



República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria,
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0808733-4 A2



* B R P I 0 8 0 8 7 3 3 A 2 *

(22) Data de Depósito: 07/03/2008
(43) Data da Publicação: 12/08/2014
(RPI 2275)

(51) Int.Cl.:
A61K 9/00
A61K 9/08
A61K 9/10
A61K 47/20
A61K 47/26

(54) Título: USO DE UMA MICROEMULSÃO AQUOSA PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA ADIPOSAS **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 14/03/2007 EP 07 005271.7,
16/03/2007 US 60/907,040

(73) Titular(es): Merz Pharma GMBH & CO. KGAA

(72) Inventor(es): Edgar Mentrup, Rainer Pooth, Sigrid Drewes,
Thomas Wimmer

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008052754 de
07/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/110510de
18/09/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE UMA MICROEMULSÃO AQUOSA PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ADIPOSAS**".

5 A presente invenção refere-se ao uso de uma microemulsão aquosa que compreende pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica e água para a produção de um fármaco para o tratamento de doenças e/ou condições adiposas.

10 Em geral, as microemulsões compreendendo tensoativos, substâncias lipofílicas e água são bem conhecidas no campo de formulações farmacêuticas que atuam como veículo estável para fármacos que apresentam fraca solubilidade em água. Em tais microemulsões conhecidas existe sempre um ingrediente ativo especial que dita a escolha dos outros componentes. Elas devem ser adaptadas ao percurso desejado da parte do corpo onde o ingrediente ativo é mais eficaz e elas não devem interagir com o fármaco.

15 Assim, qualquer efeito dos componentes da formulação de microemulsão diferente da função de veículo é indesejado.

20 Por outro lado, sistemas aquosos de fosfolipídeos e ácido biliar ou seus derivados são bem conhecidos para a preparação de formulações cosméticas e farmacêuticas.

25 As EP 0 615 746 A1 e WO 2005/112942 A1 descrevem tais formulações que podem carregar uma substância farmacologicamente ativa ou que podem ser usadas sem um tal ingrediente ativo. No último caso, é descrito que tais lipossomas podem ser usados para o tratamento de aterosclerose, lipídeos sanguíneos elevados e hepatopatia de qualquer espécie.

Os sistemas descritos mostram uma estrutura lipossômica distinta, isto é, uma membrana dupla de lipídeos que encapsula uma fase aquosa.

30 Em recente literatura ainda é descrito que tais sistemas de lipossoma podem reduzir o tecido adiposo quando localmente injetado subcutaneamente (Patrícia Guedes Rittes, *The use of phosphatidylcholine for correction of lower lid bulging due to prominent fat pads*, *Dermatol Surg* 2001, 27, 391-392).

Além disso, um sistema de lipossoma especial para a profilaxia e o tratamento de embolia gordurosa é conhecido o qual compreende fosfolípidos, ácido biliar, DL-alfa-Tocoferol, etanol e água (Lipostabil® N i.V.).

5 No entanto, os sistemas de lipossoma aquosos conhecidos de fosfolípidos e ácido biliar ou seus derivados para o tratamento de redução do tecido gorduroso possuem a distinta desvantagem de que sua distribuição dentro do tecido é fraca e assim o efeito é bastante localmente bastante contraído no ponto imediato de injeção. Conseqüentemente, atualização é necessária para o tratamento de uma área mais ampla de tecido para aplicar
10 um número elevado de injeções próximas uma da outra.

Portanto, é um objetivo da presente invenção fornecer uma formulação para o tratamento de doenças e/ou condições adiposas que apresentam uma boa biocompatibilidade e uma biodisponibilidade acentuada tal que áreas mais amplas de tecido adiposo possam ser afetadas.

15 Surpreendentemente, foi observado que o uso de uma microemulsão compreendendo pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica e água para a preparação de uma formulação para o tratamento de doenças e/ou condições adiposas que vai de encontro com o objetivo da presente invenção.

20 A presente invenção, além disso, refere-se ao uso de uma microemulsão que compreende pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica e água para o tratamento de doenças e/ou condições adiposas.

A presente invenção ademais se refere a um processo que compreende: a administração de uma microemulsão compreendendo pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica e água em um ser humano em uma quantidade eficaz para o tratamento de doenças e/ou condições adiposas.

30 O uso inventivo das microemulsões da presente invenção apresenta uma melhor biodisponibilidade e uma melhor distribuição no tecido gorduroso. Assim, considera-se menos injeções quando uma área mais ampla de tecido for tratada e em geral, um melhor efeito de lipólise. Pensa-se

que os efeitos vantajosos são derivados diretamente das diferenças na estrutura do sistema de microemulsão ternário com suas propriedades distintas como estabilidade termodinâmica e distribuição, assim como o tamanho de diferentes gotículas de fase comparadas com os sistemas de lipossoma do estado da técnica. Adicionalmente, as propriedades coligativas especiais do sistema de microemulsão ternário podem ser vistas como relevantes com relação às melhorias. No entanto, os mecanismos de transporte envolvidos não são bem compreendidos de modo que a evidência cientificamente segura para o mecanismo deve ainda ser encontrada.

As microemulsões são misturas líquidas isotrópicas transparentes de água, óleo e tensoativo. A fase aquosa pode conter sais e/ou outros ingredientes. É possível preparar microemulsões a partir de uma grande quantidade de componentes. Ao contrário das emulsões usuais, as microemulsões se formam após a mistura simples dos componentes e não requerem condições de alto cisalhamento. Nos sistemas ternários tais como microemulsões onde duas fases imiscíveis (água e "óleo") estão presentes logo depois da fase de tensoativo, as moléculas de tensoativo formam uma monocamada na interface entre o óleo e a água. A parte hidrofóbica das moléculas de tensoativo está dissolvida na fase oleosa e a parte hidrofílica das moléculas de tensoativos está na fase aquosa. As microemulsões são termodinamicamente estabilizadas pelo tensoativo em uma maneira especial porque elas não são simplesmente uma dispersão de gotículas de óleo em água ou vice-versa, mas uma mistura mais complexa de soluto, solução, micelas invertidas e normais e gotículas de microemulsão.

O tamanho de gotícula das microemulsões da presente invenção está preferivelmente entre 10 nm e 200 nm, mais preferivelmente entre 30 nm e 100 nm.

A substância lipofílica do sistema de microemulsão da invenção pode ser selecionada do grupo compreendendo óleos naturais (por exemplo, óleo de soja), éster de ácidos alquílicos de cadeia média com glicóis, octil-dodecanol, óleos de silício, parafinas, ácidos graxos e/ou seus ésteres, e vitaminas como riboflavina, niacinamida e/ou L-carnitina.

A microemulsão de acordo com a presente invenção é preferivelmente transparente ou opaca clara. As microemulsões são de fase única em uma dada faixa de pressão, temperatura e composição. Ao contrário das emulsões, elas são sistemas termodinamicamente estáveis devido aos seus
5 tamanhos pequenos de partícula e elas possuem a vantagem de que elas se formam espontaneamente e são estáveis mesmo se armazenadas durante um longo tempo.

Sujeitas ao tipo de tensoativo usado, as microemulsões são distintas em microemulsões iônicas e não-iônicas.

10 No termo "valor de HLB", HLB significa equilíbrio hidrófilo-lipófilo. Os tensoativos com um HLB baixo são mais lipofílicos e assim tendem a produzir uma emulsão de água em óleo, enquanto aqueles com um HLB elevado são mais hidrófilos e tendem a produzir uma emulsão de óleo em água. O valor de HLB de cada tensoativo é determinado por uma análise das
15 características do tensoativo. Uma lista de valores de HLB para vários tensoativos está disponível em muitas referências tais como o Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Edição. O valor de HLB pode ser usado para prever as propriedades do tensoativo de uma molécula, tipicamente um valor de 3 a 6 indica um emulsificante de A/O, um valor de 7 a 9 indica um agente umectante, um valor de 8 a 12 indica um emulsificante de O/A, um
20 valor de 12 a 15 é típico de detergentes, e um valor de 15 a 20 indica um solubilizante ou hidrófilo.

Preferivelmente, o tensoativo da presente invenção pode ser selecionado do grupo compreendendo 3-sn-fosfatidilcolina, soja (fosfolipona
25 90), soja reduzida (fosfolipona 90H), 3-(3sn)-fosfatidilglicerol soja (fosfolipona G), dimiristoilfosfatidilglicerol, liso-fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico, ácido quendodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido tri-hidroxiprostânico, ácido ursodesoxicólico, ácido taurocólico, ou ácido
30 glicocólico e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, assim como éteres de álcoois etoxilados e álcoois alquílicos (C6-C16), éster alquílico com C8-C20 com álcoois etoxilados, éster de ácidos saturados e insaturados com C8-C20

com açúcares, alquiletersulfatos como poliéter de óleo de mamona e óxido de etileno (cremefor EL), éter de álcool graxo de polioxietileno, monoéster polissórbico, poloxâmero, poloxamina.

5 Preferivelmente, a microemulsão da presente invenção pode consistir em pelo menos um tensoativo sendo selecionado do grupo de éteres de álcoois etoxilados e álcoois alquílicos (C6-C16), éster alquílico com C8-C20 com álcoois etoxilados, ésteres de ácidos saturados e insaturados com C8-C20 com açúcares, sulfatos de éter alquílico como poliéter de óleo de mamona e óxido de etileno (cremefor EL), éter de álcool graxo de polioxi-
10 etileno, monoéster polissórbico, poloxâmero, e poloxamina, pelo menos uma substância lipofílica sendo selecionada do grupo compreendendo óleos naturais (por exemplo, óleo de soja), éster de ácidos alquílicos de cadeia média com glicóis, octil-dodecanol, óleos de silício, parafinas, ácidos graxos e/ou seus ésteres, riboflavina, niacinamida, e L-carnitina, sais fisiologicamente
15 aceitáveis, e água.

Ainda mais preferivelmente, o sistema de microemulsão da presente invenção pode consistir em um tensoativo sendo selecionado do grupo de polissorbato, óleo de mamona polietoxilado, e mono-oleato de sorbitano, pelo menos uma substância lipofílica sendo selecionada do grupo compre-
20 endendo óleos naturais (por exemplo, óleo de soja), éster de ácidos alquílicos de cadeia média com glicóis, octil-dodecanol, óleos de silício, parafinas, ácidos graxos e/ou seus ésteres, riboflavina, niacinamida, e L-carnitina, sais fisiologicamente aceitáveis, e água.

Foi surpreendentemente observado que a escolha do tensoativo desempenha o papel mais importante na eficácia do sistema de microemul-
25 são. Assim, as investigações foram realizadas mostrando que os sistemas altamente eficazes são baseados nos tensoativos poliméricos apresentados acima.

Mais preferivelmente, o tensoativo possui um valor de HLB entre
30 7 e 13, mais preferivelmente entre 9 e 11.

Devido à provisão de uma substância lipofílica na microemulsão uma distribuição ainda melhor das substâncias ativas pode ocorrer. Desta

maneira, áreas mais amplas de tecido podem ser afetadas por uma injeção única.

Em uma modalidade preferida da presente invenção o sistema ainda compreende um cotensoativo.

5 Em geral, o cotensoativo é menos lipofílico do que o tensoativo com um valor de 9 a 17.

Assim, uma outra estabilização do sistema de microemulsão da invenção pode ser alcançada resultando em uma vida de útil mais longa.

O cotensoativo pode em particular ser selecionado do grupo de
10 3-sn-fosfatidilcolina, soja (fosfolipona 90), soja reduzida (fosfolipona 90H), 3-(3sn)-fosfatidilglicerol soja (fosfolipona G), dimiristoilfosfatidilglicerol, liso-fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico, ácido quendodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido tri-hidroxiprostânico, ácido ursodesoxicólico, ácido taurocólico, ou ácido glicocólico e/ou seus sais fisiologica-
15 mente aceitáveis, assim como éteres de álcoois etoxilados e álcoois alquílicos (C6-C16), éster alquílico com C8-C20 com álcoois etoxilados, éster de ácidos saturados e insaturados com C8-C20 com açúcares, alquiletersulfatos como poliéter de óleo de mamona e óxido de etileno (cremefor EL), éter
20 de álcool graxo de polioxietileno, monoéster polissórbico, poloxâmero, poloxamina.

De acordo com uma outra modalidade preferida da presente invenção o sistema adicionalmente compreende um álcool.

Os álcoois particularmente preferidos são álcoois C2-C8, e em
25 particular etanol, propileno glicol e glicerina.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, a relação de massa da substância lipofílica para o tensoativo está preferivelmente entre 10 : 1 e 1 : 10 % em peso, mais preferivelmente de 1 : 0,2 e 1 : 1,5 % em peso.

30 A concentração do tensoativo no sistema de microemulsão está preferivelmente entre 0,5 e 50 % em peso, em particular entre 5 e 25 % em peso.

O valor do pH do sistema de acordo com a presente invenção é neutro e varia preferivelmente entre 5,0 e 9,0, mais preferivelmente entre 6,0 e 8,0.

5 Sob o termo doença e/ou condição do tecido adiposo, em particular, quaisquer depósitos de gordura local indesejados e/ou os seguintes exemplos de doença incluindo simples aparências não-estéticas como celulite, são entendidos:

10 Lipomas são tumores benignos de desenvolvimento vagaroso de células gordurosas, de preferência localizados no tecido adiposo subcutâneo, que podem ocorrer em várias formas e características. Elas podem formar muco, carbonato de cálcio e/ou se tornar ossificadas. Adicionalmente, a formação aumentada de tecido conectivo e cápsulas pode ocorrer juntamente com os vasos sanguíneos recentemente formados que são todos classificados como anormais por causa da compressão sobre os vasos san-

15 guíneos, assim como sobre as células nervosas é algética. Lipomas ocorrem em várias síndromes como, por exemplo, a síndrome de Vardner, a síndrome de Lanois-Bensaude e a síndrome de Proteus.

20 A lipomatose dolorosa e celulite são formas especiais de proliferação hipertrófica de tecido adiposo que é localizada entre a fáscia adiposa dérmica e a parte inferior da derme. Devido às influências hormonais, uma capacidade aumentada de ligar água nestas células gordurosas é observada, que elas próprias iniciam a pressão e causam subsequentemente congestões nos vasos linfáticos. Adicionalmente, compressão e irritação nos nervos sensíveis periféricos são aplicadas de modo que os pacientes têm

25 uma sensibilidade extrema ao contato. Ao longo dos anos, nódulos gordurosos localizados disseminados irregulares podem se formar sob a derme fina que são dolorosos e apresentam um caráter não-estético.

Neste contexto também, as condições como Lipoedema ou síndrome lipodistrófica devem ser mencionadas.

30 As doenças do tecido adiposo acima abordadas demonstram, em comparação com as condições do tecido patofisiológico de doença adiposa relacionada com a alimentação, que podem ser identificadas por cica-

trizes histológicas e parâmetro de inflamação assim como modificações na morfologia histológica do tecido adiposo.

5 Sob o termo regressão, é em particular entendido que a lipólise do tecido adiposo e a degeneração do tecido adiposo prolífico estão ocorrendo.

O tratamento com uma formulação da presente invenção é preferivelmente direcionado ao tecido com celulite e/ou depósitos locais de tecido adiposo não-estético. Em comparação com os tratamentos conhecidos, especialmente as áreas de caráter principalmente não-estético são muito
10 receptivas ao efeito benéfico de uma boa biocompatibilidade e uma biodisponibilidade intensificada, tal que as áreas mais amplas podem ser alcançadas com uma única aplicação.

Em geral, todo tecido adiposo indesejável e/ou não-estético pode ser tratado com as formulações da presente invenção. Isto inclui tecido
15 adiposo ao redor dos olhos, nas faces, no pescoço e região do queixo, nas costas, sob e ao redor dos braços, nas coxas, na região do estômago superior e inferior, no joelho, e/ou nos assim chamados quadril, glúteo e nádegas.

Em particular, com o uso de microemulsões de acordo com a presente invenção, os depósitos locais de tecido adiposo não-estético ao
20 redor dos olhos, sob os braços, no pescoço e na região do queixo e/ou nas coxas são preferivelmente tratados. Essas regiões do corpo frequentemente apresentam uma sensibilidade elevada de modo que uma possível redução dos pontos de injeção e frequência de injeção seja especialmente mais benéfica para o tecido nas regiões mencionadas.

25 A preparação de um sistema de microemulsão da presente invenção pode, por exemplo, ser tal que pelo menos um tensoativo e pelo menos uma substância lipofílica são misturados em água em uma relação divulgada acima. A preparação pode ser levada adiante por qualquer forma conhecida de preparação de microemulsões.

30 A aplicação de um sistema de microemulsão da presente invenção pode ser realizada por qualquer forma de injeção ou aplicação tópica, em particular por injeção subcutânea, por injeção intra-arterial, por injeção

intramuscular ou por injeção intravenosa.

Uma aplicação percutânea também é possível com vários meios de veículo. Nesta aplicação, diversas técnicas de auxílio como a iontoforese podem ser aplicadas. A aplicação pode, por exemplo, ser feita por pressão hidrostática. Deste modo uma distribuição uniforme é realizada.

Preferivelmente, cada unidade da formulação possui uma dose distinta do sistema de microemulsão como ingrediente ativo. Esta dose pode alcançar de cerca de 10 mg a cerca de 3000 mg, preferível de cerca de 100 mg a cerca de 1000 mg, por peso total do tensoativo.

Para o tratamento de um paciente adulto por aplicação de soluções de injeção, doses diárias de 5 mg a 5000 mg, preferível de 250 mg a 2500 mg por meio de injeção por peso total do tensoativo dependente do tamanho do tecido adiposo a ser tratado são administradas.

A dose também é dependente do tamanho do depósito de gordura e/ou da distribuição desordenada das células de gordura e/ou do tipo de doença adiposa. Deve ser adaptada com as necessidades do paciente individual, no caso de lipomas pequenos ainda quantidades de 10 mg a 50 mg podem ser usadas.

Exemplos:

Os efeitos sobre a citotoxicidade nos adipócitos usando ensaios de liberação de LDH e liberação de Calceína-AM de compostos de 4 líquidos foram testados com números de referência:

- 1 TWEEN 80 (sendo um polissorbato 80);
- 2 CREMOPHOR EL (sendo um óleo de mamona polietoxilado);
- 3 SPAN 80V (sendo mono-oleato de sorbitano), e
- 4 LIPOSTABIL TM (sendo uma fosfatidilcolina e ácido biliar contendo solução de injeção de lipólise).

As experiências foram executadas em placas 96 poços e uma diluição de 1:512 sugere que 0,37 µl de meios de compostos líquidos foi adicionado diretamente nas células em 200 µl de meio DMEM. A diluição foi feita em temperatura ambiente e uma microemulsão completa e incolor ou

amarela foi observada após 4 horas.

Procedimentos Experimentais

Culturas Celulares:

Pré-adipócitos humanos primários foram obtidos da Promocell
5 (Heidelberg, Germany). O número de ordem é C-12731 e o Lot-No 5112201
(abdômen, mulher branca de 44 anos de idade).

Protocolo da cultura:

Células pré-adipócitas humanas foram mantidas em Preadipocyte
10 Growth Medium (DMEM; BioWhitaker Cat: BE12-604F/U1; Lot N^o
6MB0130 contendo 10 % de FCS inativado por calor e 1 % de penicilina-
estreptomicina) a 37 °C em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células
foram espalhadas em vários frascos T75 para alcançar confluência de 60 a
80 %. Para diferenciar, os pré-adipócitos (104 células/poço) foram cultivados
em placas de 96 poços para alcançar confluência. Neste ponto (dia 0), as
15 células foram transferidas para o meio de diferenciação (DMEM, 10% de
FBS, 0,25 µM de dexametasona, 0,25 mM de IBMX, e 1 µg/ml de insulina)
durante 3 dias, com uma mudança de meio nos intervalos. No dia 3, a de-
xametasona e IBMX foram removidos deixando insulina sobre as células
durante um adicional de 4 dias, mudando o meio a cada 2 dias. Depois dis-
20 so, as células foram mantidas na propagação original DMEM, mudando o
meio a cada 2 a 3 dias até o uso. As placas onde as células são >75 % dife-
renciadas foram usadas para as experiências (dia 10 após a indução). Os
adipócitos são redondos e cheios de glóbulos de gordura facilmente distin-
guíveis após 7 dias de cultivo.

25 Ensaio de citotoxicidade: O CytoTox-ONE[®] Homogeneous
Membrane Integrity Assay da Promega foi usado para estudar a liberação de
LDH (O número de ordem G7892 e o Lot-No 234242/27/09/08). Os adipóci-
tos diferenciados foram tratados com os compostos de teste durante 24 ou
48 horas e a liberação de LDH detectada usando um ensaio fluorimétrico
30 CytoTox-ONE (ver acima) de acordo com as instruções do fabricante. A libe-
ração máxima de LDH foi determinada mediante a lise completa das células
usando 0,1 % de Triton X-100. As células de controle tratadas com água iso-

ladamente foram usadas para determinar o nível de linha de base da liberação de LDH (0 % de morte celular). A fluorescência foi detectada em um aparelho Genius Pro usando placas específicas com 96 micropoços para fluorescência. Usamos filtros de excitação na faixa de 530 a 570 nm e filtros de emissão na faixa de 580 a 620 nm.

Cálculo dos Resultados

As porcentagens de citotoxicidade por liberação de LDH foram calculadas de acordo com a instrução do fabricante (<http://www.promega.com/tbs/tb306/tb306.pdf>)

$$\text{Percentual de citotoxicidade} = 100 \times \frac{(\text{Experimental} - \text{Formação do Meio de Cultura})}{(\text{Liberação Máxima de LDH} - \text{Formação do Meio de Cultura})}$$

De acordo com este cálculo a liberação espontânea nas células não tratadas pode indicar uma certa citotoxicidade nas células não tratadas. Isto pode ser explicado porque após a confluência dos pré-adipócitos algumas das células não se diferenciaram em adipócitos e certa citotoxicidade no crescimento excessivo das células deve ser esperada. Vulgarmente observamos que nas células pré-adipócitas confluentes não tratadas a liberação de LDH pode alcançar valores de até 15 a 20 % da liberação de LDH total induzida por Triton X-100 (100 % de liberação) e nos adipócitos diferenciados a liberação de LDH espontânea pode alcançar valores de até 35 % (dependendo do tempo de cultivo). Este tipo de cálculo pode induzir a má interpretação e, portanto, a citotoxicidade específica foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ S.C.} : 100 \% \times \frac{x (\% \text{ liberação de LDH espontânea} - \% \text{ liberação de LDH espontânea})}{(\% \text{ liberação de LDH induzida por Triton} - \% \text{ liberação de LDH espontânea})}$$

Valores S.C. abaixo de 0 % foram considerados arbitrários como 0 % de citotoxicidade induzida por substância.

Ensaio de citotoxicidade em células aderentes (3T3-L1) usando o método de Calceína-AM:

As células foram semeadas dentro de placas de 96 poços em 104 células viáveis por poços e deixadas para se ligar na placa durante 24 h.

Após 24 h, as células foram estimuladas como indicado durante mais 24 h. Sob estas condições de cultivo, as células 3T3-L1 não foram diferenciadas dos adipócitos. Depois, os poços foram lavados e as células incubadas com Calceína-AM (1 μ M) (Molecular Probes) durante 30 min. Então, a fluorescência das células viáveis foi detectada em uma leitora de placa de microtítulo (TECAN Genius Pro). Usando este método, a absorção de Calceína-AM pelas células viáveis é medida. A Calceína-AM foi hidrolisada por esterases celulares e depois a fluorescência emitida pela calceína é detectada na leitora de placa (excitação: 490 nm, emissão: 515 nm).

5
10 Análise de autofluorescência das substâncias de teste: Nenhum controle de célula com meio e substância de teste isoladamente foi preparado para determinar o efeito do composto de teste na formação de fluorescência. Usou-se filtros de excitação na faixa de 530 a 570 nm e filtros de emissão na faixa de 580 a 620 nm. Observou-se que nenhuma das substâncias de teste inclu-
15 idas neste estudo apresentou autofluorescência.

Efeitos das substâncias de teste tanto sobre os pré-adipócitos quanto sobre os adipócitos diferenciados (liberação de LDH):

Para confirmar a atividade citotóxica da substância de teste em certas concentrações, os adipócitos primários humanos não-diferenciados
20 (tratamento de 24 h) e diferenciados das culturas foram tratados com as diluições indicadas durante 24h e 48h e a liberação de LDH medida nos sobrenadantes.

Tabela 1: Efeitos das substâncias de teste tanto sobre os pré-adipócitos quanto sobre os adipócitos diferenciados (liberação de LDH)

Nº da substância de teste	diluição	pré-adipócitos	adipócitos diferenciados	
		24h	24h	48h
1	1:512	Tóxico (38,1%)	Tóxico (42,8%)	Tóxico (100%)
2	1:512	Tóxico (32,6%)	Tóxico (56,1%)	Tóxico (100%)
	1:10000	não tóxicos	não tóxicos	levemente tóxicos (20,3%)
3	1:512	não tóxicos	não tóxicos	
	1:10000	não tóxicos	não tóxicos	

Nº da substância de teste	diluição	pré-adipócitos	adipócitos diferenciados	
4 (técnica anterior)	1:512	não tóxicos	não tóxicos	
	1:10000	não tóxicos	não tóxicos	

Efeitos citotóxicos da substância de teste sobre os adipócitos:

5 Absorção de Calceína-AM: As células foram incubadas com diferentes concentrações dos compostos de teste durante 24 h e a viabilidade celular foi analisada pelo método de Calceína-AM fluorescente. Neste tipo de ensaio, a RFU mais elevada (unidade fluorescente relativa) corresponde às células viáveis.

Tabela 2: Diluições onde a citotoxicidade sobre os adipócitos ainda está presente.

Nº da substância de teste	diluição	Adipócitos (Calceína – AM)	Adipócitos (LDH)
		24h	24h
1	1:50	tóxicos	tóxicos
	1:100	Tóxico	Tóxico
	1:200	Tóxico	Tóxico
	1:400	Tóxico	Tóxico
	1:800	Tóxico	Tóxico
	1:1600	Tóxico (49,3%)	Não tóxico
	1:3200	Não tóxico	Não tóxico
	1:6400	Não tóxico	Não tóxico
	1:12800	Não tóxico	Não tóxico
2	1:50	tóxicos	Tóxicos
	1:100	tóxicos	tóxicos
	1:200	tóxicos	tóxicos
	1:400	tóxicos	Tóxico (43,6%)
	1:800	Tóxico (48,4%)	Não tóxico
	1:1600	Levemente tóxico (26,2%)	Não tóxico
	1:3200	Levemente tóxico (22,2%)	Não tóxico
	1:6400	Não tóxico	Não tóxico
	1:12800	Não tóxico	Não tóxico
3	1:12,5	Tóxico	Tóxico
	1:25	Tóxico	Tóxico

3	1:50	Tóxico	Tóxico
	1:100	Tóxico	Tóxico
	1:200	Tóxico	Tóxico (34,9%)
	1:400	Tóxico	Não-tóxico
	1:800	Levemente tóxico (34,9%)	Não-tóxico
	1:1600	Não tóxico	Não tóxico
	1:3200	Não tóxico	Não tóxico
4 (técnica anterior)	1:12,5	Tóxico	Tóxico
	1:25	Tóxico	Tóxico
	1:50	Tóxico	Tóxico
	1:100	Tóxico	Tóxico
	1:200	Tóxico	Tóxico (25,9%)
	1:400	Tóxico (50%)	Não tóxico
	1:800	Não tóxico	Não tóxico
	1:1600	Não tóxico	Não tóxico
	1:3200	Não tóxico	Não tóxico

Como pode ser visto a partir da tabela 2, o efeito do uso de microemulsões de acordo com a presente invenção em lipólise de adipócitos é derivado mesmo em uma diluição muito mais elevada do que o exemplo de referência sendo um sistema de fosfatidilcolina e ácido biliar (Lipostabil TM).

Na base dos exemplos acima, as diluições foram calculadas em que 50 % ainda estavam com vida no caso do ensaio de Calceína ou que geraram 50 % de morte celular no caso do ensaio de LDH. Os resultados são mostrados na seguinte tabela 3:

Nº da substância de teste	ensaio de Calceína	ensaio de LDH
	diluição em que 50 % das células estão com vida	diluição gerando 50 % de morte celular
1	1:1631	1:328
2	1:793	1:184
3	1:724	ND*
4 (técnica anterior)	1:438	1:32

*ND: nenhuma curva pode ser estabelecida para o ensaio de LDH. Cerca de 30% das células foram mortas com concentrações variando de 1:12,5 a 1:200.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma microemulsão que compreende pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica e água para a preparação de uma formulação para o tratamento de doença e/ou condição de tecido adiposo.
5
2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a microemulsão possui um tamanho de partícula entre 5 nm e 200 nm, preferivelmente entre 30 nm e 100 nm.
3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a microemulsão adicionalmente compreende um álcool.
10
4. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um tensoativo possui um valor de HLB entre 6 e 12.
5. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um tensoativo é selecionado do grupo consistindo em 3-sn-fosfatidilcolina, soja (fosfolipona 90), soja reduzida (fosfolipona 90H), 3-(3sn)-fosfatidilglicerol soja (fosfolipona G), dimiristoilfosfatidilglicerol, liso-fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, ácido desoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico, ácido quendodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido trihidroxiprostânico, ácido ursodesoxicólico, ácido taurocólico, ou ácido glicocólico e/ou seus sais fisiologicamente aceitáveis, assim como éteres de álcoois etoxilados e álcoois alquílicos (C6-C16), éster alquílico com C8-C20 com álcoois etoxilados, éster de ácidos saturados e insaturados com C8-C20 com açúcares, alquiletersulfatos como poliéter de óleo de mamona e óxido de etileno (cremefor EL), éter de álcool graxo de polioxietileno, monoéster polissórbico, poloxâmero, poloxamina.
15
20
25
6. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a microemulsão consiste em pelo menos um tensoativo sendo selecionado do grupo de éteres de álcoois etoxilados e álcoois alquílicos (C6-C16), éster alquílico com C8-C20 com álcoois etoxilados, ésteres de ácidos saturados e insaturados com C8-C20 com
30

açúcares, sulfatos de éter alquílico como poliéter de óleo de mamona e óxi-
do de etileno (cremofor EL), éter de álcool graxo de polioxietileno, monoéster
polissórbico, poloxâmero, e poloxamina, pelo menos uma substância lipofílica
sendo selecionada do grupo compreendendo óleos naturais (por exemplo,
5 óleo de soja), éster de ácidos alquílicos de cadeia média com glicóis, octil-
dodecanol, óleos de silício, parafinas, ácidos graxos e/ou seus ésteres, ribo-
flavina, niacinamida, e L-carnitina, sais fisiologicamente aceitáveis, e água.

7. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações prece-
dentes, caracterizado pelo fato de que a microemulsão consiste em um ten-
soativo sendo selecionado do grupo de polissorbato, óleo de mamona polie-
10 toxilado, e mono-oleato de sorbitano, pelo menos uma substância lipofílica
sendo selecionada do grupo compreendendo óleos naturais (por exemplo,
óleo de soja), éster de ácidos alquílicos de cadeia média com glicóis, octil-
dodecanol, óleos de silício, parafinas, ácidos graxos e/ou seus ésteres, ribo-
15 flavina, niacinamida, e L-carnitina, sais fisiologicamente aceitáveis e água.

8. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações prece-
dentes, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma substância lipofíli-
ca é selecionada do grupo consistindo em óleos naturais, éster de alquiláci-
dos de cadeia média com glicóis, octil-dodecanol, óleos de silício, parafinas
20 e vitaminas.

9. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações prece-
dentes, caracterizado pelo fato de que a microemulsão adicionalmente com-
preende pelo menos um cotensoativo.

10. Uso de acordo com uma ou mais das reivindicações prece-
25 dentes, caracterizado pelo fato de que o tratamento é direcionado ao tecido
com celulite e/ou depósitos locais de tecido adiposo não-estético.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato
de que os depósitos locais de tecido adiposo não-estético ao redor dos olhos,
sob os braços, no pescoço e na região do queixo e/ou nas coxas são tratados.

30 12. Microemulsão como definida em qualquer uma das reivindi-
cações 1 a 11, para o tratamento de doença e/ou condição do tecido adipo-
so.

RESUMO

Patente de Invenção: **"USO DE UMA MICROEMULSÃO AQUOSA PARA A PREPARAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS ADIPOSAS"**.

5 A presente invenção refere-se ao uso de uma microemulsão que compreende pelo menos um tensoativo tendo um valor de HLB entre 5 e 15, pelo menos uma substância lipofílica, e água para a preparação de uma formulação para o tratamento de doença e/ou condição do tecido adiposo com biodisponibilidade melhorada e bom comportamento de liberação de
10 substâncias ativas.