

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 879**

51 Int. Cl.:

A61K 31/12	(2006.01) A61K 9/08	(2006.01)
A61K 8/35	(2006.01) A61K 31/05	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)	
A61K 36/9066	(2006.01)	
A61K 8/9794	(2007.01)	
A61K 8/34	(2006.01)	
A61Q 19/06	(2006.01)	
A61P 3/04	(2006.01)	
A61K 9/70	(2006.01)	
A61K 9/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/CN2015/088340**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16029870**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15836003 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2022 EP 3187178**

54 Título: **Composición y productos farmacéuticos para reducir la grasa localizada y el peso corporal y su uso**

30 Prioridad:

28.08.2014 US 201462042864 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2022

73 Titular/es:

**CALIWAY BIOPHARMACEUTICALS CO. LTD.
(100.0%)
32F.-9, No. 99, Sec. 1, Xintai 5th Rd., Xizhi Dist.
New Taipei City 221, TW**

72 Inventor/es:

LING, YU-FANG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 924 879 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

Composición y productos farmacéuticos para reducir la grasa localizada y el peso corporal y su uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición, y más particularmente a una composición utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso. La presente invención se refiere a una aplicación de la composición, y más particularmente a la aplicación utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende la composición, y más particularmente a la composición farmacéutica utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso. La presente invención se refiere además a una aplicación, y más particularmente a la aplicación de la composición farmacéutica utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso.

15 Antecedentes de la invención

Con el cambio de más y más personas en el concepto de belleza, y los estándares cada vez mayores en su salud personal, forma corporal y peso, la pérdida de peso y el contorno corporal ya no son problemas que solo atañen a las personas obesas. Por lo tanto, el mercado de pérdida de peso, centros de acondicionamiento físico y control de peso está en auge, impulsando desarrollos relativos como alimentos dietéticos, productos de acondicionamiento físico, control clínico de pérdida de peso, equipos médicos, equipos de acondicionamiento físico, etc. Según el informe estadístico "Global Weight Loss and Gain Market 2009-2014" emitido por Markets and Markets, el mercado global de control de peso se estimó en US \$586,3 mil millones en 2014 y podría crecer a \$650,9 mil millones en 2015; donde el mercado principal es Estados Unidos, su escala de mercado se estimó en \$310 mil millones, y la escala de mercado estimada de Europa, el segundo mercado más grande, es de \$238 mil millones. Al mismo tiempo, debido al aumento de la preocupación de los consumidores por la concientización sobre la salud, especialmente sobre las secuelas de las enfermedades crónicas causadas por la obesidad, se ha convertido en una agenda cada vez más importante a nivel mundial; por lo tanto, además de dirigirse a la población obesa, cada vez más personas están desarrollando activamente el control del peso corporal y el contorno corporal para la población sana, lo que ha llamado la atención de todas las industrias hacia el control del peso corporal y el contorno corporal y ha llevado al auge del desarrollo en la industria, las razones antes mencionadas son las principales razones por las que el mercado podría crecer de manera constante. Las estadísticas de la Sociedad Estadounidense de Cirujanos Plásticos (ASPS, por sus siglas en inglés) emitidas en 2012 mostraron que la demanda de contorno corporal ha ocupado el primer lugar en el campo de la cirugía plástica y las demandas estimadas mantendrían una tasa de crecimiento anual de alrededor del 12,3 % hasta 2017. "Global Pipeline Analysis, Competitive Landscape and Market Forecasts" publicado por Research and Markets mostró que el mercado global de equipos de contorno corporal alcanzó los \$900 millones en 2010 y se estima que aumentará a \$2 mil millones en 2017. Debido a que la demanda del mercado del contorno corporal es enorme y sigue creciendo cada año, aparecen en el mercado varias formas de liposucción y métodos lipolíticos. Por el contrario, también han ido apareciendo, uno tras otro, muchos tratamientos médicos de alto riesgo o inseguros.

La cirugía de liposucción convencional se desarrolló ya en la década de 1970; debido a la forma de liposucción mediante liposucción seca bajo presión negativa sin ninguna solución de infusión, los nervios subcutáneos y los vasos sanguíneos se dañaron en gran medida; además, la cantidad de sangre perdida fue grande y el riesgo de cirugía fue alto. Más tarde se desarrollaron la liposucción tumescente y la liposucción superhúmeda. La liposucción tumescente se realiza mediante la adición de anestésico y vasoconstrictor a la solución de infusión, aunque, en este método, la anestesia local reemplaza a la anestesia intravenosa, la gran cantidad de solución de infusión ha provocado que el anestésico requiera al menos 12 horas para ser metabolizado, y por lo tanto aumenta los posibles riesgos de anestésico local para el cuerpo humano. Recientemente, el método que los médicos prefieren usar en una gran cantidad de liposucción es la liposucción súper húmeda, su característica es que el intercambio de volumen de la solución de infusión debe ser igual a la grasa extraída y la posibilidad de sobrecarga de la infusión puede reducirse de manera efectiva. Sin embargo, clínicamente, existen limitaciones en cuanto a los sitios de administración, los sitios son principalmente las áreas con gran acumulación de grasa, como el abdomen y los muslos, etc.; mientras tanto, la eficacia y seguridad de la liposucción dependen completamente de la habilidad y la pericia del cirujano. El proceso de liposucción causa mucho daño al cuerpo, requiere mucho tiempo y aún causa efectos secundarios como hematomas postoperatorios severos, hinchazón, dolor y parálisis sensorial, tejido cicatricial, superficie de la piel sin tersura; el período de recuperación puede oscilar entre cuatro y seis semanas. Debido al largo tiempo de operación de la liposucción, la mayor pérdida de sangre ha aumentado directamente su riesgo quirúrgico. Por lo tanto, cada industria está diseñando varios instrumentos auxiliares de liposucción y, por lo tanto, se desarrollaron uno tras otro, métodos auxiliares de liposucción como ultrasonido y láser, el factor clave sigue siendo la habilidad del cirujano que los realiza. Además, los casos de quemadura de tejido o poca eficacia ocurren con frecuencia al usar instrumentos de liposucción auxiliares relativos. En vista del inconveniente que enfrentaba la liposucción, todas las industrias continuamente realizaban mejoras tanto en la técnica como en el instrumento; la industria médica estética de los Estados Unidos y Europa se está enfocando en el desarrollo de equipos médicos estéticos desde la década de 1980. En el campo del control del peso corporal y el contorno corporal, los fabricantes han transformado su principal atractivo de la liposucción tradicional a un instrumento de lipólisis mínimamente invasivo e incluso no invasivo. Los objetivos de los productos o instrumentos lipolíticos son mejorar las fallas tradicionales de gran pérdida de sangre, período de recuperación prolongado, cicatrices postoperatorias y tratar de ser lo menos invasivos, de alta seguridad,

convenientes, heridas más pequeñas y período de recuperación más corto posible; al mismo tiempo, mantener las ventajas de una mejor eficacia y un precio competitivo para ingresar al mercado médico estético con las ventajas suficientes.

5 Existe un método lipolítico mediante el uso de mesoterapia, que utiliza fosfatidilcolina o desoxicolato de sodio como ingredientes activos para inyectar en la región obesa para lisar la grasa. La estructura de este tipo de ingredientes es similar al ingrediente de la membrana celular; por lo tanto, podría romper la membrana celular de las células del adipocito y desencadenar la necrosis celular. Inyectar este tipo de medicamento en el mesodermo provocaría una necrosis masiva de células de adipocitos y luego provocaría la liberación de grasa; debido a que el medicamento no posee especificidad, es decir, no solo se dirige a los adipocitos, muchas células circundantes normales también se verían afectadas y, por lo tanto, causarían necrosis, además, la necrosis celular provocaría que el tejido circundante iniciara una serie de reacciones inflamatorias, causando aún más inflamación en el sitio de administración, dolor intenso e hinchazón, e incluso provocando riesgos de necrosis o infección tisular local. Aunque el método lipolítico por inyección, en comparación con el uso de un instrumento de liposucción grande, podría superar la limitación en el sitio de administración, un ciclo de tratamiento de inyección de lipólisis puede requerir varias docenas de inyecciones cada 2 semanas y de 1 a 6 ciclos de tratamiento para alcanzar el objetivo del efecto de la lipólisis. Aunque se ha agregado anestésico a la solución de inyección, es posible que el lugar de la inyección aún sufra una inflamación y un dolor intensos después de que la anestesia haya disminuido; además, también es necesario mejorar la cantidad de tratamientos y la frecuencia de las inyecciones. Considere los riesgos de dolor postoperatorio severo, parálisis nerviosa, necrosis tisular local o infecciones, la dosis limitada en inyección única y restringida para aplicarse en la cara, la mayoría de los cirujanos ya no inyectan los ingredientes mencionados anteriormente para reducir la grasa localizada del paciente; aunque Estados Unidos ha aprobado el primer producto de inyección de lipólisis a base de desoxicolato de sodio, tiene cierto grado de efectos secundarios y solo podría usarse en la papada, lo que hace que su uso sea limitado. En general, en el mercado actual falta un producto que pueda reducir eficazmente la grasa localizada, que tenga menos efectos secundarios, que sea más seguro; por lo tanto, bajo la alta demanda de cirujanos y consumidores, es una tendencia en el mercado desarrollar una formulación de inyección de lipólisis localizada que sea más segura, con bajos efectos secundarios y que pueda superar los defectos y limitaciones mencionados.

El documento WO 2007/112996 A2 describe compuestos que incluyen resveratrol para reducir la masa grasa y la circunferencia de las caderas y los muslos.

Sumario de la invención

La invención proporciona el uso no terapéutico de una composición para la reducción de grasa localizada en un sitio local de un sujeto, donde la composición comprende una proporción en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma que varía de 1:30 a 10:1, donde el extracto de cúrcuma comprende 100% de curcumina, y donde la composición se administra en el sitio local del sujeto de manera que se reduce la grasa localizada en el sitio.

La invención también proporciona el uso de una composición para la reducción no terapéutica del peso corporal de un sujeto, donde la composición comprende una proporción en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma que varía de 1: 30 a 10:1, donde el extracto de cúrcuma comprende 100% de curcumina, y donde la composición se administra en un sitio local del sujeto de manera que se reduce el peso corporal del sujeto.

En las reivindicaciones adjuntas se enumeran otros aspectos y realizaciones de la invención.

La presente invención se refiere a una composición utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso, que comprende una relación en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma que varía de 1: 30 a 10: 1. En la invención, el extracto de cúrcuma comprende un 100 % de curcumina. Preferiblemente, la relación en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma es 1:19.

La composición utilizada en la presente invención puede inhibir el crecimiento de adipocitos e inducir la apoptosis planificada de adipocitos para alcanzar el efecto de reducir los depósitos de grasa localizados y disminuir los adipocitos; también puede reducir el peso corporal, pero no causa inflamación o necrosis de las células circundantes ni del tejido, ni causaría inflamación o dolor intenso en los tejidos circundantes, por lo que evita el daño, la inflamación y el dolor de los tejidos causados por la cirugía de liposucción mencionada anteriormente o instrumento de lipólisis poco invasivo. Además, no causaría necrosis ni daría lugar a problemas tales como inflamación del tejido circundante o infección en los tejidos circundantes provocada por la necrosis provocada por el ingrediente de la composición de inyección de lipólisis fosfatidilcolina o desoxicolato de sodio. La presente invención también puede reducir el peso.

En el presente documento, el término "extracto de cúrcuma", como se usa en el presente documento, se refiere al extracto que comprende curcumina, donde el extracto de cúrcuma comprende del 80 % al 100 % de curcumina. En la presente invención, el extracto de cúrcuma comprende un 100 % de curcumina.

También se proporciona aquí un método de preparación de una composición que comprende resveratrol y extracto de cúrcuma. El método comprende: mezclar una composición con al menos una de las sales farmacéuticamente aceptables, estabilizantes o agentes bacteriostáticos farmacéuticamente aceptables o emulsionantes farmacéuticamente aceptables,

- excipientes tales como tensioactivos, anestésicos, donde la composición comprende resveratrol y extracto de cúrcuma; y preparación de la mezcla en una formulación de inyección.
- 5 Preferiblemente, el estabilizador comprende, pero no se limita a, xilitol, sorbitol, povidex, isomaltosa o dextrosa.
- Preferiblemente, el "excipiente farmacéuticamente aceptable" comprende, pero no se limita a, lubricante, agente de suspensión, solubilizante, deslizante, emulsionante o tensioactivo. La cantidad de excipiente requerida dependerá de la cantidad de ingrediente activo, y un excipiente puede realizar una o más funciones.
- 10 Preferiblemente, el lubricante comprende, entre otros, agar, estearato de calcio, oleato de etilo, laurato de etilo, glicerina, palmitostearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, óxido de magnesio, estearato de magnesio, manitol, poloxámero, etilenglicol, benzoato de sodio, lauril sulfato de sodio, ácido estearóico de sodio, sorbitol, ácido esteárico, talco o estearato de zinc.
- 15 Preferiblemente, el agente de suspensión comprende, pero no se limita a, manitol, carboximetilcelulosa (CMC), CMC-Na.
- Preferiblemente, el solubilizante comprende, pero no se limita a, hidroxipropil-beta-ciclodextrina, tween 80 o aceite de ricino.
- 20 Preferiblemente, el deslizante comprende, pero no se limita a, materiales tales como estearato de magnesio, dióxido de silicio, trisilicato de magnesio, celulosa en polvo, almidón, talco, fosfato de calcio tribásico, silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, hidrogel de silicio, etc.
- Preferiblemente, el emulsionante puede ser un fosfolípido de origen natural, que comprende, entre otros, lecitina de soja, lecitina, monoglicéridos, diglicéridos, estearato de sodio, ésteres de sorbitán de ácidos grasos o monooleato de polioxietilensorbitán.
- 25 Preferiblemente, el tensioactivo comprende, entre otros, Tween, polietilen-polipropilenglicol, polioxietilen-monoestearato, polioxietilen alquil éteres (por ejemplo, polioxietilen lauril éter), Triton-X, copolímero de polioxietileno y polioxipropileno o dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés).
- 30 También se describe aquí una aplicación de la composición en la preparación de una composición farmacéutica que se usa para reducir la grasa localizada y reducir el peso.
- 35 La presente invención se relaciona además con una composición farmacéutica utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso; donde la composición farmacéutica comprende una dosificación eficaz de la composición que se utiliza para reducir la grasa localizada y reducir el peso y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 La composición farmacéutica utilizada en la presente invención puede existir en múltiples formas, incluidas, entre otras, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas. Por ejemplo, soluciones líquidas (por ejemplo, solución inyectable e infusible), dispersiones, suspensiones, polvos, polvos liofilizados o liposomas o ungüentos o parches transdérmicos. La forma preferida depende del modo esperado de administración y aplicación terapéutica. Preferiblemente, la composición farmacéutica utilizada en la presente invención está en forma de soluciones infusibles, y el modo de administración preferido es el modo no intestinal, como una solución inyectable. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica comprende una dosificación eficaz de resveratrol y una composición de extracto de cúrcuma para reducir la grasa localizada que se administra por vía subcutánea. Preferentemente, la composición farmacéutica que comprende una dosificación eficaz de resveratrol y una composición de extracto de cúrcuma para reducir la grasa localizada se administra a la grasa subcutánea mediante inyección subcutánea. En una realización de la presente invención, la formulación de la pomada es bien conocida en la técnica e incluye, entre otros, agente activo, cera, agua, vaselina, conservantes, alcoholes superiores, alcoholes polihídricos, emulsionantes, disolventes, espesantes, plastificantes, fragancias, tampones, antibióticos, estabilizantes o mezclas de los mismos.
- 45 La dosificación de la composición farmacéutica utilizada en la presente invención se puede ajustar de acuerdo con diferentes parámetros. Los parámetros incluyen, pero no se limitan al tipo de sujeto, el peso del sujeto y el espesor y área de la grasa localizada del sujeto. La composición farmacéutica utilizada en la presente invención puede administrarse una vez, múltiples o de forma continua dentro de las 24 horas, y también puede administrarse de forma múltiple o continua por semana o por mes. El método de administración es por inyección, implantación subcutánea, infusión implantable, pomada o parche. Preferiblemente, el método de inyección incluye, pero no se limita a, inyección subcutánea, implantación subcutánea, goteo intravenoso, método de bomba de infusión intravenosa, método de bomba de infusión implantable.
- 50 La presente invención se relaciona además con una aplicación de la composición farmacéutica utilizada para reducir la grasa localizada y reducir el peso, que comprende administrar una dosificación efectiva de la composición farmacéutica que comprende resveratrol y extracto de cúrcuma en un sitio local de un sujeto, para hacer el sitio local del sujeto logra el efecto de inhibir el crecimiento de adipocitos, promover la apoptosis de adipocitos, disminuir la deposición de grasa y reducir el peso.
- 55
- 60
- 65

Preferiblemente, los sujetos son humanos o animales.

5 Preferiblemente, la dosificación eficaz de la composición farmacéutica a administrar al sujeto cada vez es de 0,4 mg/kg a 100 mg/kg. Más preferentemente, la dosificación eficaz de la composición farmacéutica a administrar al sujeto cada vez es de 1 mg/kg a 60 mg/kg.

Preferiblemente, el término "reducir el peso corporal", como se usa en el presente documento, se refiere a la reducción del aumento de peso corporal del sujeto en un 5% a un 30%.

10 De acuerdo con la presente invención, el término "reductor de grasa localizada" como se usa en el presente documento se refiere a: después de administrar la dosificación eficaz de las composiciones que comprenden resveratrol y extracto de cúrcuma usadas en la presente invención, se podría inhibir el crecimiento de adipocitos, los adipocitos inician procedimientos o apoptosis planificada, y se podría reducir el depósito de grasa localizado. Como se muestra en la
15 realización de la presente invención, la cantidad de reducción de grasa localizada puede detectarse administrando un rango específico de dosificación de la composición que comprende resveratrol y extracto de cúrcuma, y midiendo la tasa de inhibición del crecimiento de adipocitos, el grado de apoptosis celular y el cambio de la grasa subcutánea y la grasa visceral de ratas en un período específico. Preferiblemente, la grasa localizada incluye, pero no se limita a, grasa subcutánea, grasa visceral, depósito de grasa localizado o adipocitos.

20 Preferiblemente, los sitios de grasa localizada incluyen, pero no se limitan a, cara, mandíbula, brazo, cintura, abdomen o muslos.

El efecto de la composición o de la composición farmacéutica utilizada en la presente invención es significativamente superior al del resveratrol o extractos de cúrcuma administrados solos. Además, nunca ha habido un precedente de
25 resveratrol o extractos de cúrcuma administrados solos o juntos para reducir la grasa localizada mediante inyección localizada. Además, la presente invención es principalmente para inhibir el crecimiento de adipocitos y promover la apoptosis de adipocitos para reducir la grasa localizada mediante la administración de medicamentos a través de una inyección localizada, sin afectar las células o tejidos circundantes, y no se encontraron efectos secundarios significativos en ensayos con animales. Por lo tanto, la composición o la composición farmacéutica utilizada en la presente invención es más segura y tiene menos efectos secundarios. El nivel técnico de la composición o composición farmacéutica utilizada
30 en la presente invención es completamente diferente a las técnicas o productos existentes. Por lo tanto, podría usarse para evitar los problemas de necrosis de células localizadas, dolor severo, inflamación y necrosis y/o infección de los tejidos circundantes causados por la cirugía de liposucción convencional, instrumentos de lipólisis como el instrumento de lipólisis por ultrasonido enfocado de alta intensidad o ingredientes de inyección lipolítica tales como fosfatidilcolina y desoxicolato de sodio. Además, también puede reducir significativamente los hematomas, la hinchazón, el dolor y la parálisis sensorial posoperatorios, así como acortar el período de recuperación del paciente.

Breve descripción de los dibujos

40 La Fig. 1 es el gráfico de barras que presenta el efecto de inhibir el crecimiento de preadipocitos en cada grupo analizado mediante el ensayo MTT.

La Fig. 2 es el gráfico de barras que presenta el efecto de inhibir el crecimiento de adipocitos en diferenciación en cada grupo analizado mediante el ensayo MTT;

45 La Fig. 3 es el gráfico de barras que presenta el efecto de la formulación UL003C y el desoxicolato de sodio sobre la inhibición del crecimiento de adipocitos maduros ensayada mediante ensayo MTT.

La Fig. 4 es el gráfico de barras que presenta el efecto de las formulaciones UL003A, UL003C y UL003R sobre la promoción de la apoptosis de los adipocitos obtenida marcando con Anexina V/PI y luego detectando con citómetro de flujo.

50 La Fig. 5 es el gráfico de barras que presenta el efecto de las formulaciones UL003A, UL003C y UL003R sobre la promoción de la apoptosis de los adipocitos obtenida realizando tinción con caspasa 3 y luego detectando con citómetro de flujo.

La Fig. 6 es el gráfico de barras que presenta el efecto del extracto de cúrcuma, el resveratrol y la formulación UL003C sobre la promoción de la apoptosis de los adipocitos obtenido realizando la tinción con caspasa 3 y luego detectando con un citómetro de flujo.

55 La Fig. 7 es el gráfico de barras que presenta el efecto de la formulación UL003C y desoxicolato de sodio sobre la promoción de la apoptosis de los adipocitos obtenido marcando con anexina V/PI y luego detectando con citómetro de flujo.

La Fig. 8 es el gráfico lineal que presenta el cambio de peso de las ratas en cada grupo después de alimentar a las ratas con una dieta rica en grasas para inducir el aumento de grasa localizado y administrar localmente la medicina mediante inyección según la presente invención.

60 La Fig. 9 es el gráfico de barras que presenta la grasa subcutánea de ratas en cada grupo después de alimentar a las ratas con una dieta rica en grasas para inducir el aumento de grasa localizada y administrar localmente medicina mediante inyección según la presente invención.

65 La Fig. 10A es el gráfico de barras que presenta los valores bioquímicos séricos (creatinina y transaminasa glutámico oxaloacética (GOT, por sus siglas en inglés)) de ratas en cada grupo después de que las ratas fueran alimentadas con

una dieta rica en grasas para inducir el aumento de grasa localizada y administradas localmente con medicamento mediante inyección según la presente invención.

La Fig. 10B es el gráfico de barras que presenta los valores bioquímicos séricos (urea y transaminasa glutámico pirúvica (GTP, por sus siglas en inglés)) de ratas en cada grupo después de alimentar a las ratas con una dieta rica en grasas para inducir el aumento de grasa localizado y administrar localmente con medicina mediante inyección según a la presente invención.

La Fig. 11 es el gráfico de barras que presenta la expresión de la proteína relacionada con la apoptosis, como Bax y Bcl-2, y la proporción de Bax/Bcl-2 en cada grupo detectada por Western Blot después de alimentar a las ratas con una dieta alta en grasas para inducir aumento de grasa localizado y administrado localmente con medicamento mediante inyección de acuerdo con la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Los medios técnicos, acompañados de los dibujos y las realizaciones preferidas de la presente invención, tomados para lograr el objetivo de la invención proyectada, podrían desarrollarse más a continuación.

Realización 1: Ensayo de inhibición del crecimiento de preadipocitos

En esta realización, se incubaron preadipocitos 3T3-L1 en placas de 96 pocillos con 1×10^4 células por pocillo. Con la excepción del grupo de control de la solución de DMSO (grupo de control), se agregaron 50 ppm de resveratrol, 50 ppm de extracto de cúrcuma, 80 ppm de extracto de té verde y 100 ppm de la composición UL003A, UL003C o UL003R en diferentes pocillos respectivamente. Hubo siete grupos y se realizaron tres réplicas en cada grupo. Después del proceso de administración y de 48 horas de incubación, se tomaron fotografías para registrar las condiciones de crecimiento de las células y se analizó el efecto inhibitor del crecimiento de los preadipocitos 3T3-L1 en cada grupo mediante el ensayo MTT. En la composición UL003A, la relación en peso de resveratrol a extracto de té verde es 9: 1; en la composición UL003C, la relación en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma es 1: 19; en la composición UL003R, la relación en peso de resveratrol a extracto de cúrcuma es de 9: 1. Los datos de todos los grupos se presentan en Media \pm SD. Las letras a, b, c, d y e representan los resultados de las estadísticas. Letras diferentes representan diferencia estadística entre los grupos ($p < 0,05$).

Los resultados se muestran como en la Fig. 1, en comparación con el grupo de control de disolvente DMSO, las composiciones UL003A, UL003C y UL003R podrían inhibir eficazmente el crecimiento de preadipocitos ($p < 0,05$); en comparación con los grupos de extractos de una sola planta, las composiciones UL003A, UL003C y UL003R tuvieron un mejor efecto inhibitor y las diferencias son significativas ($p < 0,05$).

Realización 2: Ensayo de inhibición del crecimiento de diferenciación de adipocitos

En esta realización, se incubaron células de preadipocitos 3T3-L1 en placas de 12 pocillos con 1×10^5 células por pocillo. El medio se reemplazó con medio que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de agente de diferenciación de insulina, 1 μM de dexametasona, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Se añadieron DMSO, 50 ppm de resveratrol, 50 ppm de extracto de cúrcuma, 80 ppm de extracto de té verde y 100 ppm de la composición UL003A, UL003C o UL003R a diferentes pocillos respectivamente, donde el grupo al que se añadió DMSO fue el grupo de control. Hubo siete grupos y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Después del proceso de administración y 48 horas de incubación, se tomaron fotografías para registrar las condiciones de crecimiento de las células y se analizó el efecto inhibitor de los respectivos materiales experimentales sobre los adipocitos en diferenciación mediante el ensayo MTT. Los datos de todos los grupos se presentan en Media \pm SD. Las letras a, b, c, d, e y f representan los resultados de las estadísticas. Letras diferentes representan diferencia estadística entre grupos ($p < 0,05$).

Los resultados se muestran como en la Fig. 2, en comparación con el grupo de control de solvente DMSO, todas las composiciones UL003A, UL003C y UL003R podrían inhibir significativamente el crecimiento de adipocitos en diferenciación ($p < 0,05$), donde la composición UL003C tuvo la mejor inhibición. efecto sobre el crecimiento de los adipocitos diferenciadores. En comparación con otros grupos de extractos de una sola planta, la composición UL003C tuvo un mejor efecto inhibitor en la diferenciación del crecimiento de los adipocitos. ($p < 0,05$).

Realización 3: Ensayo de inhibición del crecimiento de adipocitos maduros

En esta realización, el efecto inhibitor de la composición de la presente invención sobre los adipocitos localizados maduros se compara con el efecto inhibitor del desoxicolato de sodio convencional. En esta realización, las células 3T3-L1 se incubaron en placas de 12 pocillos con 3×10^4 células por pocillo. El medio se reemplazó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 1 μM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Después de la incubación durante otros dos días, el medio se renovó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina para incubar durante cuatro días más. Cuando se completó la diferenciación de células 3T3-L1, con la excepción del grupo de control con solvente PBS y el grupo de control con solvente DMSO, se agregaron 50 ppm o 100 ppm de la composición UL003C o desoxicolato de sodio a diferentes pocillos respectivamente. Hubo seis grupos y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Después del proceso de administración y 48 horas de incubación, se tomaron

fotografías para registrar las condiciones de crecimiento de las células y se analizó el efecto inhibitor de los respectivos materiales experimentales sobre los adipocitos maduros mediante el ensayo MTT.

Los resultados se muestran como en la Fig. 3, la composición de la presente invención podría inhibir eficazmente el crecimiento de adipocitos maduros; a las dos dosis diferentes de 50 ppm y 100 ppm, el efecto inhibitor de la composición UL0003C de la presente invención sobre los adipocitos maduros fue significativamente mayor que el del desoxicolato de sodio ($p < 0,001$).

Realización 4: Ensayo de apoptosis de adipocitos (I)

En esta realización, se incubaron células 3T3-L1 en placas de 12 pocillos con 1×10^5 células por pocillo. El medio se reemplazó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de agente de diferenciación de insulina, 1 μM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Después de cultivar las células durante cuatro días en el fluido de incubación que contenía el agente de diferenciación y esperar hasta que se completara la diferenciación de los adipocitos, con la excepción del grupo de control con solvente DMSO, se agregaron 50 ppm de las composiciones UL003A, UL003C y UL003R a diferentes pocillos respectivamente. Hubo cuatro grupos y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Después del proceso de administración y 24 horas de incubación, las células se recogieron y luego se tiñeron con anexina V/PI, y la apoptosis celular se analizó mediante citómetro de flujo; donde Anexina V-PI- representa el número de adipocitos maduros supervivientes, y Anexina V+PI+ representa el número de adipocitos maduros apoptóticos; este método se utiliza para distinguir y determinar el grado de apoptosis inducido por las materias experimentales en cada grupo.

Los resultados se muestran como en la Fig. 4, después de tratar los adipocitos maduros con las materias experimentales mencionadas anteriormente durante 24 horas, todas las composiciones UL003A, UL003C y UL003R podrían inducir significativamente la apoptosis de los adipocitos maduros ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de control de disolvente DMSO, donde la composición UL003C tiene el mejor efecto apoptótico sobre los adipocitos maduros, que es significativamente mejor que la composición UL003A y UL003R ($p < 0,05$).

Realización 5: Ensayo de apoptosis de adipocitos (II)

En esta realización, las células 3T3-L1 se incubaron en placas de 12 pocillos con 1×10^5 células por pocillo. El medio se reemplazó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de agente de diferenciación de insulina, 1 μM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Después de cuatro días de incubación en el fluido de incubación que contenía el agente de diferenciación y esperando hasta que los adipocitos hayan madurado, con la excepción del grupo de control con solvente DMSO, se agregaron 50 ppm y 100 ppm de las composiciones UL003A, UL003C y UL003R respectivamente a diferentes pocillos. Hubo siete grupos y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Después del proceso de administración y 3 horas de incubación, se recogieron las células y se realizó la tinción con caspasa 3. La apoptosis celular se analizó por citometría de flujo, en donde si la caspasa 3 de las células ha sido marcada, representa la apoptosis iniciada por las células; este método se utiliza para comparar el grado de apoptosis inducido por las materias experimentales en cada grupo bajo diferentes dosis.

Los resultados se muestran como en la Fig. 5, en comparación con el grupo de control con disolvente de DMSO, independientemente de que los adipocitos maduros se trataran con 50 ppm o 100 ppm de la composición UL003C de la presente invención, las células marcadas con caspasa 3 en estos grupos se significativamente más que en el grupo de control de solvente DMSO ($p < 0,001$). Indica que la composición UL003C podría inducir significativamente la apoptosis de los adipocitos maduros y tiene el mejor efecto.

Realización 6: Ensayo de apoptosis de adipocitos (III)

En esta realización, se incubaron células 3T3-L1 en placas de 12 pocillos con 1×10^5 células por pocillo. El medio se reemplazó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de agente de diferenciación de insulina, 1 μM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Después de cuatro días de incubación en el líquido de incubación que contiene el agente de diferenciación y esperando a que los adipocitos hayan madurado, a excepción del grupo control con solvente DMSO, 50 ppm de extracto de cúrcuma, 50 ppm de resveratrol y 50 ppm y 100 ppm de la composición UL003C en la presente invención se añadió a cada grupo respectivamente para realizar el experimento; hubo cinco grupos y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Según artículos publicados anteriormente, las células tratadas con resveratrol durante 16 horas tenían más probabilidades de ser marcadas por caspasa 3, las células de los grupos restantes se trataron con medicamentos y se incubaron durante 3 horas. Las células se recogieron y se tiñeron con caspasa 3, y la apoptosis celular se analizó mediante citometría de flujo. Las células con caspasa marcada 3 representan el número de células apoptóticas; este método se utiliza para comparar el grado de apoptosis inducido por las materias experimentales en cada grupo bajo diferentes dosis.

Los resultados se muestran como en la Fig. 6, después de que los adipocitos se trataron con 50 ppm de la composición UL003C de la presente invención, las células con caspasa 3 marcada en este grupo fueron significativamente más que en el grupo de control con solvente DMSO, ($p < 0,001$) y también significativamente más que el grupo de extracto de cúrcuma ($p < 0,05$) y el grupo de resveratrol ($p < 0,001$) con la misma dosis. Indica que el efecto de la composición UL003C

en la presente invención sobre la promoción de la apoptosis de adipocitos maduros es significativamente superior al efecto de cualquier ingrediente de extracto de planta individual en la composición.

Realización 7: Ensayo de apoptosis de adipocitos (IV)

5 En esta realización, el efecto de la composición UL003C en la presente invención sobre la promoción de la apoptosis de adipocitos maduros se comparó con el del conocido desoxicolato de sodio. En esta realización, las células 3T3-L1 se incubaron en placas de 12 pocillos con 1×10^5 células por pocillo. El medio se reemplazó con un fluido de incubación que contenía 5 $\mu\text{g/ml}$ de agente de diferenciación de insulina, 1 μM de dexametasona y 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina en el cuarto día de incubación. Después de cuatro días de incubación en el fluido de incubación que contiene el agente de diferenciación y esperando hasta que las células de adipocitos maduren, con la excepción del grupo de control con solvente DMSO, se agregaron 100 ppm de la composición UL003C y desoxicolato de sodio a diferentes pocillos respectivamente; hay tres grupos en el experimento, y se realizaron tres repeticiones en cada grupo. Después del proceso de administración y de 24 horas de incubación, se recogieron las células y se realizó la tinción de Anexina V/PI. La apoptosis celular se analizó mediante citometría de flujo, donde las células con anexina V-PI- representaban el número de adipocitos maduros supervivientes, y las células con anexina V+PI+ representaban el número de adipocitos maduros apoptóticos; este método se utiliza para comparar el grado de apoptosis inducido por las materias experimentales en los dos grupos.

20 Los resultados se muestran como en la Fig. 7, en comparación con el grupo de control de disolvente DMSO y desoxicolato de sodio con la misma concentración, la composición UL003C podría inducir significativamente la apoptosis de los adipocitos maduros ($p < 0,001$). Por el contrario, no hubo diferencia significativa entre el grupo de control con disolvente DMSO y el grupo de desoxicolato de sodio ($p > 0,05$). Indica que la composición UL003C en la presente invención podría inducir significativamente la apoptosis de adipocitos maduros, y el desoxicolato de sodio, ingrediente localmente lipolítico conocido, no lo hace.

Realización 8: Ensayo animal utilizando ratas (I)

30 En este experimento, se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (SD) de ocho semanas de edad. Hay tres grupos, que son el grupo de control, el grupo UL003C-20 (20 mg/kg de peso corporal, también conocido como grupo de dosis baja) y el grupo UL003C-40 (40 mg/kg de peso corporal, también conocido como grupo de dosis alta) respectivamente. En cada grupo se utilizaron cuatro ratas macho de siete semanas de edad para realizar el experimento, el peso inicial de las ratas fue de $207 \text{ g} \pm 6 \text{ g}$. La medicación podría administrarse después de que las ratas de todos los grupos fueran alimentadas con dietas ricas en grasas consecutivamente durante 2 semanas para hacer que la grasa subcutánea de las ratas se espese y hacer que las ratas pesen $330 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$. Se inyectan por vía subcutánea diferentes dosis de la composición UL003C en la grasa subcutánea, los sitios a inyectar son las almohadillas adiposas inguinales bilaterales, dos puntos de inyección a cada lado (5 mg/kg/punto), y las dosis totales de cada rata fueron 20 mg/kg/hora del sujeto y 40 mg/kg/hora del sujeto respectivamente; se administró el mismo volumen, 4 ml/kg/hora, de agua para inyección a las ratas del grupo de control. Las inyecciones se realizaron cada dos días durante tres veces. Fijando el día en que se iniciaron las administraciones como el primer día y administrando repetidamente el medicamento de acuerdo con el método mencionado anteriormente en el tercer y quinto día. El cambio en el peso corporal y la ingesta de dieta diaria promedio se registraron todos los días durante el período del experimento. Después de pesar el peso de la rata por última vez el día veintinueve (21), las ratas se mantuvieron en ayunas durante 24 horas. Se tomó sangre para medir el índice de función hepática y renal; el índice incluye transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxaloacética (GOT), creatinina y urea. Después de sacrificar las ratas, se obtuvo grasa abdominal subcutánea, grasa en la región inguinal superior (ingle superior) y grasa en la región inguinal inferior (ingle inferior) para ponderar la cantidad de grasa subcutánea. Los datos de todos los grupos se presentan en Media \pm SD; las letras se refieren a los resultados estadísticos, y letras diferentes representan que hay diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0,05$), letras iguales representan que no hay diferencia estadística entre grupos ($p > 0,05$).

50 Los resultados se muestran como en la Fig. 8, las ganancias de peso totales de las ratas tratadas con dosis bajas o dosis altas de la composición UL003C de la presente invención fueron menores que las ganancias de peso totales de las ratas en el control. donde la cantidad de ganancia de peso de las ratas en el grupo UL003C-40 fue significativamente menor que la ganancia de peso de las ratas en el grupo de control ($p < 0,05$), reducida en un 15,8% del peso. Comparar con el grupo de control, aunque la cantidad de aumento de peso de las ratas en el grupo UL003C-20 tiene una tendencia descendente, disminuyó en un 11,1 %, pero no alcanzó una diferencia estadística significativa ($p > 0,05$). Indica que el peso corporal también puede reducirse inyectando la composición de la presente invención al sujeto, y el efecto está relacionado con la dosis.

60 Como se muestra en la Fig. 9, es el resultado que presenta la reducción de grasa subcutánea en el sitio de administración de las ratas en cada grupo después del sacrificio; en comparación con el grupo de control, la composición UL003C de la presente invención podría reducir significativamente la grasa subcutánea alrededor del sitio de inyección ($p < 0,05$); donde en el grupo de dosificación baja, la cantidad de reducción de grasa subcutánea podría alcanzar el 24,3 % en el lugar de la inyección ($p < 0,05$); en el grupo de dosis alta, la cantidad de reducción de grasa subcutánea alcanzó el 21,6 % en el lugar de la inyección ($p < 0,05$).

Como se muestra en las Figs. 10A y 10B, los valores bioquímicos del suero tales como creatinina, urea, GOT y GPT no tienen diferencia estadística ($p > 0,05$). Indica que el caso de inyectar ya sea baja dosis o alta dosis de la composición UL003C de la presente invención no afectaría el índice de seguridad; es decir, indica que la composición de la presente invención tiene buena seguridad.

5

Realización 9: Ensayo en animales utilizando ratas (II)

Bcl-2 y Bax son dos reguladores importantes en la vía apoptótica, el equilibrio entre los dos reguladores es un mecanismo importante para regular la apoptosis. Una expresión más alta de Bcl-2 suprime la apoptosis, mientras que una expresión más alta de Bax promueve la apoptosis. La relación alta o baja entre estas dos proteínas podría determinar que las células tenderían a sobrevivir o iniciarían una reacción de apoptosis.

10

En este experimento, la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis Bcl-2 y la proteína promotora de la apoptosis Bax2 en tejido adiposo del sitio de inyección subcutánea de ratas en cada grupo se determinó mediante análisis de transferencia Western, y la proporción de Bax y Bcl-2 se utilizó para evaluar el efecto de la composición UL003C de la presente invención sobre la apoptosis de los adipocitos. En este experimento se utilizó tejido adiposo subcutáneo en la región inguinal inferior alrededor de los sitios de inyección de las ratas sacrificadas en el ejemplo 8 para realizar el extracto proteico con 450 μ l de T-PER®, se tomaron 30 μ g de proteína de cada grupo para realizar la poliacrilamida. electroforesis en gel (SDS-PAGE) y luego transfiera la proteína a la membrana de PVDF. El anticuerpo Bcl-2, número de modelo sc-7382, utilizado en la transferencia Western se adquirió de Santa Cruz y el anticuerpo Bax, número de modelo sc-526, se adquirió de Santa Cruz. Los datos de todos los grupos se presentan en Media \pm SD; las letras se refieren a los resultados estadísticos, y letras diferentes representan que hay diferencia estadística entre grupos ($p < 0,05$), letras iguales representan que no hay diferencia estadística entre grupos ($p > 0,05$).

15

20

25

Los resultados se muestran como en la Fig. 11, en comparación con el grupo de control, ya sea una dosis baja o una dosis alta de la composición UL003C de la presente invención podría mejorar significativamente la expresión de Bax ($p < 0,05$) e inhibir significativamente la expresión de Bcl-2 ($p < 0,05$), y su relación Bax/Bcl-2 fue significativamente mayor que la del grupo control ($p < 0,05$). Los resultados indican que inyectar la composición UL003C de la presente invención a las ratas podría inducir efectivamente los adipocitos en el tejido adiposo iniciando la apoptosis y reduciendo su cantidad de grasa localizada. Los resultados de los ensayos con animales reconfirmaron el mecanismo por el que la composición de la presente invención podría lograr el resultado de reducir los adipocitos y la grasa localizada a través de la vía de promoción de la apoptosis de los adipocitos.

30

Las descripciones anteriores son simplemente las realizaciones preferidas, y no son una limitación a la presente invención de ninguna forma; aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se describen anteriormente, no se utilizan para limitar la presente invención de ninguna manera. Cualquier personal técnico, siempre que esté dentro del rango, sin desviación, del plan de habilidades técnicas de la presente invención, podría usar la información técnica divulgada anteriormente para realizar una realización de igual efecto con varios ajustes o modificaciones, pero cualquier información que no se ha desviado de los planes técnicos de la presente invención, que son cualquier modificación simple de las técnicas de la presente invención hecha sustancialmente a las realizaciones anteriores, todavía pertenece al rango de los planes técnicos de la presente invención.

35

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso no terapéutico de una composición para la reducción de grasa localizada en un sitio local de un sujeto, donde la composición comprende una proporción en peso de resveratrol a curcumina que varía de 1:30 a 10:1, donde la composición se administra en el sitio local del sujeto de manera que se reduce la grasa localizada en el sitio.
- 10 2. Uso de una composición para la reducción no terapéutica del peso corporal de un sujeto, donde la composición comprende una proporción en peso de resveratrol a curcumina que varía de 1: 30 a 10:1, donde la composición se administra en un sitio local del sujeto de manera que se reduce el peso corporal del sujeto.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la relación en peso es 1:19.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3, donde la composición comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el sujeto es un sujeto humano o animal.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el sitio es un sitio de grasa localizada.
- 25 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el sitio de grasa localizada se selecciona entre la cara, la mandíbula, el brazo, la cintura, el abdomen o el muslo.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición se administra mediante inyección, implantación subcutánea, infusión implantable, pomada o parche.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la inyección es una inyección subcutánea.
- 10 El uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde la inyección subcutánea se inyecta en la capa de grasa subcutánea.

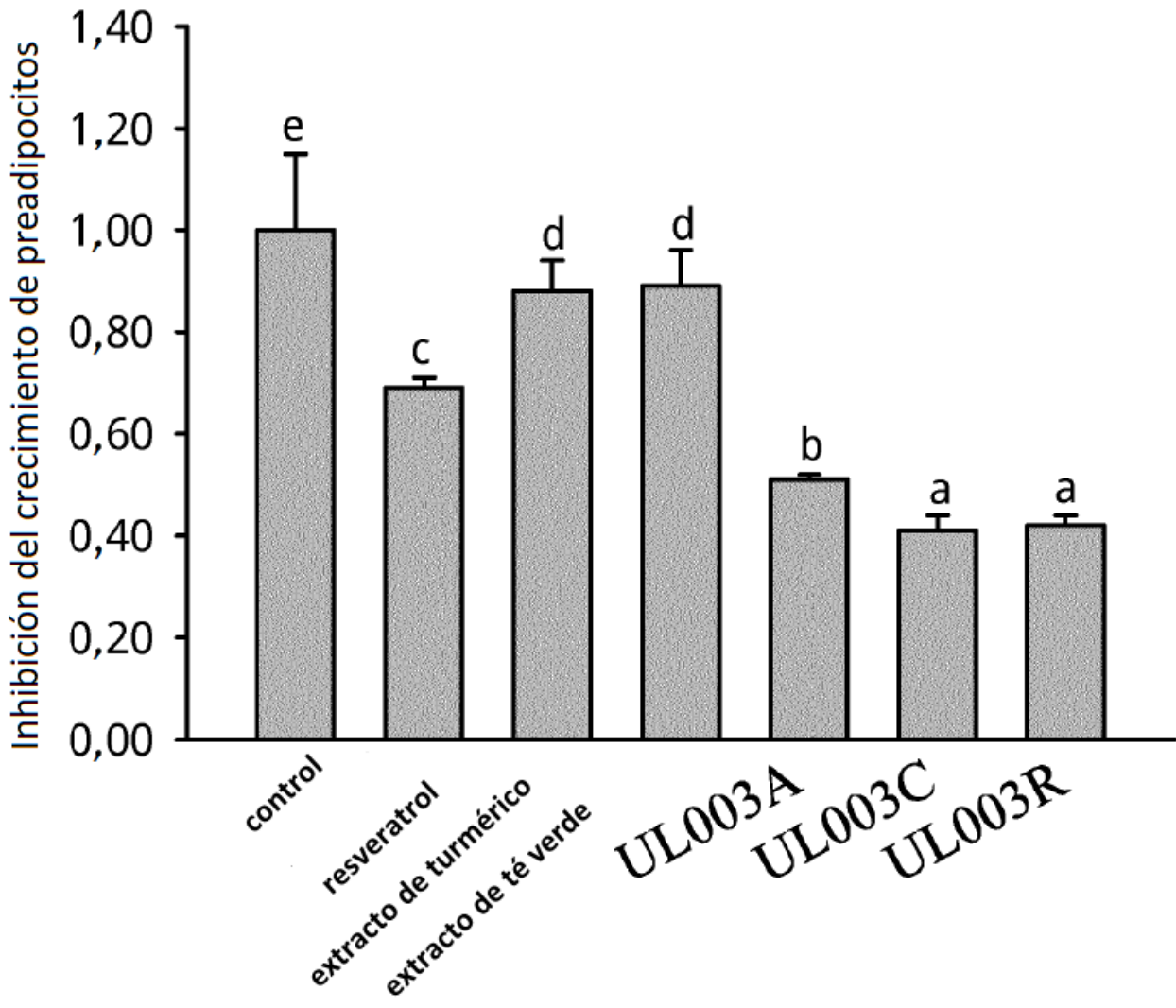


FIG. 1

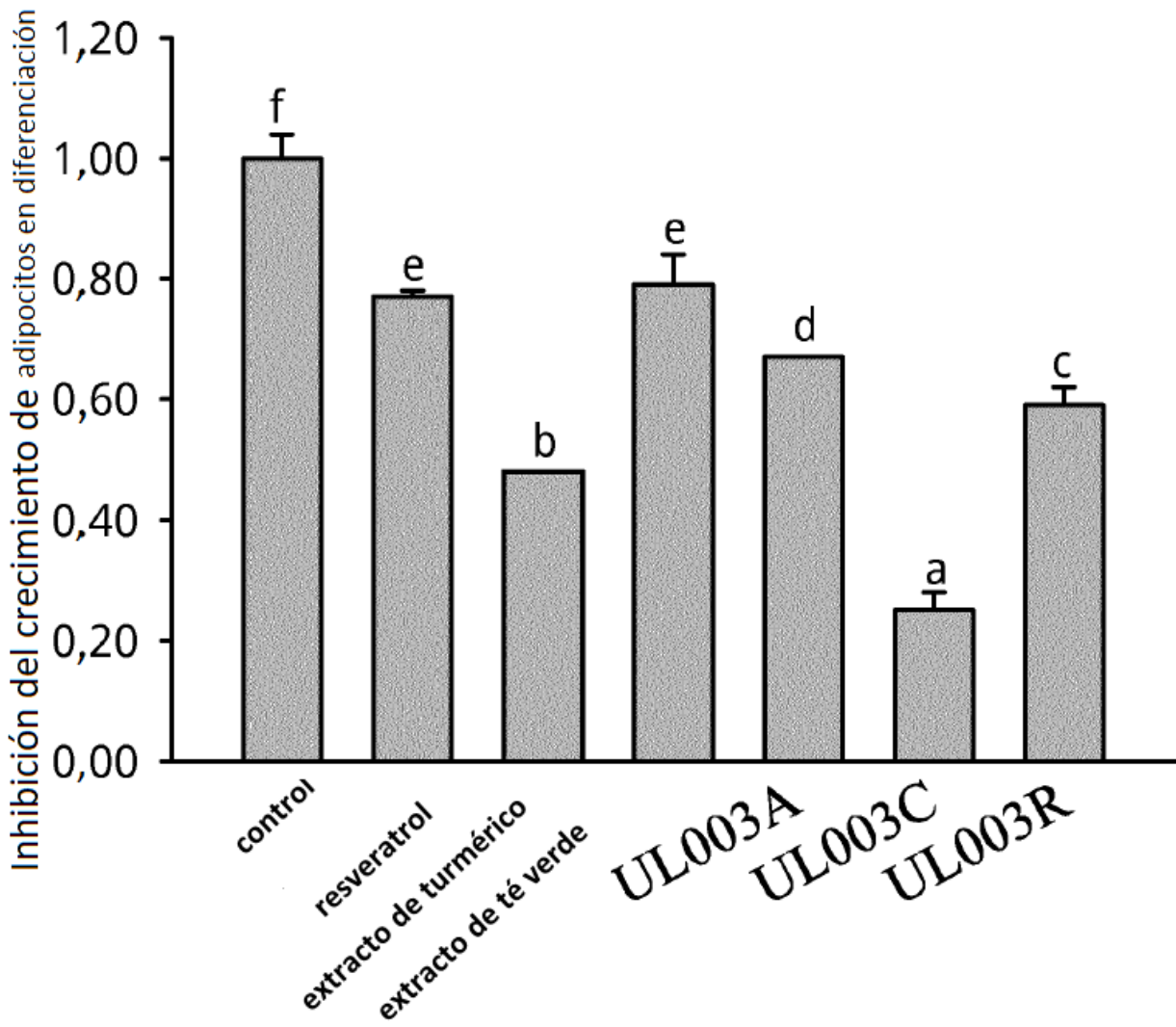


FIG. 2

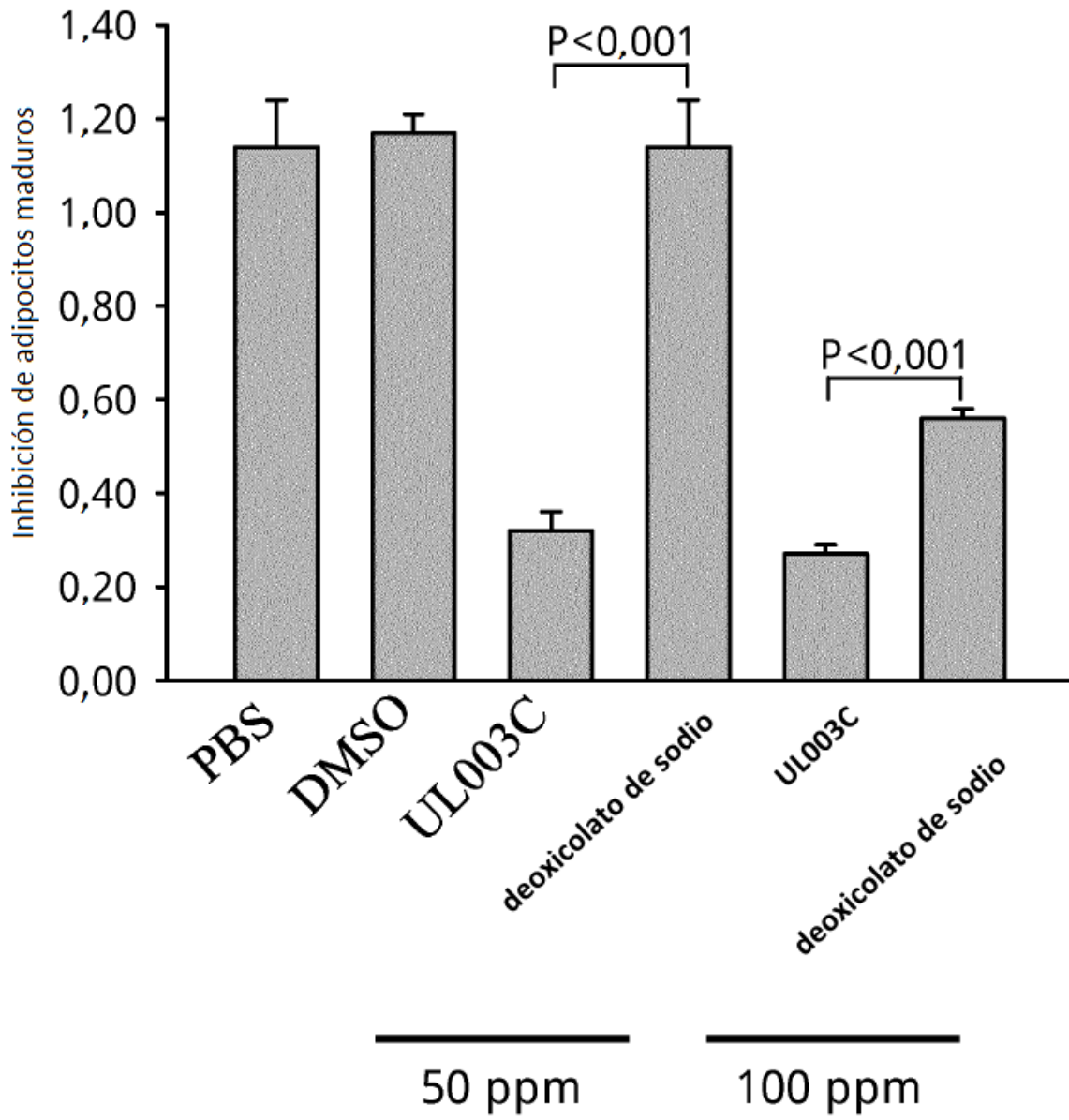


FIG. 3

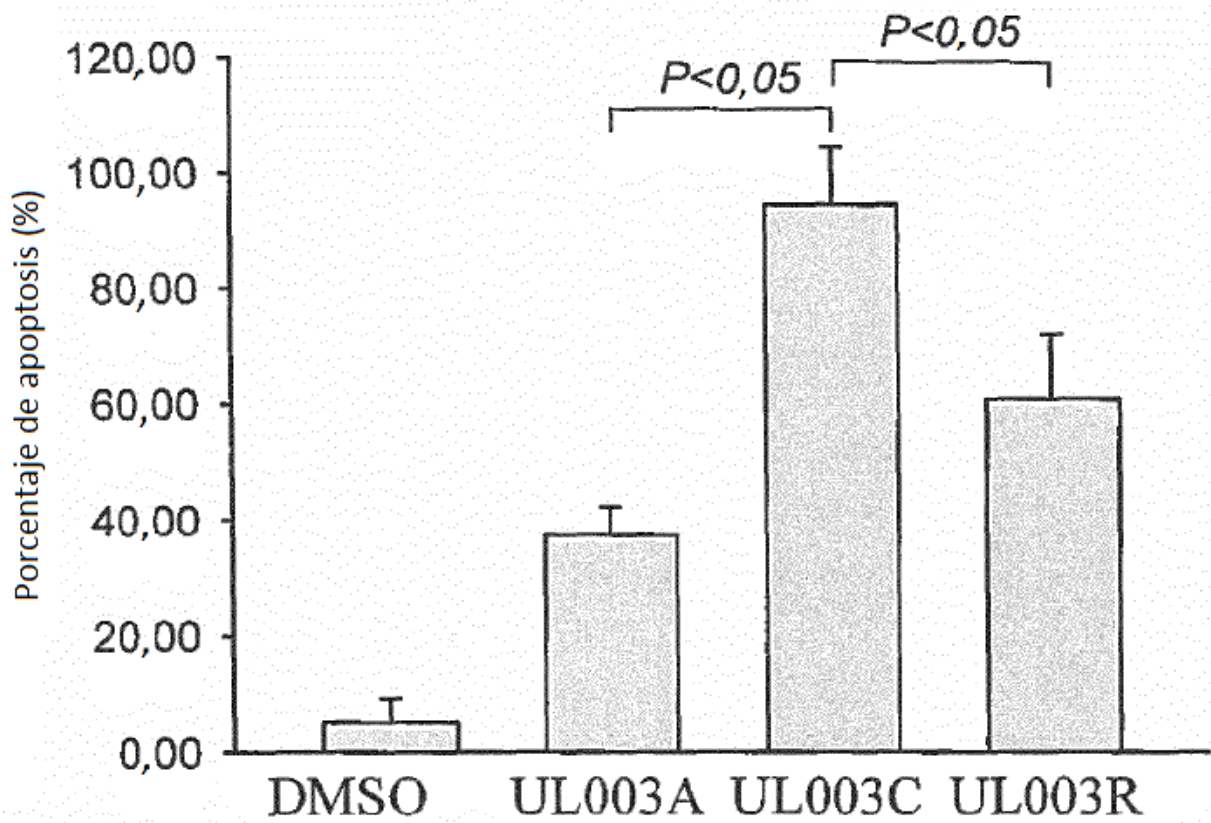


FIG. 4

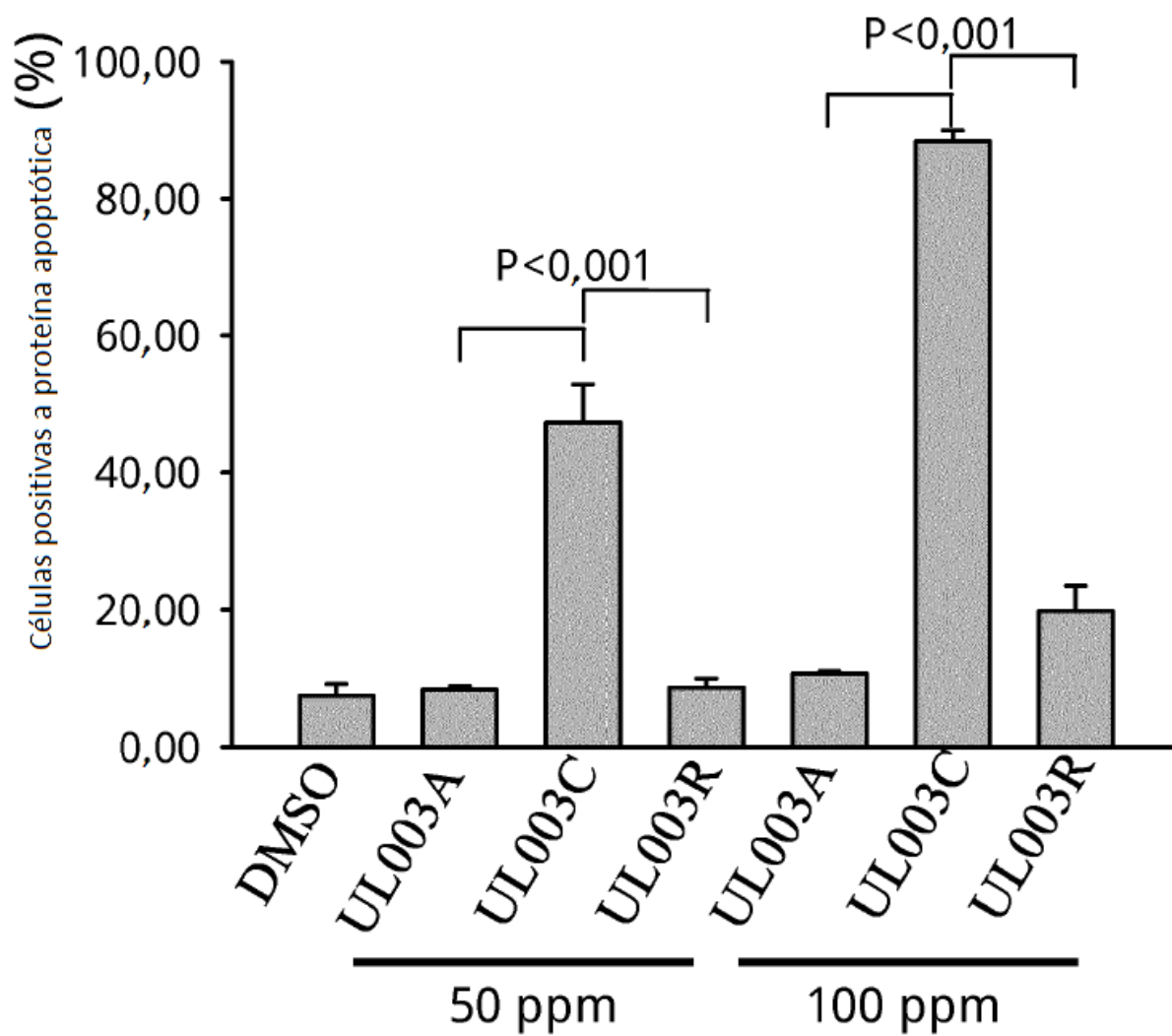


FIG. 5

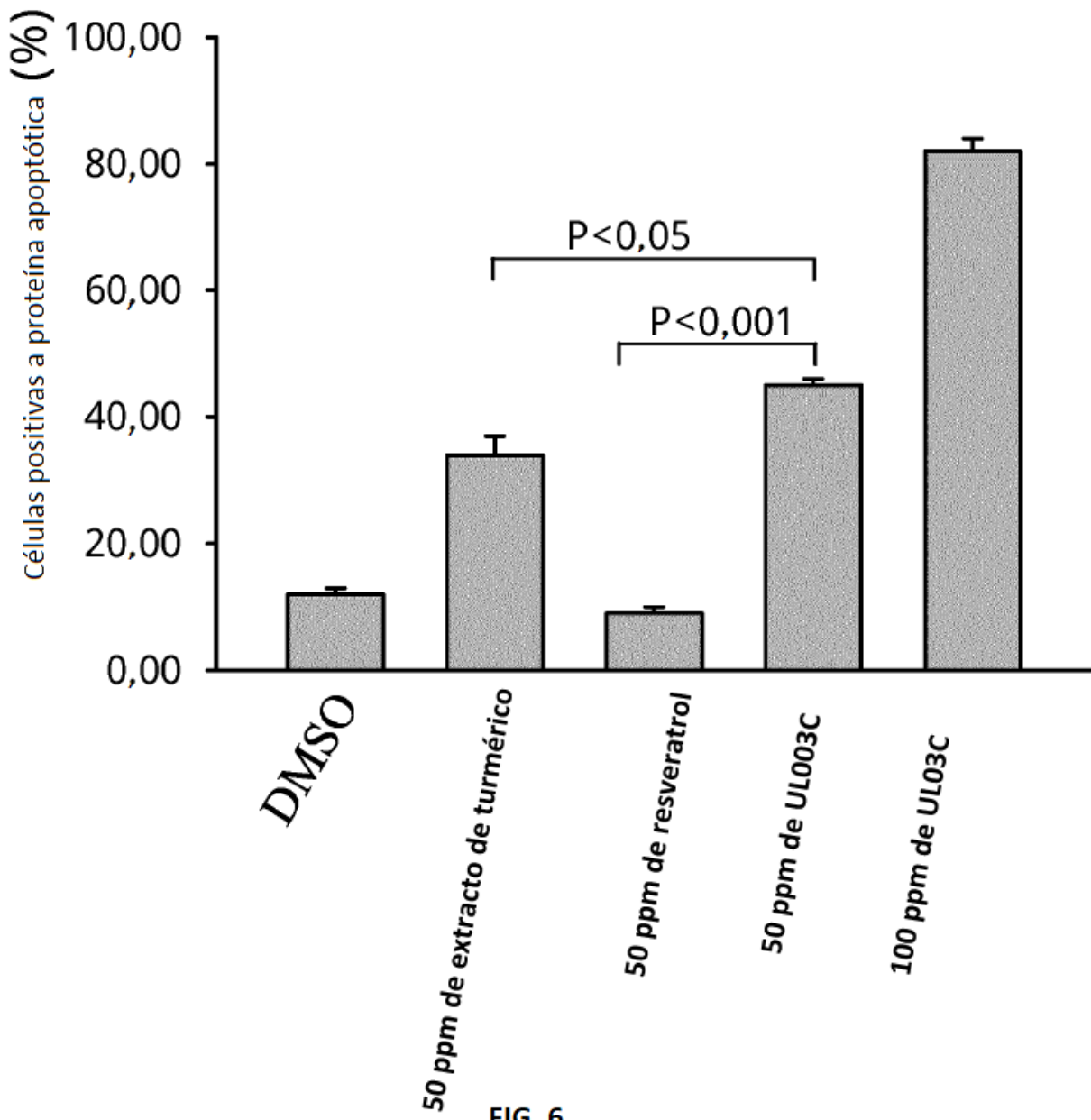


FIG. 6

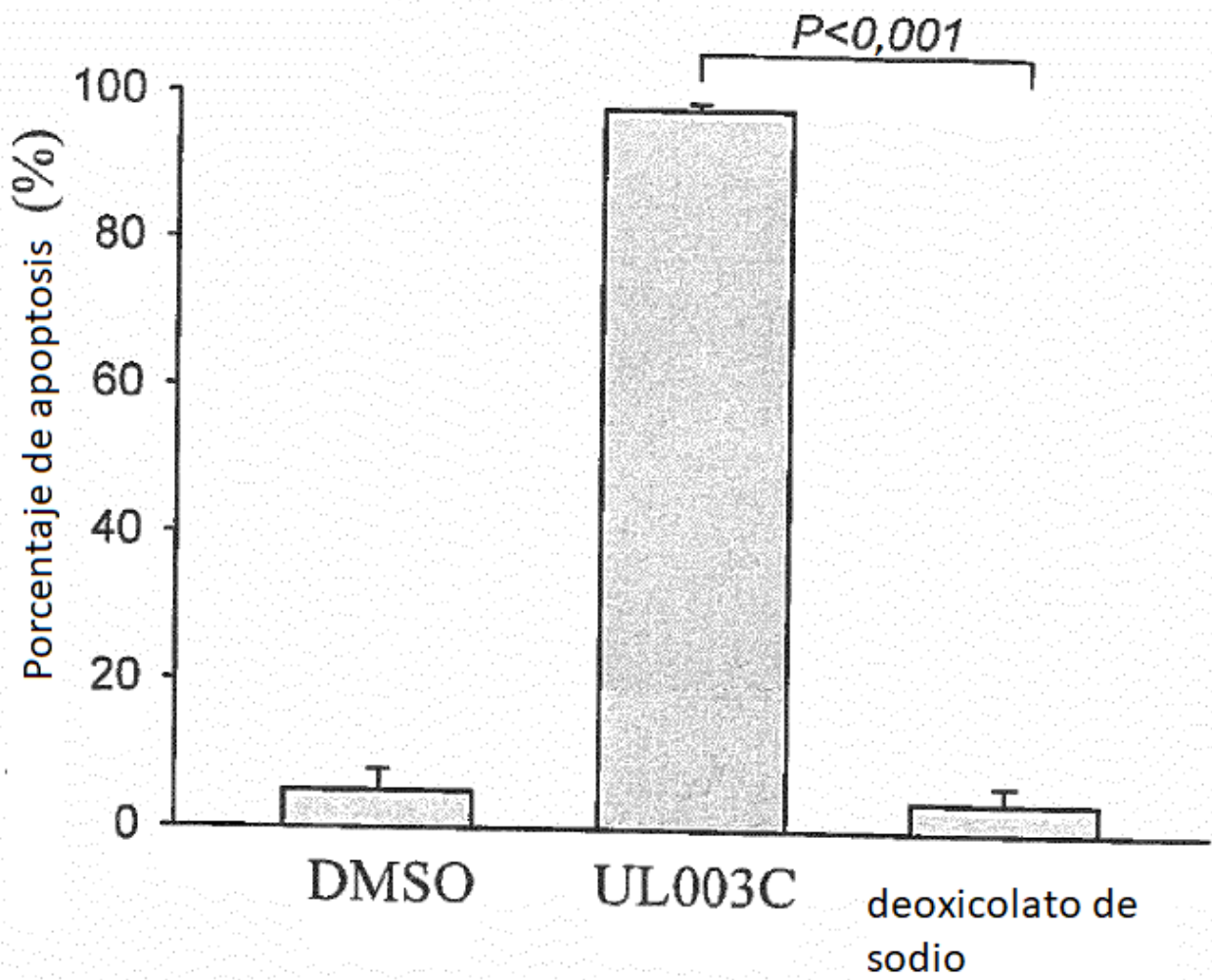


FIG. 7

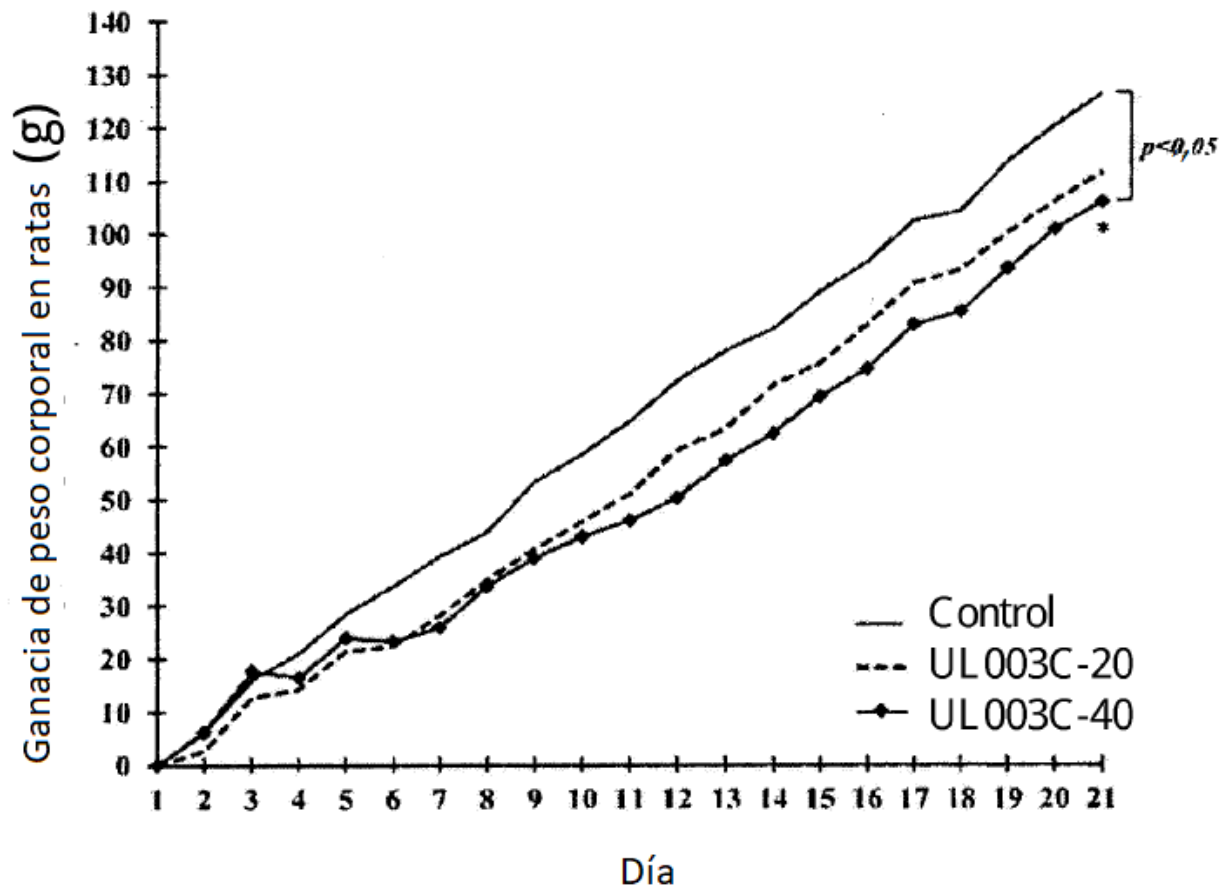


Fig. 8

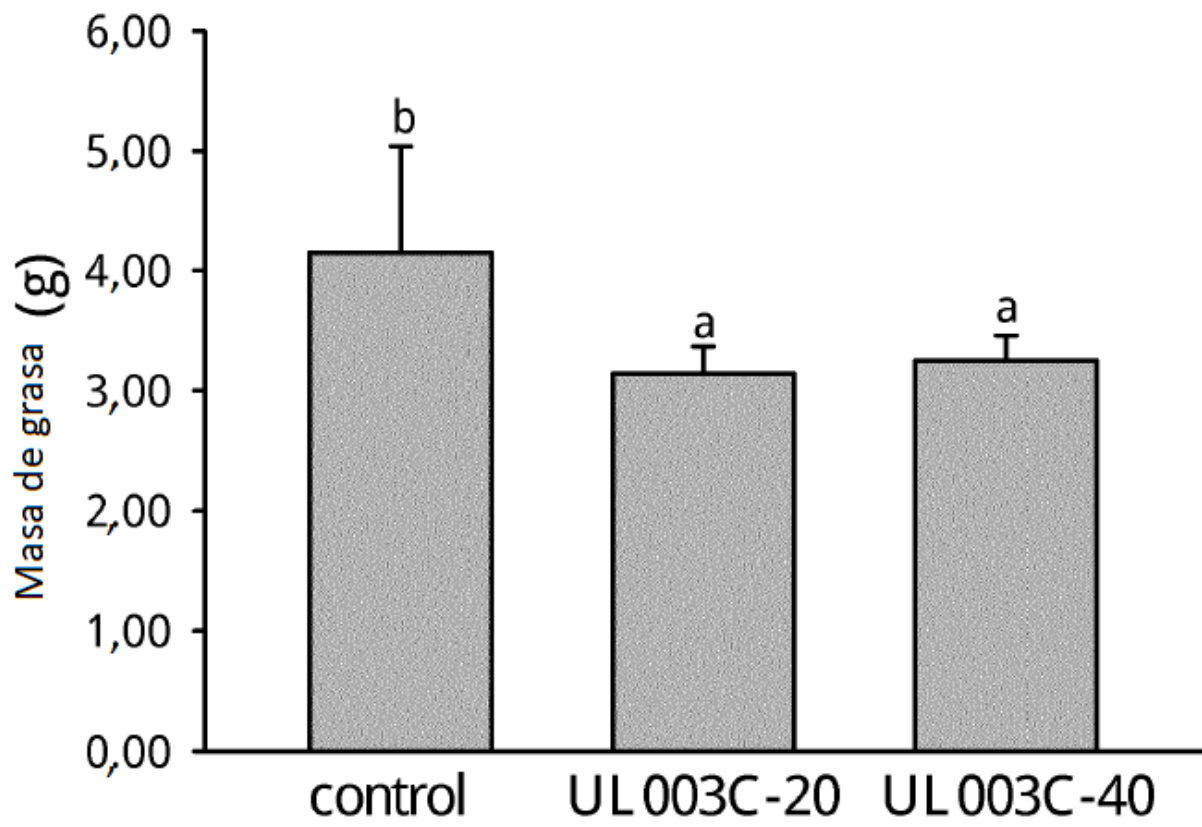


Fig. 9

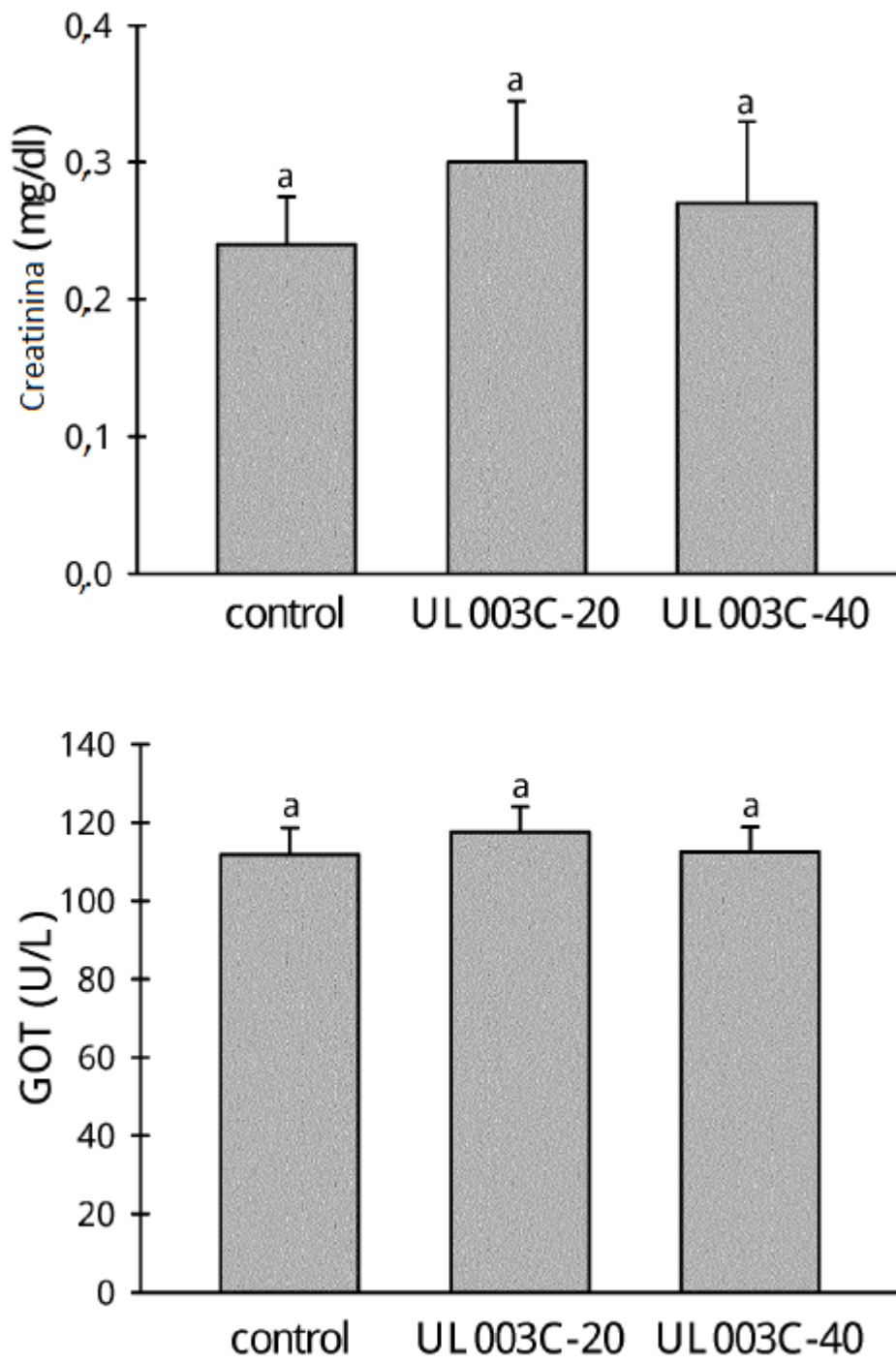


Fig. 10A

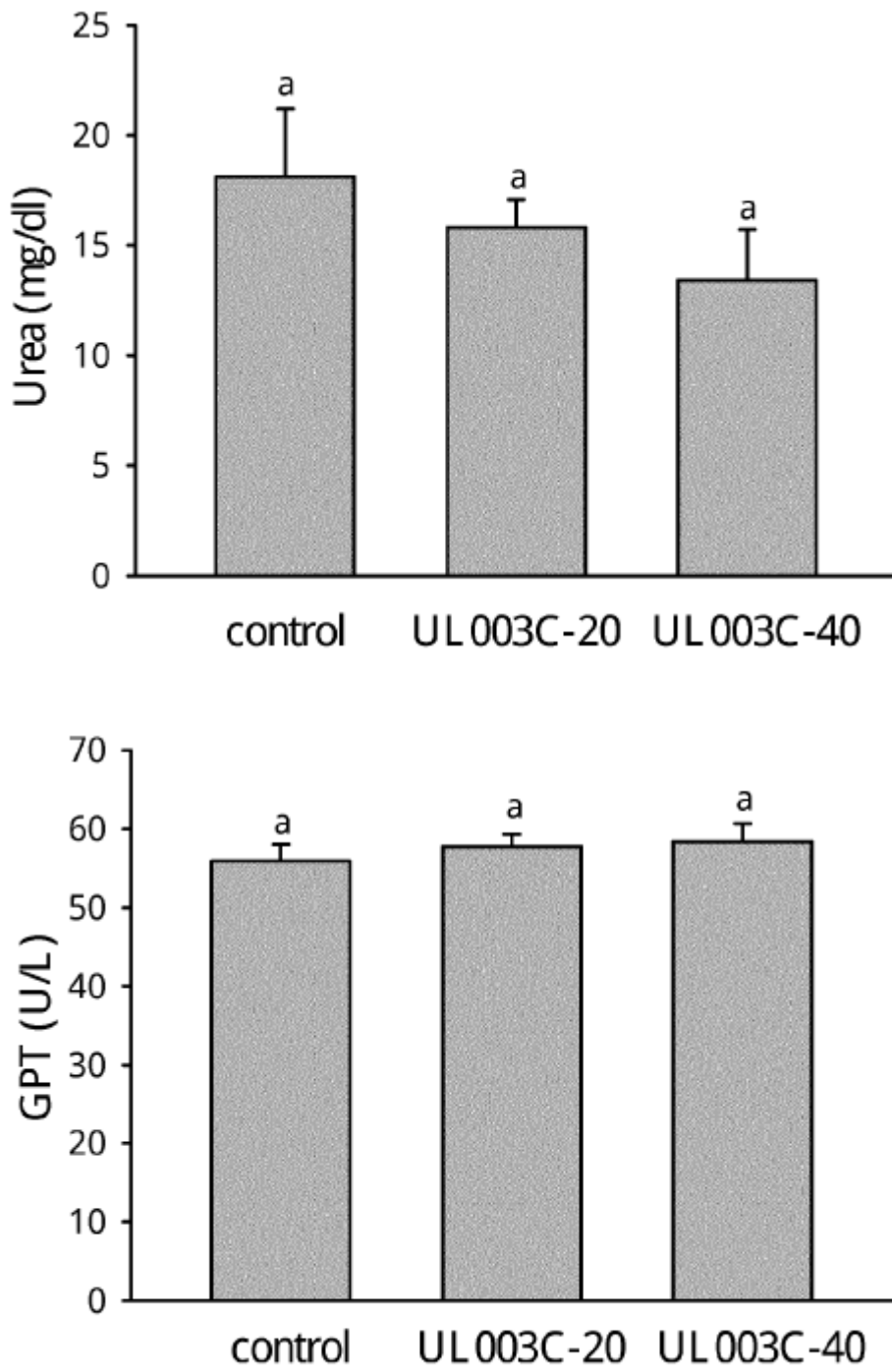


Fig. 10B

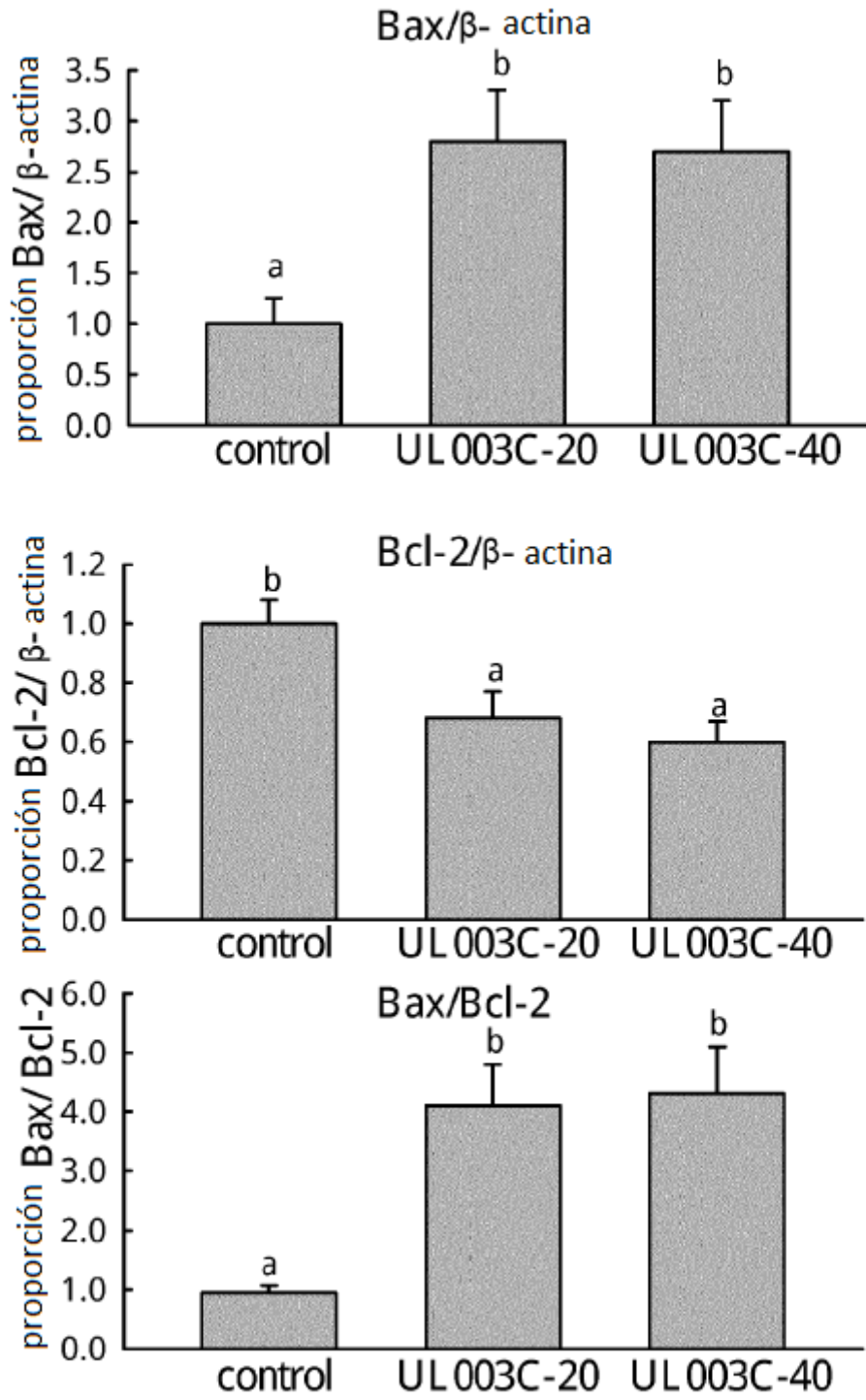


Fig. 11