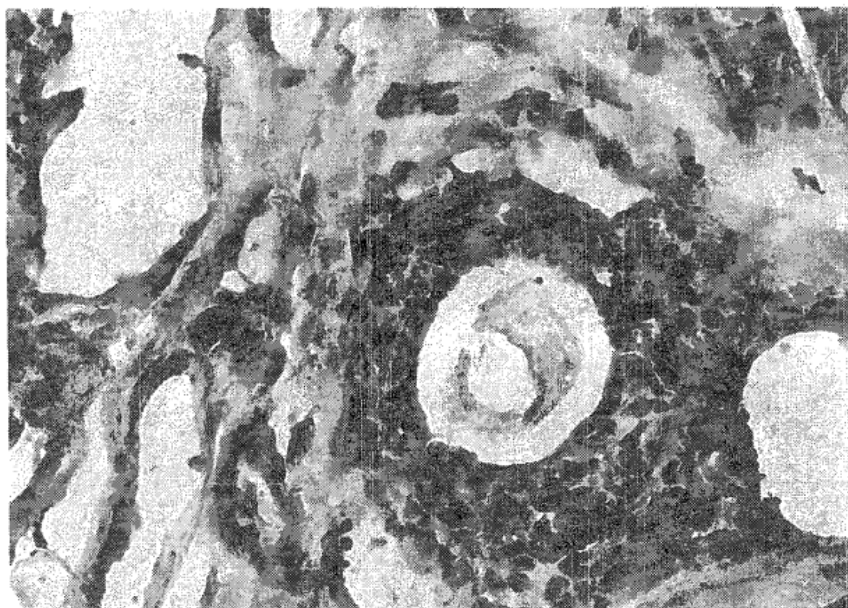


Fig. 6A

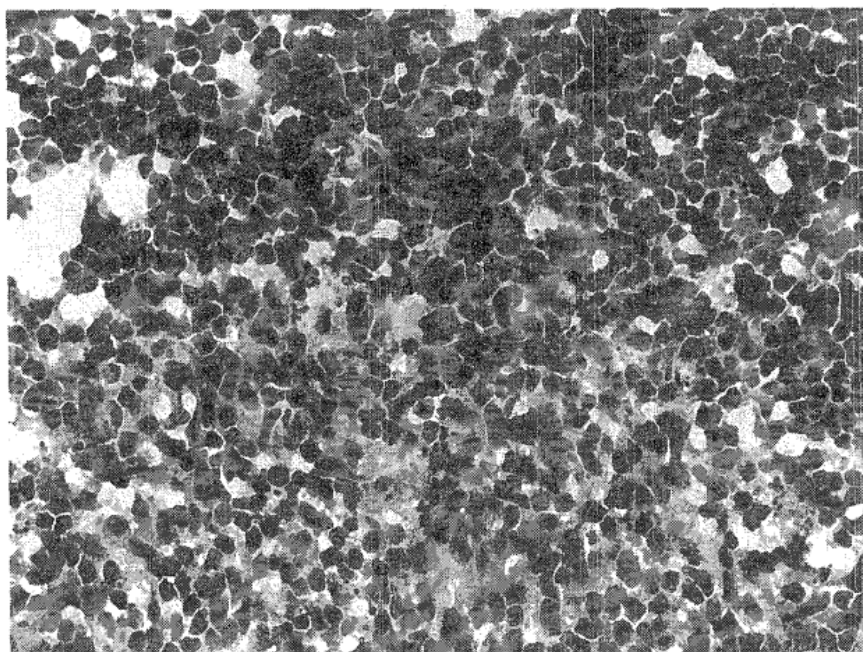


Fig. 6B

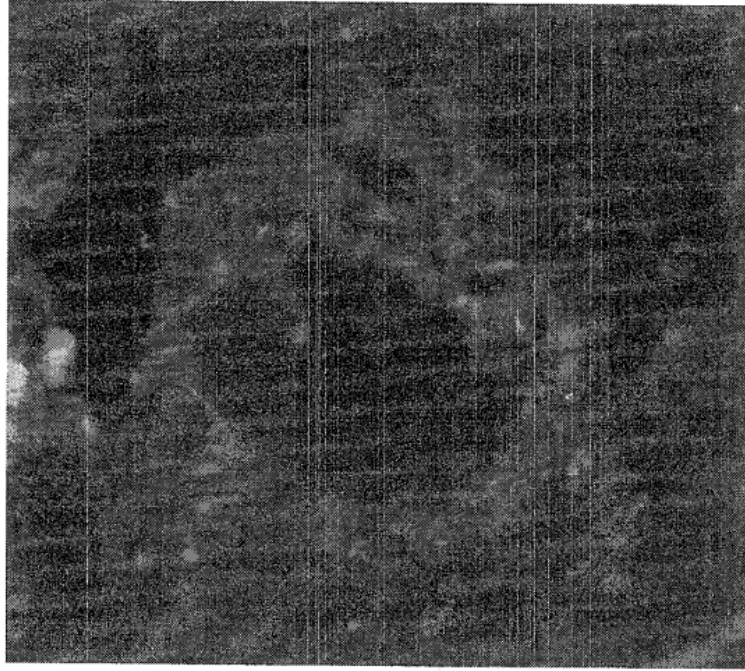


Fig. 7

Piel sin tratar - 1 semana

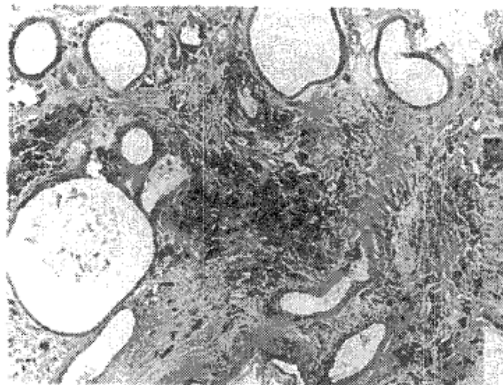


Fig. 8A

Piel tratada - 1 semana

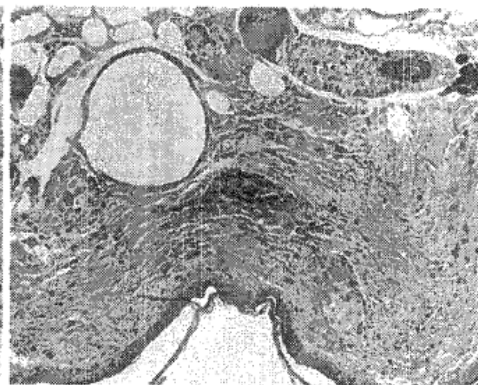


Fig. 8B

Piel sin tratar - 2 semanas

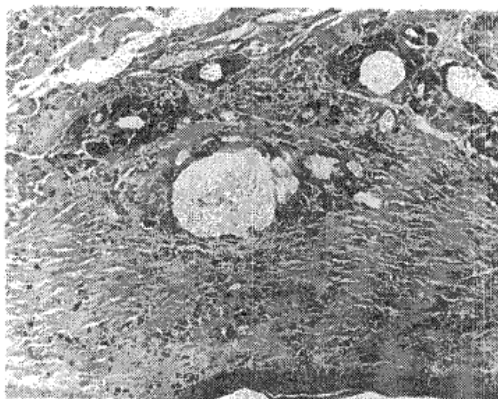


Fig. 8C

Piel tratada - 2 semanas

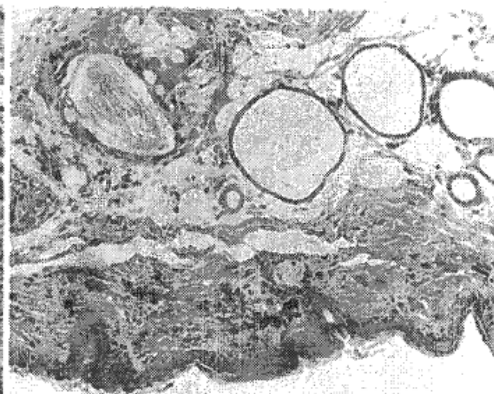
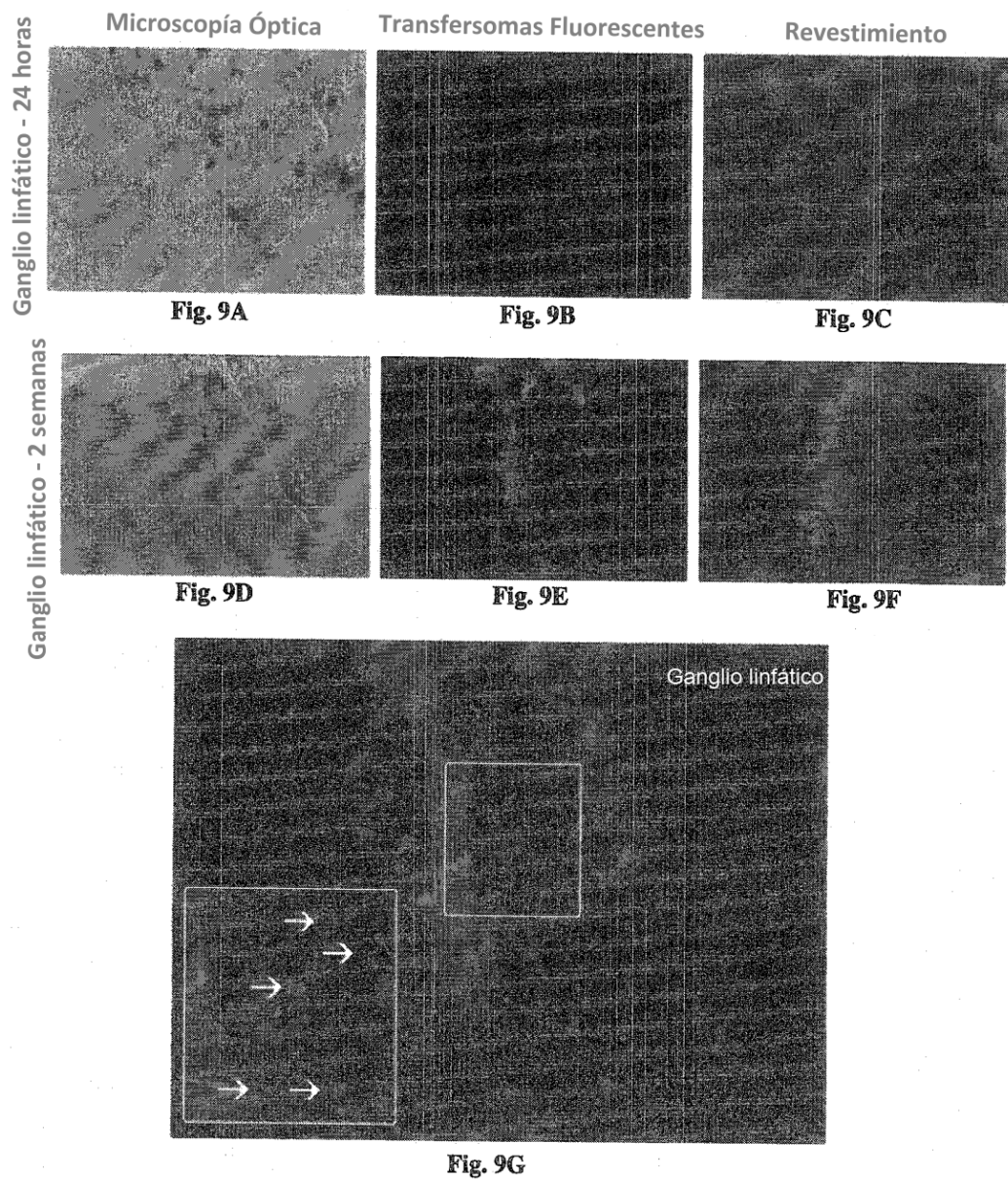


Fig. 8D



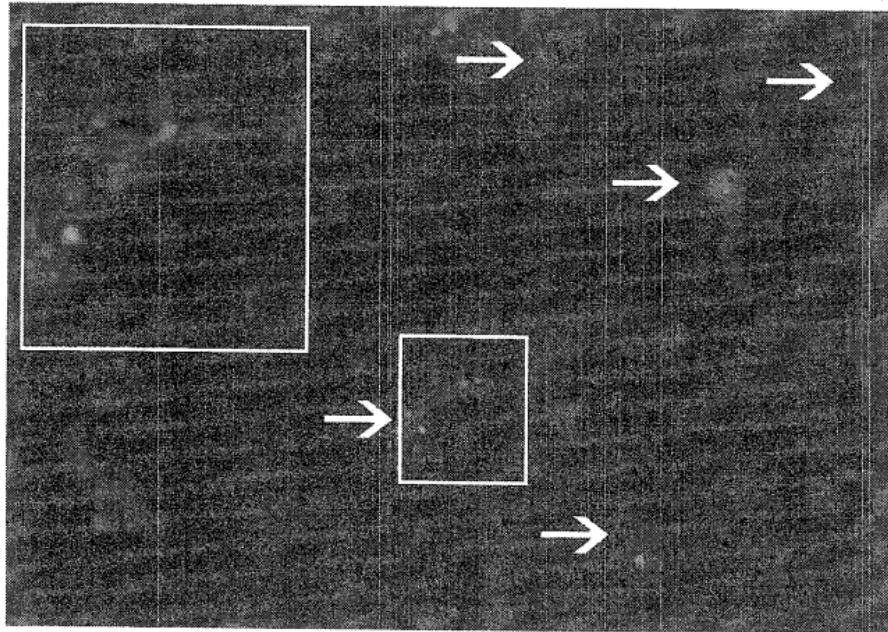


Fig. 10

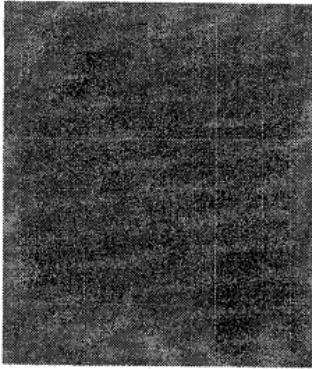


Fig.11A

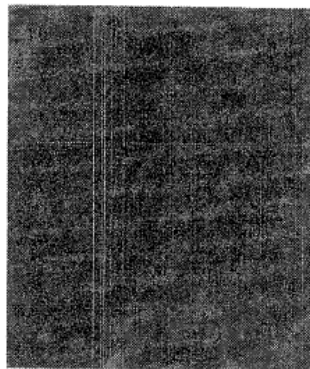


Fig. 11B

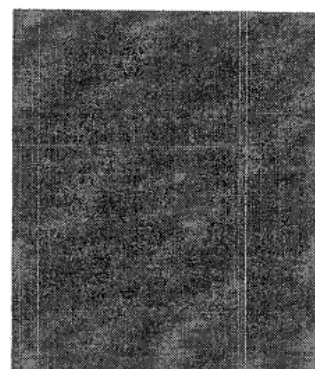


Fig. 11C

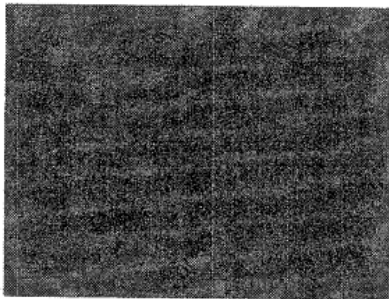


Fig. 11D

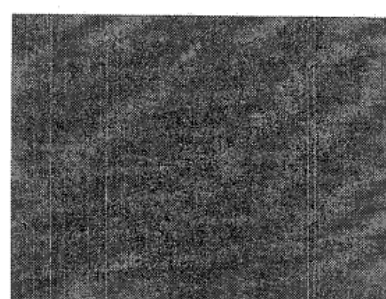


Fig. 11E

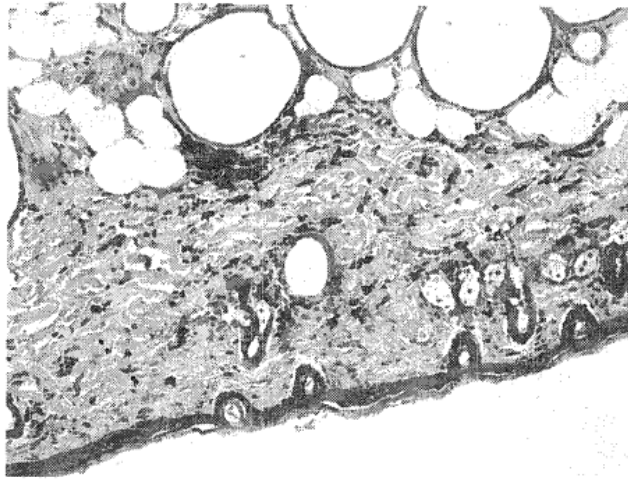


Fig. 12A



Fig. 12B